

诱导胚胎干细胞分化为视网膜色素上皮细胞的培养方法

张 格, 朱 涵, 张婧雯, 徐雨迪, 段铭煊, 张 戈

引用: 张格, 朱涵, 张婧雯, 等. 诱导胚胎干细胞分化为视网膜色素上皮细胞的培养方法. 国际眼科杂志 2020; 20 (12): 2079-2082

作者单位: (450000) 中国河南省郑州市, 郑州大学医学院生理学与神经生物学系

作者简介: 张格, 男, 郑州大学在读本科, 大学生创新创业实验项目组长, 研究方向: 视觉损伤修复。

通讯作者: 朱涵, 女, 毕业于河南医科大学, 博士, 副教授, 研究方向: 视觉损伤修复. zhuhan@zzu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-11 修回日期: 2020-10-29

摘要

视网膜变性疾病导致视力下降, 是视网膜色素上皮(RPE)细胞或感光细胞引起不可逆性损害或凋亡所造成的功能异常, 从而导致的致盲性眼病, 常引起视觉障碍甚至失明。人胚胎干细胞(hESCs)是一种能够多向分化的细胞。凭借适当的方法, hESCs可分化为各种视网膜细胞。由于人体RPE细胞无法再生, 研究表明运用干细胞源性RPE细胞移植治疗视网膜病变的临床治疗方法具有实用前景, 且近年来已取得突破性进展。多因素的限制、方法的选择以及诱导条件的复杂等使诱导分化RPE的效率和移植后存活率存在较大差异且不稳定, 所以现阶段研究重点在于如何综合不同培养方法, 取其利去其弊, 提高hESCs定向分化效率以及细胞数量与质量, 降低培养污染以及免疫排斥反应等。本文将对目前存在多种培养方法进行举例归纳总结, 针对不同角度作出综述。

关键词: 胚胎干细胞; 视网膜色素上皮细胞; 视网膜变性疾病; 诱导分化

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.12.13

Culture methods of inducing embryonic stem cells to differentiate into retinal pigment epithelial cells

Ge Zhang, Han Zhu, Jing-Wen Zhang, Yu-Di Xu, Ming-Xuan Duan, Ge Zhang

Department of Physiology and Neurobiology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Correspondence to: Han Zhu. Department of Physiology and Neurobiology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. zhuhan@zzu.edu.cn

Received: 2020-02-11 Accepted: 2020-10-29

Abstract

• Retinal degenerative disease can lead to decreased vision, which is a blinding ophthalmopathy caused by

irreversible damage or apoptosis of retinal pigment epithelium (RPE) cells or photoreceptor cells, often resulting in visual impairment or even blindness. Human embryonic stem cells (hESCs) are a kind of multi-directional differentiation cells. By appropriate methods, hESCs can be differentiated into various retinal cells. Since human PRE cells cannot be regenerated, studies have shown that the clinical treatment of retinopathy with stem cell derived RPE cell transplantation has practical prospects and has made a breakthrough in recent years. Due to the limitations of multiple factors, the selection of methods and the complexity of induction conditions, the efficiency of induced differentiation of RPE and the survival rate after transplantation vary greatly and are unstable. Therefore, the current researches should focus on how to integrate different culture methods, take advantages and eliminate disadvantages, so as to improve the directed differentiation efficiency of hESCs, as well as the number and quality of induced cells, thus reducing culture pollution and immune rejection and so on. Here, we will summarize the current examples of various culture methods and give a review from different perspectives.

• **KEYWORDS:** embryonic stem cells; retinal pigment epithelial cells; degenerative diseases of the retina; differentiation

Citation: Zhang G, Zhu H, Zhang JW, et al. Culture methods of inducing embryonic stem cells to differentiate into retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020; 20 (12): 2079-2082

