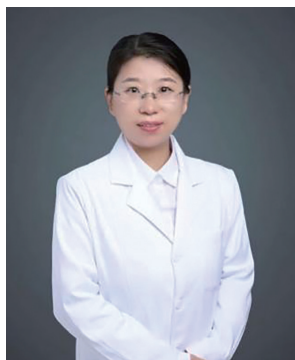




朱莉莉, 上海交通大学医学院松江研究院研究员, 博士生导师。山东大学生物学学士, 中国科学院健康科学研究所干细胞与发育生物学博士, 英国纽卡斯尔大学和加州大学旧金山分校(UCSF, Gladstone Institutes)博士后。2022年11月加入上海交通大学医学院松江研究院任课题组长, 主要以多能干细胞和类器官为工具研究视网膜的发育, 疾病机制与干预策略。研究成果以第一作者(含共同)/通信作者身份发表在*Cell Stem Cell*、*Circulation*、*Nat Commun*、*JCB*、*EMBO Rep*、*NRR*等国际重要学术刊物上, 于2020年获得国际干细胞协会颁发的Award for Scientific Excellence等奖项。主持包括教育部人才项目基金、国家自然科学基金、上海市自然科学基金等多个科研项目。



赵永旺, 上海交通大学医学院附属松江医院眼科主任、教研室主任, 医学博士, 主任医师、硕士研究生导师。上海市第四届区域名医, 上海市松江工匠。主要研究方向: 眼底视神经保护。在*NRR*等杂志发表论文多篇, 主编和参编眼科著作8部, 获国家实用新型专利2项, 获省、市科技成果奖11项。主持/指导上海市及松江区科委课题9项。



包维莺, 上海交通大学医学院附属松江医院血液科主任, 主任医师, 硕士研究生, 现担任上海市医师协会血液分会委员、中国老年学和老年医学学会老年病学分会委员、中国民族医药学会血液病分会理事、上海市中西医结合学会血液病专业委员会、上海市医学会专科分会白血病组组长、上海骨髓增殖性肿瘤工作组成员等学术职务。曾先后获得松江区科技进步奖3项, 主持参与松江区科委课题10余项, 以第一作者或通信作者身份发表SCI及中文论文20余篇, 担任主编及副主编出版书籍2部。

收稿日期: 2025-06-06

接受日期: 2025-07-31

国家自然科学基金(批准号: 82301216)和上海市自然科学基金(批准号: STCSM23ZR1457500)资助的课题

\*通信作者。Tel: 021-67722370, E-mail: bwy-jerry@163.com; zywang1@126.com; lili.zhu@shsmu.edu.cn

Received: June 6, 2025

Accepted: July 31, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82301216) and the Natural Science Foundation of Shanghai (Grant No.STCSM23ZR1457500)

\*Corresponding authors. Tel: +86-21-67722370, E-mail: bwy-jerry@163.com; zywang1@126.com; lili.zhu@shsmu.edu.cn

# 视网膜类器官构建、应用与研究进展

张于鸿<sup>1,2</sup> 金士博<sup>2</sup> 李岩<sup>3,4,5</sup> 包维莺<sup>6\*</sup> 赵永旺<sup>1\*</sup> 朱莉莉<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>上海交通大学医学院附属松江医院眼科, 上海 201600; <sup>2</sup>上海交通大学医学院松江研究院, 上海 201600;

<sup>3</sup>上海市情感与情感障碍重点实验室, 上海 201600; <sup>4</sup>上海交通大学医学院基础医学院解剖学与生理学系, 上海 201600;

<sup>5</sup>上海交通大学医学院附属松江医院妇产科, 上海 201600; <sup>6</sup>上海交通大学医学院附属松江医院血液科, 上海 201600)

**摘要** 视网膜类器官是通过干细胞技术构建的三维体外模型, 能够模拟人类视网膜的结构和功能。随着干细胞技术、基因编辑技术和多组学分析等方法进步, 视网膜类器官在发育生物学、疾病建模、药物筛选和个性化医疗等领域展现出巨大潜力。随着技术的不断突破, 视网膜类器官必将发挥更加重要的作用, 为视网膜相关疾病的治疗带来新的希望。该文将结合最新研究进展, 对视网膜类器官的分化过程及方法、在疾病研究中的应用等方面进行综述, 并探讨其未来发展方向和面临的挑战。

