

引文格式:许卓珺,余克明,庄菁. 诱导多能干细胞向神经视网膜细胞定向分化的研究进展[J]. 眼科新进展,2016,36(9):885-888. doi:10. 13389/j. cnki. rao. 2016. 0238

【文献综述】

诱导多能干细胞向神经视网膜细胞定向分化的研究进展

许卓珺 余克明 庄菁

作者简介:许卓珺,女,1991年12月出生,在读硕士研究生。联系电话:020-87330290(O);E-mail:xuzhuojun@whu.edu.cn;ORCID:0000-0002-2885-6471

About XU Zhuo-Jun: Female, born in December, 1991. Postgraduate student. Tel: + 86-20-87330290(O); E-mail: xuzhuojun@whu.edu.cn; ORCID:0000-0002-2885-6471

收稿日期:2016-03-09
修回日期:2016-04-11
本文编辑:方红玲
作者单位:510060 广东省广州市,中山大学中山眼科中心,眼科学国家重点实验室
通讯作者:庄菁, E-mail: zhuangj@mail.sysu.edu.cn; ORCID: 0000-0001-5335-3318
Received date: Mar 9, 2016
Accepted date: Apr 11, 2016
From the State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China
Responsible author: ZHUANG Jing, E-mail: zhuangj@mail.sysu.edu.cn; ORCID:0000-0001-5335-3318

Research progress on differentiation from induced pluripotent stem cells into neural retinal cells
XU Zhuo-Jun, YU Ke-Ming, ZHUANG Jing
【Key words】 induced pluripotent stem cells; differentiation; neural retinal cell; retinal degeneration disease
【Abstract】 Retinal degeneration diseases are the leading cause of visual impairment and blindness, this kind of blindness is always irreversible because the loss of retinal cells in these diseases can not be renewed. Induced pluripotent stem cell has an unlimited capacity for self-renewal and is able to differentiate into multiple cell types, which makes it a great candidate to build disease model and develop cell replacement therapy. This article reviews the research progress on the generation of induced pluripotent stem cell and the differentiation from induced pluripotent stem cells into neural retinal cells, in order to provide a reference for the laboratory study and clinical treatment of retinal degeneration diseases.
【中图分类号】 R774.6
【关键词】 诱导多能干细胞;定向分化;神经视网膜细胞;视网膜退行性病变
【摘要】 视网膜退行性病变是造成视觉损害乃至失明的重要原因,由于成年视网膜组织无法自我更新病变中丢失的细胞,导致视网膜退行性病变具有不可逆性。诱导多能干细胞具有自我更新和多向分化的巨大潜力,是建立疾病模型、研究细胞替代疗法的理想供体。本文重点论述诱导多能干细胞的获取及其向神经视网膜细胞定向分化方面的研究进展,为视网膜退行性病变的实验室研究和临床诊治提供一定参考。

经由与视神经相连的轴突,最终将光学信号传递至大脑。众所周知,一些遗传或年龄相关性的视网膜退行性疾病,如年龄相关性黄斑变性、Stargardt病和色素性视网膜炎等,随着病程的进展,均会对神经视网膜结构造成损害,甚至最终导致视力的丧失。这种视网膜退行性疾病造成的细胞萎缩及最终的视力损害都是不可逆的,传统的营养支持、药物或手术治疗都只能减缓疾病的进程,而无法将其根治。

随着再生医学的兴起,研究者们试图选择具有潜力的干细胞进行体外培养,并诱导其向神经视网膜细胞定向分化。诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)具有强大的多向分化潜能,且由于其来源广泛,又规避了普通干细胞所存在的伦理争议及移植排斥反应等问题,自问世之初就受到了研究者的广泛关注。由iPSCs定向分化而来的视网膜样细胞可用来建立特定的疾病模型,或是作为移植供体替代发生不可逆病变的细胞,用来治疗

视网膜是中枢神经系统的延伸,从结构上来讲,分为神经视网膜和视网膜色素上皮两层,其核心的神经视网膜结构由光感受器细胞、水平细胞、无长突细胞、双极细胞和神经节细胞这5种细胞构成,当光学刺激作用于光感受器细胞,光感受器细胞通过突触将其传递至中间神经元,激动视网膜神经节细胞,视网膜退行性疾病。