0 引言

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 位于视网膜光感受器和脉络膜毛细血管网络之间, 功能多样, 在促进视网膜及其光感受器的功能中起着多种作用^[1], 成熟 RPE 细胞不具再生能力, RPE 细胞的坏死、凋亡等功能异常是引起视网膜变性疾病的主要原因。视网膜变性类疾病主要包括年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD)、视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP)、视网膜劈裂症、视网膜脱落、黄斑水肿、视网膜黄斑衰退症、遗传性黄斑营养不良等, 临床上前两者较普遍^[2]。ARMD 是老年人致盲最主要的原因, 此病的发病率日益增多, 60 岁以上人群发病率达 1/10, 成为眼科防盲研究的重点课题。RP 是一组以进行性光感细胞及色素上皮功能丧失为共同表现的遗传性疾病, 是遗传性视觉损害和失明的最常见原因。目前这类疾病在临床上以支持疗法为主, 仍无有效延缓或逆转病程的方法。胚胎干细胞 (ESCs) 是从胎儿组织中的原始生殖细胞或哺乳动物囊

胚内层细胞群或经体外分离,抑制分化培养得到的能无限增生、自我更新及具备多向分化潜能的细胞。应用具有无限种子细胞资源的 ESCs 诱导分化出的 RPE 细胞,进行体内细胞移植治疗,可补充损伤的视网膜色素上皮细胞,恢复视网膜功能,有望为临床治疗视网膜变性疾病带来希望。目前对于 ESCs 治疗视网膜变性疾病的研究较多,培养分化方法不断创新,本文旨在收集 ESCs 诱导分化 RPE 的培养方法,归纳总结从不同角度作出综述。胚眼发育时,细胞具高度可塑性,易被周围因素影响,在各种信号分子的诱导下,激活细胞内信号通路,使视泡背侧前体细胞朝着 RPE 细胞定向分化^[3],干细胞向体细胞的诱导分化需精准时空调节,RPE 的形成与诱导中重要信号通路的正确表达密切相关^[4]。

1 细胞因子诱导法

将可影响干细胞分化为 RPE 细胞的细胞因子(小分子化合物)加至培养基,在 ESCs 不同分化阶段选择性激活或抑制特异性通路^[5],显著缩短分化时间,提高分化效率,由于无生物源性可避免种间污染和免疫排斥反应^[6]。

1.1 肝细胞生长因子 含肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)的人间充质干细胞的条件培养基在体外促进 RPE 细胞分化与 RPE 细胞作为细胞片层的增殖,显著诱导干细胞向视神经细胞分化。分化细胞显著表达 RPE 标志物 RAX、PAX6、LHX2 和 SIX3^[7]。HGF 具有一定诱导作用,但不能使干细胞彻底分化至 RPE,HGF 对于干细胞早期向视神经细胞或 RPE 分化起到导向。HGF 在体内是 hESCs-RPE 细胞正常发育的必要因素,HGF 在体外对 hESCs-RPE 细胞的增殖起促进作用,对于分化的促进没有增殖作用明显。

1.2 激活素 A 激活素 A(Activin A)作为信号分子,系生长因子(transforming growth factor β ,TGF- β)超家族成员。在分化的 1~7d 加入 Activin A,可显著提高 hESCs 分化为 RPE 的效率,较自发分化所产生的色素集落的数目更多且集落更大^[8],在第 50d,黑色素灶比率可高达 50.7%。流式分析表明得到的 RPE 能高表达 RPE 标记物 MITF 和 RPE65。荧光免疫染色检测 RPE 能表达早期发育的 OTX2 蛋白以及特有 BETS1 蛋白^[9]。采用 PCR 检测 RPE 标记基因,与成熟 RPE 表达水平相似^[10],Activin A 影响 RPE 的自分泌和旁分泌过程,控制胚眼发育过程中细胞增殖与分化^[11]。Activin A 还能增强另一种细胞因子烟酰胺(nicotinamide,NIC)诱导分化 RPE 的作用^[12]。除此之外,又可通过特定的信号通路调节 RPE 迁移^[13]。

1.3 姜黄素 诱导第 14d 加入姜黄素处理 24h,促进细胞增殖并使 RPE 细胞中的活性氧减少^[14],诱导第 3wk 便出现肉眼可见的黑色素细胞,第 5wk 可见大量团块色素细胞。姜黄素法的细胞色素化的时间、色素化细胞的比例和成熟 RPE 细胞标志物 ZO-1、MITF、Pax 6 的表达明显优于空白对照组^[15]。机制在于姜黄素刺激 Wnt/ β -catenin 信号通路,使 Wnt 通路下游靶因子、受体和配体表达明显升高。