**关键词** 视网膜类器官; 视网膜疾病; 多能干细胞; 视网膜色素上皮细胞

## Construction, Applications and Research Advances in Retinal Organoids

ZHANG Yuhong<sup>1,2</sup>, JIN Shibo<sup>2</sup>, LI Yan<sup>3,4,5</sup>, BAO Weiying<sup>6\*</sup>, ZHAO Yongwang<sup>1\*</sup>, ZHU Lili<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Songjiang Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201600, China; <sup>2</sup>Songjiang Research Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201600, China;

<sup>3</sup>Shanghai Key Laboratory of Emotions and Affective Disorders, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201600, China; <sup>4</sup>Department of Anatomy and Physiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201600, China;

<sup>5</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Songjiang Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201600, China; <sup>6</sup>Department of Hematology,

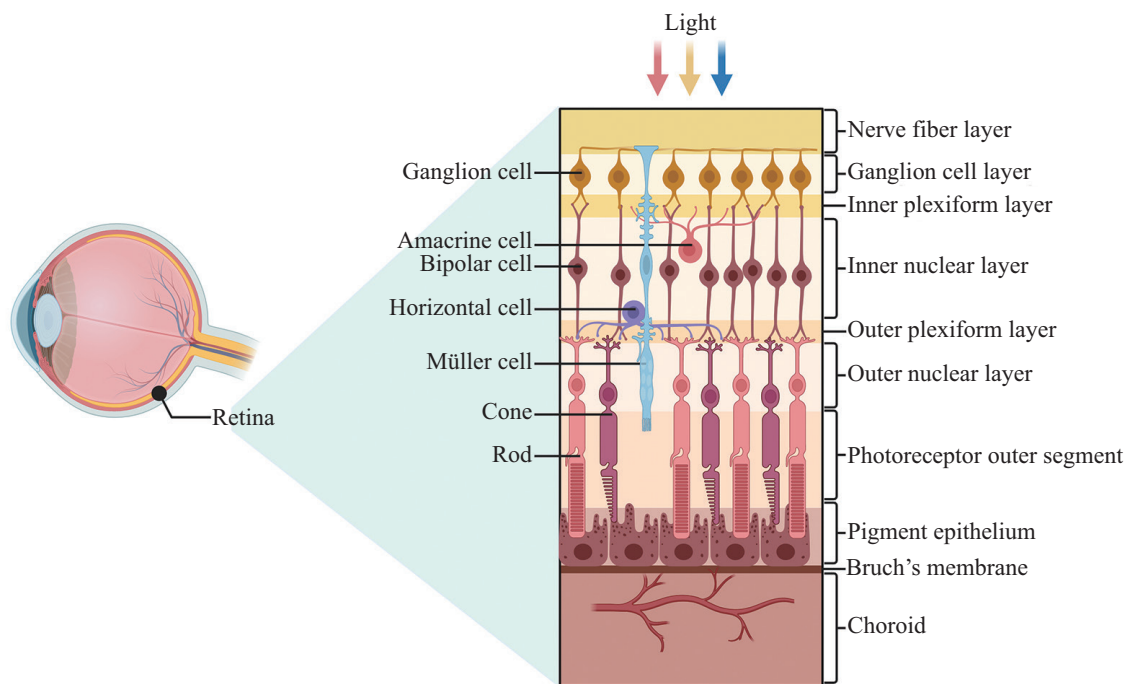
Songjiang Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201600, China)

**Abstract** Retinal organoids, as three-dimensional *in vitro* models derived from stem cell technology, can faithfully recapitulate the structural and functional characteristics of the human retina. Recent advancements in stem cell technology, gene editing, and multi-omics analytical approaches have significantly expanded their applications in developmental biology, disease modeling, drug screening, and personalized medicine. With continuous technological breakthroughs, retinal organoids are poised to play an increasingly pivotal role in advancing novel therapeutic strategies for retinal disorders. This review systematically summarizes the latest research progress, focusing on differentiation protocols and methodologies of retinal organoids, their applications in disease research, while also discussing future directions and existing challenges in this rapidly evolving field.