1 iPSCs的研究概况

2006年, TAKAHASHI等^[1]用逆转录病毒将OCT3/4、SOX2、c-MYC和KLF4四个转录因子引入小鼠成纤维细胞中进行基因重组,获得了能够多向分化的全能型干细胞,并将之命名为iPSCs,这种体细胞来源的多能干细胞具有与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)类似的形态学特征和生长特性,且能够表达ESC的标志性基因。iPSCs的获取涉及靶细胞的选取、转录因子的优化和转染载体的选择,以下将从这三个方面分别展开论述。

1.1 靶细胞的选取

iPSCs的来源极其广泛,除人类以外,小鼠、大鼠、山羊、食蟹猴等不同物种均可作为供体为iPSCs提供重编程的靶细胞,其中又以小鼠和人类来源的iPSCs最为常见^[1,4]。从组织胚胎学的角度来看,iPSCs靶细胞的选取已经覆盖了来自三

个胚层的细胞:包括来自外胚层的皮肤成纤维细胞、牙髓成纤维细胞、角质形成细胞;来自中胚层的骨骼肌细胞、肾小管上皮细胞、血液细胞、卵泡滋养层细胞;来自内胚层的胰腺 β 细胞、肝细胞等^[1,5-10]。目前研究最多的成纤维细胞具有易于培养以及体外增殖迅速等优点,其主要缺陷为细胞获取方面的不便以手术方式取材,均给患者带来痛苦同时还易引起感染等并发症。一些有潜力的新细胞类型,如血细胞、尿液细胞等,不仅材料来源广泛、且易于获取,在iPSCs的研究工作中具有广阔前景^[10-11]。总而言之,不同来源的靶细胞诱导生成iPSCs都有其优点和局限性,如何选取还应视具体情况而定。

1.2 转录因子的优化 OCT3/4、SOX2、c-MYC 和 KLF4 是诱导体细胞获取 iPSCs 的经典转录因子,其不足之处在于 c-MYC 基因的引入易造成细胞恶变,且转染效率较低^[1]。

将 c-MYC 基因剔除,仅应用 OCT3/4、SOX2 和 KLF4 三个转录因子转染人和鼠的成纤维细胞以重编程 iPSCs,能够避免 c-MYC 所带来的恶变风险,但其转染效率较经典的 OSKM 因子大幅降低^[12]。此外已有实验证实,UTF1、Wnt3a、GLIS1、Kdm2b 等基因皆可作为 c-MYC 的合理替代应用于 iPSCs 的重编程,与 OSK 三因子相比,其转染效率已获得了不同程度的提高^[13-15],但总体水平仍不尽如人意。为进一步提高转染效率,研究者进行了多方面的尝试——包括以 OSK 三因子为基础添加小分子化合物或其他促进转染的转录因子(如 TH2A、TH2B 等^[16]);直接对不含 c-MYC 的 OSK 三因子进行优化(如以 BMP4 或 Bmi1 替代 SOX2 和 KLF4、以 Tet1 替代 OCT4 等^[17-19]);或采用全新体系(如激活 cAMP 信号通路以诱导成体细胞多向分化;以 VPA、CHIR99021、616452、Tranylcypromine、FSK 和 DZNep 六个小分子取代 OSKM 因子导入靶细胞等^[20-21]);从而高效率地实现 iPSCs 重编程。

1.3 转染载体的选择 转录因子转染靶细胞的过程需要载体参与,常见的包括病毒载体、非病毒载体以及无载体参与的直接转染。病毒载体可分为整合与非整合两类:整合病毒载体,如逆转录病毒和慢病毒,在介导转录因子转染靶细胞的同时可能引起外源基因的整合,造成靶细胞染色体畸变^[1,22-23];非整合病毒载体,如腺病毒和仙台病毒,能够在无外源基因整合的前提下完成转录因子的转染,且后者较前者具有更高的转染效率,在近年来的研究工作中应用广泛^[24-26]。非病毒载体种类繁多,常见的有转座子载体、质粒载体、人工染色体载体以及某些纳米颗粒化合物载体等^[27-30],与病毒载体相比,非病毒载体在生物安全性方面更具保障。此外,转录因子亦可在无载体参与的情况下,通过合成 mRNA 或翻译重组蛋白等方式,依照 RNA 途径或蛋白质途径直接转染靶细胞^[31-32]。

合理选择转染载体,应结合具体情况,从生物安全性、操作可行性及转染效率等多方面综合考虑。

2 iPSCs 向神经视网膜细胞定向分化

视网膜退行性病变随着病情的转归,最终会导致神经视网膜细胞的损伤,并对视力造成不可逆的损害。诱导 iPSCs 向神经视网膜细胞定向分化,分化得来的细胞不仅可用于细胞替代疗法治疗视网膜退行性病变,还可用于建立疾病模型、进行药物筛选等。以下将分别论述 iPSCs 向光感受器细胞和视网膜神经节细胞方向分化方面的研究进展。