1.4 丝蛋白丝胶 丝蛋白丝胶通过刺激 NF- κ B 信号通路上调 RPE 相关转录产物促进黑色素生成,可替代血清,显著降低感染的风险。用含 1%丝蛋白丝胶的 DMEM 培养

基分化 12d 后即可产生色素,细胞密度与存活率更高,细胞死亡率更小,全流程中均可观察到 I 期~IV 期的黑色素体。经检验 RPE 相关转录产物(RPE65 和 CRALBP)及相关蛋白(RPE65 和黑色素)水平升高^[16]。

2 二维和三维诱导分化法

ESCs 培养基除去碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF),并去除小鼠胚胎成纤维细胞饲养层,ESCs 可自发向 RPE 细胞分化,包括二维诱导和三维诱导,其中二维诱导包括连续贴壁培养和形成拟胚体继续贴壁培养^[17]。

2.1 二维分化法

2.1.1 连续贴壁培养 连续贴壁培养使 hESCs 在去 bFGF 培养基自发分化形成 RPE 细胞,人工分离色素继续贴壁培养,细胞逐渐融合扩大成肉眼可见色素灶,从去除 bFGF 算起到色素灶可见需 1~8wk^[17]。纯化 hESCs-RPE 细胞有两种方法:机械切割法和酶消化分离法,前者是当色素灶扩大至直径 1mm 时,用 25G 眼科手术刀切割色素,消化分离,接种于培养皿中继续培养;后者通过两步连续的胰酶消化以分离纯化 RPE 细胞,将第二次消化的 RPE 细胞接种于培养皿中继续培养^[18-20]。

2.1.2 形成拟胚体 将 hESCs 在悬浮培养基中培养成拟胚体在无饲养层基质包被的去 bFGF 的培养基连续贴壁培养,直至形成色素灶^[21-27]。当扩大到能手动分离色素灶时再于培养皿中培养。悬浮培养需 1~3wk,开始培养到色素灶肉眼可见需 4~8wk^[28-32]。

2.2 三维分化法 hESCs 在无血清或生长因子降低的培养基中悬浮培养,或在无血清培养体系中快速聚集成拟胚体,hESCs 可以自发形成连续的神经上皮空泡,继而形成含色素的 RPE 细胞层^[33-34]。三维法除可有效诱导 hESCs 分化为视网膜前体细胞和似胚胎视杯的杯状构造物外,所产生的视杯具有正常的 RPE 结构。第 20d 出现色素灶,待其进一步扩大至能人工分离,用上述纯化法将色素灶挑出,连续贴壁培养。在分化中可观察到连续的神经上皮样结构、视杯等。

2.3 二维诱导法与三维诱导法比较 二维的诱导方法不能模拟体内胚胎发育过程,但三维诱导经历视杯结构,更接近原代分离的 RPE 细胞。二维和三维培养的 RPE 样细胞均可检出 BEST1+、CRALBP+、RPE65+、PDEF+ 等 RPE 标志物^[33-34],当细胞不断分化,上述物质表达上调,但三维培养的细胞表达均低于同时期二维培养的表达水平,并且差距逐渐缩小,说明三维诱导的细胞比二维诱导细胞更幼稚^[35]。三维诱导的 RPE 与二维相比,色素灶出现晚,色素更少和但寿命更长。

3 共培养法

3.1 细胞共培养技术 此技术是在同一种环境下,共同培养 2 种或 2 种以上的细胞,因可更好地模拟体内环境,被广泛应用。诱导过程中,若将 ESCs 与原代成体视网膜细胞或胚胎期未成熟的视网膜前体细胞共培养,则会增加分化效率。

3.2 细胞外基质与邻近细胞影响分化 将 hESCs 于小鼠 PA6 基质细胞上培养 2wk 可获得神经前体细胞^[36],再接种到人布鲁赫膜或基质胶上进行 RPE 诱导分化。接种