**Keywords** retinal organoids; retinal disease; pluripotent stem cells; RPE (retinal pigment epithelium)

视网膜是衬在眼球内壁的一层敏感神经组织, 在人类的视觉感知中起着极其重要的作用, 其高度有序的组织结构和复杂的细胞网络共同完成光信号捕获、转换及神经信息处理等过程(图1)<sup>[1]</sup>。视网膜包含多种类型的细胞, 这些细胞通过一个复杂的神经网络相互连接, 例如视杆细胞和视锥细胞, 它们可以感知光刺激并将其转化为神经冲动, 然后传递到

大脑的视觉皮层, 进而产生视觉感知; 视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)将整合后的动作电位经视神经传至中枢; 贯穿全层的Müller胶质细胞(Müller glial cells, MG)通过K<sup>+</sup>缓冲、乳酸代谢与血-视网膜屏障维持微环境(表1)<sup>[2-3]</sup>。由于视网膜的结构和功能高度特化, 它对缺氧、代谢紊乱以及遗传变异非常敏感, 因此成为多种致盲性眼病的常见发病



视网膜的基本细胞类型包括神经节细胞、无长突细胞、双极细胞、水平细胞、穆勒细胞、视锥细胞、视杆细胞等。基本结构包括神经纤维层、神经节层、内丛状层、内核层、外丛状层、外核层、感光细胞外段、视网膜色素上皮层、布鲁赫膜、脉络膜等。  
The basic cell types of the retina include ganglion cells, amacrine cells, bipolar cells, horizontal cells, Müller cells, cones, and rods. The basic structures include the nerve fiber layer, ganglion cell layer, inner plexiform layer, inner nuclear layer, outer plexiform layer, outer nuclear layer, photoreceptor outer segment, retinal pigment epithelium, bruch's membrane, and choroid.

图1 视网膜的细胞构成与结构(该图在BioRender.com绘制)

Fig.1 Cellular composition and structure of the retina (this figure was created in BioRender.com)

表1 视网膜主要细胞类型及其功能

Table 1 Major retinal cell types and their physiological functions

| 细胞类型<br>Cell type          | 位置<br>Location                                         | 主要功能<br>Functions                                                                                              | 损伤相关疾病<br>Disease associations                                  | 参考文献<br>References |
|----------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|
| Photoreceptors             | ONL (outer nuclear layer)                              | Rods: mediate scotopic vision<br>Cones: responsible for photopic vision, color discrimination, and high acuity | Retinitis pigmentosa, achromatopsia, leber congenital amaurosis | [7-8]              |
| Bipolar cells              | INL (inner nuclear layer)                              | Relay visual signals vertically from photoreceptors to ganglion cells                                          | Congenital stationary night blindness                           | [9]                |
| Horizontal cells           | OPL (outer plexiform layer)                            | Transfer of information from photoreceptors to bipolar cells                                                   | Early-stage glaucoma (reduced contrast sensitivity)             | [10]               |
| Amacrine cells             | IPL (inner plexiform layer)                            | Temporal signal processing                                                                                     | Visual deficits in Parkinson's disease                          | [11-12]            |
| Retinal ganglion cells     | GCL (ganglion cell layer)                              | Output neurons of the retina:transmit processed visual information to the brain via the optic nerve            | Glaucoma, optic neuritis                                        | [12-13]            |
| Müller glia                | Spanning retinal layers (primarily INL)                | Maintaining retinal homeostasis and integrity                                                                  | Diabetic retinopathy                                            | [14-15]            |
| Retinal pigment epithelium | Outer retinal layer (attaches to the bruch's membrane) | Phagocytosis of photoreceptor outer segments, visual cycle, outer blood-retinal barrier                        | Age-related macular degeneration, stargardt disease             | [16]               |

部位<sup>[4-5]</sup>。这些疾病是全球范围内导致不可逆失明的主要原因, 包括年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变以及遗传性视网膜疾病等, 目前已知超过200