2.1 iPSCs 向光感受器细胞分化 iPSCs 可以通过不同途径向光感受器细胞方向分化^[33-38]。其大体实验思路如下:将拟胚体在无血清的环境中培养,使 iPSCs 向神经方向分化;再加入 Wnt 和 Nodal 信号通路抑制剂,诱导产生 Rx、Pax6 和 Mitf 阳性的神经视网膜祖细胞;后续应用维甲酸和牛磺酸,继短暂出现 Crx 阳性的神经视网膜前体细胞后,继续培养可使细胞表达视紫红质和恢复蛋白等光感受器细胞特异性标记^[33]。而不同诱导途径的差别在于,选择内源性因子还是外生因子对关键性信号通路(如 Wnt、BMP 和 Nodal)进行调控^[34-38]。为优化诱导过程,研究者们将 iPSCs 自发生成的神经上皮与细胞外基质共培养,以缩短定向分化所需时间,高效率分化出 Crx 阳性的光感受器前体细胞^[39];或是在诱导过程中加入适当的补充剂(如加入 B27 和 N2 因子以大幅提升 iPSCs 诱导分化出光感受器细胞的效率;添加 Dkk1 和 Noggin 因子以诱导 iPSCs 早期向视网膜祖细胞和光感受器前体细胞分化^[40])。近期的研究表明,应用融合的 iPSCs,可绕过拟胚体形成和外生因子的介入,在 2 周时间内自发形成包含视网膜前体细胞在内的神经视网膜结构,这些前体细胞能够分化出全部类型的视网膜细胞,这为进一步优化培养条件提供了思路^[41]。

既往通过诱导获取的光感受器样细胞在功能方面与在体细胞存在较大差异,2014 年,ZHONG 等^[42]通过 iPSCs 构建 3D 视网膜结构,首次获得了功能性的光感受器细胞(有外节生成,且能对光刺激作出反应),这标志着该领域的研究已迈入新的阶段。

2.2 iPSCs 向视网膜神经节细胞分化 一些外来信号分子和内在调控因子均可诱导 iPSCs 向视网膜神经节细胞分化^[41,43-45]——将拟胚体向神经方向诱导,再应用 E14 小鼠视网膜细胞来源的条件培养基对所获得的神经前体细胞进行刺激即可使其向视网膜神经节细胞分化^[43];添加 Dkk1、Noggin、DAPT 因子和使 Math5 基因过表达同样可诱导 iPSCs 定向分化为 Math5、Brn3b 和 Islet-1 表达阳性的视网膜神经节样细胞^[44];而应用纯化学的方法,先使 iPSCs 向神经丛分化,之后添加 DAPT,亦可诱导 iPSCs 获得视网膜神经节样细胞^[45]。

为使 iPSCs 诱导而来的视网膜神经节细胞具有与在体细胞类似的功能,这些视网膜神经节细胞不仅要与体内的视网膜神经节细胞层相融合,还需有足够长的轴突连接视神经,且与大脑建立连接。2015 年,TANAKA 等^[46]先于 3D 的培养体系中获得视泡样结构,再转换为 2D 的培养体系,通过脑源性神经营养因子的添加,最终获得的视网膜神经节细胞具有功能性的长轴突,它们同在体视网膜神经节细胞一样可以产生动作电位,且具有轴突运输功能;此外,亦有研究证实,iPSCs 诱导获得的神经节细胞移植入大鼠体内后,能够与宿主的神经节细胞层相融合,且表达视网膜神经节细胞特异性的标记^[46-47]。

3 总结与展望

纵观近年来眼科学研究的进展,通过干细胞建立疾病模型及进行细胞替代治疗,或许可以突破既往视网膜退行性病变研究和治疗的瓶颈。选取 iPSCs 进行研究,其主要优势包括:(1)细胞来源广泛;(2)从自体取材诱导获得具有免疫相容性;(3)符合伦理学要求。尽管在人工诱导 iPSCs 向视网膜细胞分化的过程中尚存在许多问题亟需解决,但是该领域所具有的广阔前景是不需置疑的。未来的研究应更多地结合专科特点,选取临床诊疗过程中所能常规获得的体细胞作为靶细胞,进一步优化实验步骤,在控制成本的前提下提升转化效率;此外,以 iPSCs 诱导所获得的神经视网膜,其正常生理结构及功能的建立也应作为未来的研究重点,毕竟从表达与在体组织具有相同特异性标记的“视网膜样细胞”,到具有完整生理功能、可应用于临床的视网膜组织,科研工作者还有很长的一段路要走。但相信在不久的将来,以 iPSCs 为基础的细胞替代治疗终将走入临床,为视网膜退行性疾病患者带来光明。

参考文献

[1] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.