前, hESCs 表达高干细胞标志物 OCT3/4、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81; 在 PA6 细胞上培养后, 形成色素灶并表达 β -微管蛋白 III 神经前体标志物; 接种在基质胶上的神经前体细胞, 21d 时高表达 RPE 标记物 ZO-1; 接种在布鲁赫膜上的神经前体细胞 15d 出现色素细胞, 高表达 RPE 标记蛋白。综上, 邻近细胞或细胞外基质能够沿光感受器或 RPE 前体细胞系诱导 hESCs, 使分化后的前体细胞群体富集。

3.3 人视网膜微血管内皮细胞影响分化 将 hESCs-RPE 细胞与人血管内皮细胞共培养 6wk。结果表明, RPE 特异标记物 ZO-1 在单独培养和共培养中的表达无统计学差异; 共培养对 RPE 细胞的形态和色素沉着未产生显著影响, 然而诱导分化得到的 RPE 细胞在屏障特性以及刷状缘方面的差异具有细胞系特异性^[37]。

3.4 单核细胞以及血清影响分化 将 RPE 细胞与不同浓度血清及不同数量单核细胞共培养^[38-40]。结果表明单核细胞和血清均对 RPE 细胞的生长分化有明显促进作用, 二者具有协同作用。

若共培养的对象不同, 诱导分化的结果不同。但均能获得相应的 RPE 细胞。共培养模拟体内视网膜细胞生长环境, 在外部环境中建立适合细胞定向分化的条件而影响 ESCs 分化, 但分化效率较低, 约为传统培养的 30%。

4 生物支架包埋法

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在体外对视网膜发育十分重要, RPE 外环境改变如 ECM 的变化将对细胞发育产生影响。然而生物支架则模拟天然 ECM, 包裹并支撑活细胞, 具备可加工性、坚固性、相容性、可降解性等优点, 使得 RPE 细胞在植入时较少诱导免疫反应。所以运用合适生物材料及细胞载体支架, 模拟 RPE 细胞在体内发育环境, 形成基于视网膜组织工程的治疗方案具有良好前景。

4.1 海藻酸盐水凝胶包埋法 运用不同的水凝胶 (0.5% 海藻酸钠、1% 海藻酸钠、明胶水凝胶) 包埋 hESCs 制备拟胚体。证明 0.5% 和 1% 海藻酸钠均能促进 hESCs 向 RPE 分化, 与对照组相比, 含 RPE 和视囊泡的拟胚体总数显著增加。但明胶水凝胶组的拟胚体总数改变不明显。所以诱导能力方面, 海藻酸钠优于明胶水凝胶^[41]。姜黄素/海藻酸钠凝胶共同包埋与纯水凝胶相比, 生物相容性好, 细胞生长能力增强, ECM 形成率高, 视网膜功能基因上调, 细胞增殖率比纯水凝胶法提高 28%^[42]。综上, 提高效率首选姜黄素/海藻酸钠凝胶共同包埋法。

4.2 纤维蛋白凝胶包埋法 纤维蛋白水凝胶作为 RPE 移植的支撑材料, 使 RPE 保持活性, 生成具有特征鹅卵石外观和深色的单层膜, RPE 的 mRNA 和蛋白标记物高表达。分化后期加入纤溶酶即可迅速降解纤维蛋白支持物, 获得完整的 RPE 单层。该操作方便并且不良反应少^[43]。

4.3 聚乙二醇/gellan 凝胶包埋法 gellan 凝胶具有良好生物学性状但作为物理凝胶太脆弱, 故与聚乙二醇结合起来, 从而具备更好的生物相容性、细胞粘附性和细胞生长能力。结果表明细胞在培养全过程中表现出更强的生长分化能力, RPE 标记基因的表达也受到正向影响, 最终促进视网膜再生。综上, 聚乙二醇/gellan 凝胶可作为视网

膜再生的替代物^[44]。

5 小结与展望

诱导分化技术不断成熟, 但如何同时解决效率、周期、成本的问题仍为目前的争议。自发诱导法费时长且耗资源。二维培养法不能模拟体内胚胎发育过程, 但三维法能在体外使细胞历经视杯结构发育过程, 从而得到更接近原代分离 RPE 细胞, 不过色素灶出现的更晚并且数量减少。细胞因子法直接作用于视网膜细胞分化的信号通路显著提高分化效率并缩短培养时间, 但步骤繁琐成本高, 培养需要多次手工传代, 致细胞老化。共培养法模拟体内视网膜细胞生长环境, 创造分化环境影响 ESCs 的分化, 优化培养质量, 但效率则明显下降。