个基因的突变可以引起遗传性视网膜疾病和黄斑变性<sup>[6]</sup>。

在视网膜疾病的临床前研究中, 传统的二维

(2D)细胞培养体系和动物实验模型存在明显的局限性。2D培养系统难以模拟体内复杂的微环境,主要表现为细胞类型单一、组织结构缺失以及机械和生化信号转导异常<sup>[17-18]</sup>。动物模型在视网膜疾病研究中也发挥着不可替代的作用,然而物种间固有的生物学差异导致研究结果与临床实际存在显著差距。这种差异主要体现在以下几个方面。第一个方面体现在解剖学与功能学局限性上,啮齿类动物模型与人类视网膜结构上存在本质差异,最显著的是缺乏人类特有的黄斑区结构,这一差异导致动物模型难以准确模拟人类视锥细胞介导的高分辨率视觉和色觉功能<sup>[19]</sup>。此外,小鼠等模式动物的视网膜血管系统相对简单,难以完全模拟人类糖尿病视网膜病变中观察到的复杂微血管异常<sup>[20]</sup>。第二个方面体现在疾病进程与病理特征的差异性上,在遗传性视网膜疾病研究中发现,小鼠*RPR65*基因突变导致的视网膜变性进程明显慢于人类*RPE65*基因突变引起的Leber先天性黑矇<sup>[21]</sup>。同样,由*ABCA4*基因突变引起的Stargardt病在小鼠模型中仅能部分再现人类患者特征性的脂褐素沉积模式<sup>[22]</sup>。第三个方面体现在免疫调控机制的差异上,视网膜免疫微环境存在显著物种差异,例如人类小胶质细胞与神经元互作的独特动态特征在啮齿类模型中难以重现,制约炎症性眼病研究<sup>[23]</sup>。同时,不同物种在治疗反应评估上也存在一定偏差,人类视网膜的内界膜厚、Müller胶质细胞终足致密,显著阻碍腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)从玻璃体腔向视网膜深层的扩散,而小鼠相对通透,使得AAV更容易到达光感受器,非人灵长类的内界膜结构特性介于人类和小鼠之间,导致其AAV转导效率高于人类但低于啮齿类模型<sup>[24-25]</sup>。

近年来,构建具有高度生理相关性的视网膜疾病模型已成为眼科学研究的重点发展方向。其中,基于诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)技术的视网膜类器官(retinal organoids, ROs)因其独特的优势而备受关注,它不仅能够精确模拟视网膜的发育轨迹,还能重现其复杂的细胞组成和功能性特征,已成为该领域最具潜力的研究工具之一<sup>[26]</sup>。

iPSCs分化具有两个显著特征:其一,这类细胞具有无限增殖和自我更新的能力;其二,它们保持着多向分化的潜能。相较于胚胎干细胞,人类iPSCs来

源于自体细胞,既保留了供体的完整基因组信息,又避免了伦理争议和潜在的免疫排斥问题<sup>[27]</sup>。通过体细胞重编程技术获得患者特异性iPSCs,为获取特定疾病相关的细胞类型提供了全新途径。在特定诱导条件下,这些多能干细胞能够定向分化为目标细胞群体。

在视网膜研究领域,iPSCs来源的视网膜类器官展现出显著优势。这类三维培养体系能够自发分化为视网膜的所有主要细胞类型,并形成具有典型层状结构的神经组织。这种特性使其成为研究视网膜发育调控机制、探索疾病病理过程以及进行药物筛选的理想体外模型。特别值得注意的是,通过整合生物力学刺激和生化微环境调控技术,研究人员能够进一步优化类器官培养体系,使其更准确地模拟体内视网膜的生理和病理状态,从而显著提升实验数据的临床相关性<sup>[28-29]</sup>。

本文系统梳理了iPSCs来源视网膜类器官的最新研究进展,重点分析了其分化策略及其优化方案、作为疾病模型的优势与局限性,并对该技术在基础研究和临床转化中的应用前景及现存挑战进行了深入探讨。通过该综述,我们期望为相关领域的研究者提供有价值的参考。

## 1 基于人类iPSCs的视网膜类器官分化过程

人类iPSCs向视网膜类器官的分化是近年来再生医学和视网膜疾病研究中的一个重要领域,该技术通过模拟胚胎视网膜发育的时空动态过程,为揭示视网膜病理机制和开发创新疗法提供了重要平台。在生理条件下,视网膜的发育遵循严格的时空调控程序,涉及多层次的细胞命运决定和精密的微环境调控<sup>[30]</sup>,这一过程依赖于细胞间的直接相互作用和旁分泌信号网络的协同调控<sup>[31-32]</sup>。为在体外重现这一复杂的生物学过程,研究人员需要设计包含时序性外源因子刺激的培养体系,以引导胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)或iPSCs逐步分化为功能性的视网膜细胞<sup>[33-34]</sup>。视网膜类器官的分化是一个多阶段的精确调控过程,该过程通常分为以下几个关键阶段。