[2] LIAO J, CUI C. Generation and characterization of rat iPSCs[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1357: 133-148.

[3] SANDMAIER SE, NANDAL A, POWELL A, GARRETT W, BLOMBERG L, DONOVAN DM, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from domestic goats[J]. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82(9): 709-721.

[4] SHIMOZAWA N. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells generated by using allogeneic genes[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1357: 173-182.

[5] CHIANG CH, WU WW, LI HY, CHIEN Y, SUN CC, PENG CH, et al. Enhanced antioxidant capacity of dental pulp-derived iPSC-differentiated hepatocytes and liver regeneration by injectable HGF-releasing hydrogel in fulminant hepatic failure[J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 541-559.

[6] KONDO H, KIM HW, WANG L, OKADA M, PAUL C, RONALD W, et al. Blockade of senescence-associated microRNA-195 in aged skeletal muscle cells facilitates reprogramming to produce induced pluripotent stem cells[J]. *Aging Cell*, 2016, 15(1): 56-66.

[7] SHAHJALAL HM, SHIRAKI N, SAKANO D, KIKAWA K, OGAKI S, BABA H, et al. Generation of insulin-producing β -like cells

from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system[J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(5): 394-408.

[8] HUNG SS, PEBAY A, WONG RC. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells using hair-derived keratinocytes[J]. *Vis Exp*, 2015, 20(102): e53174.

[9] UTIKAL J, MAHERALI N, KULALERT W, HOCHEDLINGER K. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(19): 3502-3510.

[10] LI Y, LIU T, VAN HALM-LUTTERODT N, CHEN J, SU Q, HAI Y. Reprogramming of blood cells into induced pluripotent stem cells as a new cell source for cartilage repair[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 31.

[11] XUE Y, CAI X, WANG L, LIAO B, ZHANG H, SHAN Y, et al. Generating a non-integrating human induced pluripotent stem cell bank from urine-derived cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70573.

[12] NAKAGAWA M, KOYANAGI M, TANABE K, TAKAHASHI K, ICHISAKA T, AOI T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(2): 101-106.

[13] ZHAO Y, YIN X, QIN H, ZHU F, LIU H, YANG W, et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 475-479.

[14] MARSON A, FOREMAN R, CHEVALIER B, BILODEAU S, KAHN M, YOUNG RA, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(2): 132-135.

[15] LIANG G, HE J, ZHANG Y. Kdm2b promotes induced pluripotent stem cell generation by facilitating gene activation early in reprogramming[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(5): 457-466.

[16] HUYNH LM, SHINAGAWA T, ISHII S. Two histone variants TH2A and TH2B enhance human induced pluripotent stem cell generation[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(3): 251-258.

[17] CHEN J, LIU J, YANG J, CHEN Y, CHEN J, NI S, et al. BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone[J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 205-212.

[18] MOON JH, HEO JS, KIM JS, JUN EK, LEE JH, KIM A, et al. Reprogramming fibroblasts into induced pluripotent stem cells with Bmi1[J]. *Cell Res*, 2011, 21(9): 1305-1315.

[19] GAO Y, CHEN J, LI K, WU T, HUANG B, LIU W, et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 453-469.

[20] FRITZ AL, ADIL MM, MAO SR, SCHAFFER DV. cAMP and EPAC signaling functionally replace OCT4 during induced pluripotent stem cell reprogramming[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(5): 952-963.

[21] HOU P, LI Y, ZHANG X, LIU C, GUAN J, LI H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds[J]. *Science*, 2013, 341(6146): 651-654.

[22] CAREY BW, MARKOULAKI S, HANNA J, SAHA K, GAO Q, MITALIPOVA M, et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(1): 157-162.

[23] FAN Y, LUO Y, CHEN X, LI Q, SUN X. Generation of human β -thalassemia induced pluripotent stem cells from amniotic fluid cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette[J]. *J Reprod Dev*, 2012, 58(4): 404-409.

[24] YAMASAKI S, HAMADA A, AKAGI E, NAKATAO H, OHTAKA M, NISHIMURA K, et al. Generation of cleidocranial dysplasia-specific human induced pluripotent stem cells in completely serum-, feeder-, and integration-free culture *in vitro*[J]. *Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(2): 252-264.