如今, 针对视网膜变性疾病多是对症治疗, 神经细胞保护药物以及营养支持用以延缓病程进展, 治疗并发症, 但无法修复已受损的 RPE 细胞等, 干细胞移植则将特定功能细胞整合入视网膜, 重建患者视功能, 随着干细胞分化培养及移植治疗的新策略不断涌现, 该方法取得的成果给广大患者带来了重见光明的希望。但目前的研究仍存在许多争议待解决, 分化的具体流程能否做到在保证质量与效率的条件下精确至以天为时间单位指导操作步骤; 是否需要精确标准来评估细胞功能及免疫排斥问题; 胚胎干细胞源自胚胎, 相关治疗时必然会涉及道德、伦理甚至政治问题; 不同干细胞系来源的视网膜细胞存在基因组或表观遗传学差异, 导致干细胞源性 RPE 细胞移植的长久有效安全性尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol Rev* 2005;85(3):845-881
- 2 Sowden JC. ESC-derived retinal pigmented epithelial cell transplants in patients; so far, so good. *Cell Stem Cell* 2014;15(5):537-538
- 3 Zhang Y, Peng SM. Recent advances of morphogenesis and development in retinal pigment epithelium. *Int J Ophthalmol* 2014;14(3):464-467
- 4 Armstrong L. Epigenetic Control of Embryonic Stem Cell Differentiation. *Stem Cell Rev Rep* 2012;8(1):67-77
- 5 赵永吉, 庞丽. 胚胎干细胞诱导分化视网膜细胞的方法新进展. *中华实验眼科杂志* 2016;34(9):851-854
- 6 Dang Y, Zhang C, Zhu Y. Stem cell therapies for age-related macular degeneration; the past, present, and future. *Clin Interv Aging* 2015;10:255-264
- 7 Li RR, Chen HW, Chen DL, et al. Hepatocyte Growth Factor Promotes the Proliferation of the Neural Progenitors Derived from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells. *Zoological Res* 2008;29(5):518-528
- 8 Westenskow P, Sedillo Z, Barnett A, et al. Efficient derivation of retinal pigment epithelium cells from stem cells. *J Vis Exp* 2015;97:52214
- 9 李奇, 王磊, 祝贺, 等. 激活素 A 促进人胚胎干细胞定向分化为视网膜色素上皮细胞. *科学通报* 2016;61(16):1816-1821
- 10 Choudhary P, Heather B, Gutteridge A, et al. Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage. *Stem Cells Transl Med* 2017;6(2):490-501
- 11 Fuhrmann S, Levine EM, Reh TA. Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* 2000;127(21):4599-4609
- 12 曾玉晓. 二维和三维诱导的人胚胎干细胞来源 RPE 细胞的生物学特性比较研究. 第三军医大学 2016

13 Mitsuhiro MRKH, Eguchi S, Yamashita H. Regulation mechanisms of retinal pigment epithelial cell migration by the TGF- β superfamily. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81(6):630-638

14 Mujoo K, Nikonoff LE, Sharin VG, et al. Curcumin induces differentiation of embryonic stem cells through possible modulation of nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Protein Cell* 2012;3(7):535-544

15 殷秋菊, 吴一湘, 于莉, 等. 姜黄素对人胚胎干细胞向视网膜色素上皮样细胞定向诱导效率的促进作用. *中华实验眼科杂志* 2015;33(9):780

16 Eidet JR, Reppe S, Pasovic L, et al. The Silk-protein Sericin Induces Rapid Melanization of Cultured Primary Human Retinal Pigment Epithelial Cells by Activating the NF- κ B Pathway. *Sci Rep* 2016;6:22671

17 Leach LL, Clegg DO. Concise Review; Making Stem Cells Retinal; Methods for Deriving Retinal Pigment Epithelium and Implications for Patients With Ocular Disease. *Stem cells* 2015;33(8):2363-2373

18 Wu W, Zeng YX, Li ZY, et al. Features specific to retinal pigment epithelium cells derived from three-dimensional human embryonic stem cell cultures—a new donor for cell therapy. *Oncotarget* 2016;7(16):22819-22833