### 1.1 iPSCs的制备

iPSCs的制备通常采用体细胞重编程技术,该过程通常以皮肤成纤维细胞或外周血单核细胞等体细胞为起始材料,通过过表达OCT4、SOX2、KLF4和

c-MYC核心多能性转录因子,实现体细胞向多能干细胞的转化<sup>[35-36]</sup>。经重编程获得的iPSCs在特定培养条件下可稳定增殖,并保持分化为三胚层各类细胞的潜能,为后续视网膜类器官的构建提供了理想的细胞来源。

## 1.2 神经外胚层诱导阶段

iPSCs在低附着培养皿中被诱导形成胚胎体(embryoid bodies, EBs),这是细胞分化的起始步骤。胚胎体的形成通过悬浮培养实现,细胞聚集并开始自发分化。随后,胚胎体在特定培养基中培养,以使细胞向神经外胚层方向分化<sup>[37]</sup>。经过2~3天,细胞开始表达神经外胚层标志物,如PAX6<sup>[38]</sup>,标志着视网膜发育的早期阶段。

## 1.3 视网膜祖细胞形成阶段

随后,在含有特定浓度的BMP4等因子的悬浮培养条件下,经过1~2周可检测到CHX10和RX等视网膜祖细胞标志物的表达<sup>[39]</sup>。接下来,细胞在悬浮培养中进一步分化,通过添加视黄酸(retinoic acid)或其他分化因子,逐渐形成包含神经视网膜祖细胞的视杯(optic cup)结构,这是视网膜类器官的雏形<sup>[40]</sup>。视杯结构的形成是视网膜类器官发育的关键步骤,其自组织能力高度模拟了胚胎视网膜的发育过程<sup>[41-42]</sup>。

## 1.4 类器官成熟阶段:

在后续的培养中,视网膜类器官逐渐成熟,形成类似原生视网膜的分层结构。视网膜类器官的功能成熟可通过关键信号分子的时序调控来实现。研究表明,9-顺式视黄酸(9-*cis* retinoic acid, 9-*cis* RA)和甲状腺激素等生物活性分子的阶段性添加,能够显著促进光感受器细胞的分化成熟及其功能性结构的形成<sup>[43]</sup>,这些分子通过激活特定的核受体信号通路,调控光感受器外节的发育和视蛋白的表达,从而确保类器官获得完整的光信号转导能力。最终,成熟的视网膜类器官的光感受器细胞能够生长出外节结构,并在光刺激下产生电生理反应。成熟的类器官包含表达OPN1MW和RHO的光感受器细胞层,其超微结构中可观察到光感受器外节等特征性结构,其中部分类器官同时包含表达MITF和RPE65等视网膜色素上皮层的细胞标志物<sup>[44]</sup>。

综上所述,iPSCs向视网膜类器官的分化过程是一个复杂而精细的过程,涉及细胞命运的多重调控及细胞间的相互作用。这一分化过程模拟了人类视

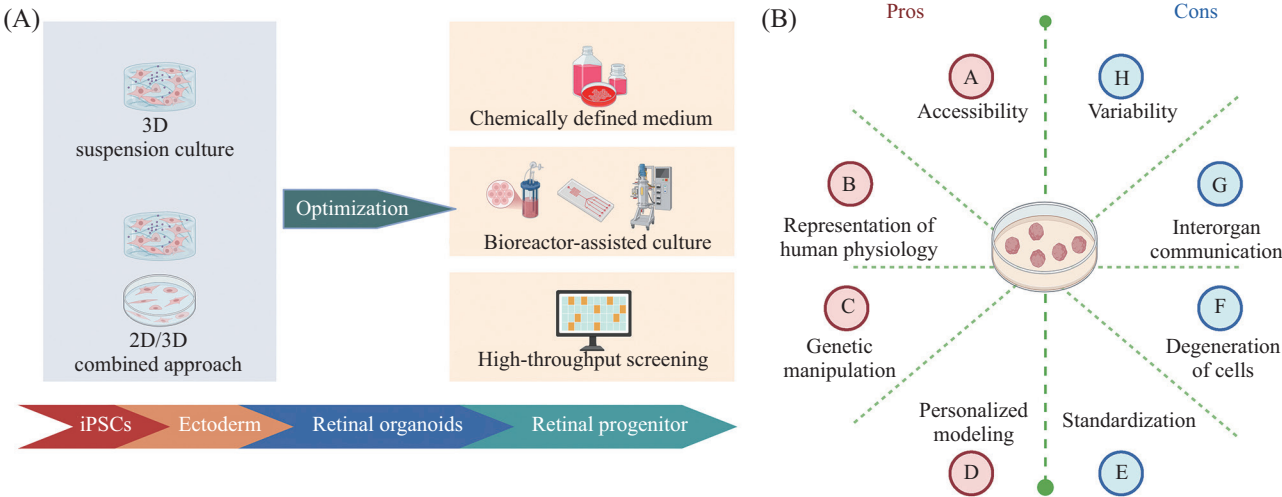
网膜的发育过程,为研究视网膜疾病提供了理想的体外模型,在视网膜疾病模型构建、药物开发、再生医学领域都具有重大意义。例如,BUSKIN等<sup>[45]</sup>将4例PRPF31基因突变相关的视网膜色素变性患者的诱导多能干细胞定向分化为视网膜类器官,以研究PRPF31相关RP的疾病机制,或将其用于高通量药物筛选以寻找潜在的治疗方法<sup>[46]</sup>。