[25] ZHOU W, FREDERICK CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(11): 2667-2674.

[26] ONO M, HAMADA Y, HORIUCHI Y, MATSUO-TAKASAKI M, IMOTO Y, SATOMI K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human nasal epithelial cells using a Sendai virus vector[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42855.

[27] HOU P, LI Y, ZHANG X, LIU C, GUAN J, LI H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-

- molecule compounds [J]. *Science*, 2013, 341 (6146): 651-654.
- [28] OSAKADA F, JIN ZB, HIRAMI Y, IKEDA H, DANJYO T, WATANABE K, *et al.* *In vitro* differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122 (17): 3169-3179.
- [29] DEBOWSKI K, WARTHEMANN R, LENTES J, SALINASRIESTER G, DRESSEL R, LANGENSTROTH D, *et al.* Non-viral generation of marmoset monkey iPS cells by a six-factor-in-one-vector approach [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e0118424.
- [30] YU J, HU K, SMUGA-OTTO K, TIAN S, STEWART R, SLUKVIN II, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences [J]. *Science*, 2009, 324 (5928): 797-801.
- [31] ZHOU H, WU S, JOO JY, ZHU S, HAN DW, LIN T, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4 (5): 381-384.
- [32] YAKUBOV E, RECHAVI G, ROZENBLATT S, GIVOL D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394 (1): 189-193.
- [33] HIRAMI Y, OSAKADA F, TAKAHASHI K, OKITA K, YAMANAKA S, IKEDA H, *et al.* Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 458 (3): 126-131.
- [34] LAMBA DA, MCUSIC A, HIRATA RK, WANG PR, RUSSELL D, REH TA. Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (1): e8763.
- [35] BUCHHOLZ DE, HIKITA ST, ROWLAND TJ, FRIEDRICH AM, HINMAN CR, JOHNSON LV, *et al.* Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (10): 2427-2434.
- [36] MEYER JS, SHEARER RL, CAPOWSKI EE, WRIGHT LS, WALLACE KA, MCMILLAN EL, *et al.* Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (39): 16698-16703.
- [37] MEYER JS, HOWDEN SE, WALLACE KA, VERHOEVEN AD, WRIGHT LS, CAPOWSKI EE, *et al.* Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment [J]. *Stem Cells*, 2011, 29 (8): 1206-1218.
- [38] MELLOUGH CB, SERNAGOR E, MORENO-GIMENO, STEEL DH, LAKO M. Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30 (4): 673-686.
- [39] BOUCHERIE C, MUKHERJEE S, HENCKAERTS E, THRASHER AJ, SOWDEN JC, ALI RR. Brief report: self-organizing neuroepithelium from human pluripotent stem cells facilitates derivation of photoreceptors [J]. *Stem Cells*, 2013, 31 (2): 408-414.
- [40] MELLOUGH CB, SERNAGOR E, MORENO-GIMENO I, STEEL DH, LAKO M. Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30 (4): 673-686.
- [41] REICHMAN S, GOUREAU O. Production of retinal cells from confluent human iPS cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1357: 339-351.
- [42] ZHONG X, GUTIERREZ C, XUE T, HAMPTON C, VERGARA MN, CAO LH, *et al.* Generation of three dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4047.
- [43] PARAMESWARAN S, BALASUBRAMANIAN S, BABAI N, QIU F, EUDY JD, THORESON WB, *et al.* Induced pluripotent stem cells generate both retinal ganglion cells and photoreceptors; therapeutic implications in degenerative changes in glaucoma and age-related macular degeneration [J]. *Stem Cells*, 2010, 28 (4): 695-703.
- [44] CHEN M, CHEN Q, SUN X, SHEN W, LIU B, ZHONG X, *et al.* Generation of retinal ganglion-like cells from reprogrammed mouse fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (11): 5970-5978.
- [45] RIAZIFAR H, JIA Y, CHEN J, LYNCH G, HUANG T. Chemically induced specification of retinal ganglion cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3 (4): 424-432.
- [46] TANAKA T, YOKOI T, TAMALU F, WATANABE S, NISHINA S, AZUMA N. Generation of retinal ganglion cells with functional axons from human induced pluripotent stem cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8344.
- [47] PARAMESWARAN S, DRAVID SM, TEOTIA P, KRISHNAMOORTHY RR, QIU F, TORIS C, *et al.* Continuous non-cell autonomous reprogramming to generate retinal ganglion cells for glaucomatous neuropathy [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (6): 1743-1758.