19 Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, et al. Derivation of Functional Retinal Pigmented Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 2009;27(10):2427-2434

20 Carr AJ, Vugler AA, Hikita ST, et al. Protective Effects of Human iPS-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Transplantation in the Retinal Dystrophic Rat. *PLoS One* 2009;4(12):e8152

21 Klimanskaya I, Hipp J, Rezaei KA, et al. Derivation and Comparative Assessment of Retinal Pigment Epithelium from Human Embryonic Stem Cells Using Transcriptomics. *Cloning Stem Cells* 2004;6(3):217-245

22 M'Barek KB. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci Transl Med* 2017;9(421):7471

23 Rowland TJ, Buchholz DE, Clegg DO. Pluripotent human stem cells for the treatment of retinal disease. *J Cell Physiol* 2012;227(2):457-466

24 Regent F, Morizur L, Lesueur L, et al. Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions. *Sci Rep* 2019;9(1):10646

25 Ferguson LR, Balaiya S, Mynampati BK, et al. Deprivation of bFGF Promotes Spontaneous Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Stem Cells* 2015;10(3):159-170

26 Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, et al. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* 2013;140(12):2576-2585

27 M'Barek KB, Monville C. Cell Therapy for Retinal Dystrophies; From Cell Suspension Formulation to Complex Retinal Tissue Bioengineering. *Stem cells Int* 2019;2019:4568979

28 Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* 2006;8(3):189-199

29 Carr Amanda-Jayne F, Smart Matthew JK, Ramsden Conor M, et al.

Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration. *Trends Neurosci* 2013;36(7):385-395

30 Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G. Embryonic stem cell trials for macular degeneration; a preliminary report. *Lancet* 2012;379(9817):713-720

31 Zahabi A, Shahbazi E, Ahmadi H, et al. A New Efficient Protocol for Directed Differentiation of Retinal Pigmented Epithelial Cells from Normal and Retinal Disease Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2012;21(12):2262-2272

32 Zhu DH, Deng XM, Christine S. Polarized secretion of PEDF from human embryonic stem cell-derived RPE promotes retinal progenitor cell survival. *Invest Ophthalmol Sci* 2011;52(3):1573-1585

33 Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 2011;472(7341):51-56

34 Nakano T, Ando S. Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs. *Cell Stem Cell* 2012;10(6):771-785

35 Carr AJ, Smart MJ, Ramsden CM, et al. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration. *Trends Neurosci* 2013;36(7):385-395

36 Gong J, Sagiv O, Cai H, et al. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res* 2008;86(6):957-965

37 Skottman H, Muranen J. Contacting co-culture of human retinal microvascular endothelial cells alters barrier function of human embryonic stem cell derived retinal pigment epithelial cells. *Exper Cell Res* 2017;359(1):101-111

38 Matsumoto M, Takagi H, Yoshimura N. Synergistic suppression of retinal pigment epithelial cell proliferation in culture by radiation and hyperthermia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(6):2068

39 Burke JM. Stimulation of DNA synthesis in human and bovine RPE by peptide growth factors; the response to TNF- α and EGF is dependent upon culture density. *Curr Eye Res* 1989;8(12):1279-1286

40 Leschey KH, Hackett SF, Singer JH, et al. Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(5):839-846

41 Park JH, Shin EY, Shin ME, et al. Enhanced retinal pigment epithelium (RPE) regeneration using curcumin/alginate hydrogels; *In vitro* evaluation. *Int J Biol Macromol* 2018;117:546-552

42 Nicola H. 3D culture of human pluripotent stem cells in RGD-alginate hydrogel improves retinal tissue development. *Acta Biomater* 2017;49:329-343

43 Gandhi JK, Manzar Z. Fibrin hydrogels as a xenofree and rapidly degradable support for transplantation of retinal pigment epithelium monolayers. *Acta Biomater* 2018;67:134-146

44 Kim HS, Kim D, Jeong YW, et al. Engineering retinal pigment epithelial cells regeneration for transplantation in regenerative medicine using PEG/Gellan gum hydrogels. *Int J Bio Macromol* 2019;130:220-228