## 2 视网膜类器官分化方案及各自优缺点

ROs作为一种体外模型,能够模拟人类视网膜发育从而研究视网膜相关的疾病机制,为视网膜研究提供了强大的工具。近年来,基于iPSCs的视网膜类器官分化技术取得了显著进展。然而,不同的分化方案在操作复杂性、细胞成熟度和功能化方面存在差异。这些方案包括三维悬浮培养法、二维与三维结合法,以及优化后的化学定义培养基法、生物反应器辅助培养法、基于报告基因的高通量筛选平台等,下面将通过分析这些方法,为研究者根据具体实验需求选择最佳分化方案提供理论依据(图2A)。

### 2.1 三维悬浮培养法(3D suspension culture)

三维悬浮培养法是将iPSCs以单细胞形式在低吸附孔板上悬浮培养,形成类胚体,随后在含基底膜基质(如Matrigel)的培养基中定向分化为视网膜神经上皮的体外培养技术。该技术因其能够模拟胚胎发育过程中的细胞自组织特性,在视网膜类器官构建领域得到了广泛应用。早期研究由日本科学家NAKANO等<sup>[40,42]</sup>将小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)和人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)经过三维悬浮培养结合生长因子成功诱导出具有视杯样结构的视网膜类器官,这一突破性成果不仅证实了三维培养环境下细胞的自组装潜能,更为人类iPSCs的视网膜分化研究奠定了基础。后续研究进一步发现,该技术可支持视网膜边缘区(ciliary margin)干细胞微环境的形成,表明三维悬浮培养法在复杂视网膜组织构建中的独特优势<sup>[47]</sup>。在人类细胞研究中,ZHONG等<sup>[37]</sup>采用该策略成功获得了具有功能性光感受器细胞的三维视网膜组织,并通过电生理检测证实了视网膜类器官的光反应性,进一步证明了三维悬浮培养法在生成功能性视网膜组织方面的有效性。GONZALEZ-CORDERO等<sup>[48]</sup>则通过该方法从人类多能干细胞中



A: 视网膜类器官分化方案及其优化。B: 以视网膜类器官为研究模型的优缺点。  
A: retinal organoid differentiation protocol and its optimization. B: pros and cons of using retinal organoids as a research model.

图2 视网膜类器官的分化及其优缺点(该图在BioRender.com绘制)

Fig.2 Differentiation of retinal organoids and their pros and cons (this figure was created in BioRender.com)

分化出视锥细胞,展示了其在特定视网膜细胞类型生成中的潜力。此外,多项研究优化了培养条件,提高了视网膜类器官的光反应性和分化效率,进一步验证了三维悬浮培养法在视网膜疾病模型构建中的实用价值<sup>[49-50]</sup>。

该技术体系具有操作简便、可规模化培养等显著优点。其通过胚胎体形成模拟天然发育微环境,有利于细胞间通讯和三维结构的自发组装。同时,该方法易于实现标准化操作,适合高通量药物筛选平台的建设。但需注意的是,由于Matrigel等基质材料存在批次差异性,导致分化效率的波动;此外,现有技术条件下获得的类器官在细胞成熟度、功能完整性等方面仍需进一步优化。

2.2 二维与三维结合法(2D/3D combined approach)

二维-三维联合培养是一种整合平面单层培养与三维悬浮培养优势的分化策略。该技术首先在二维条件下诱导iPSCs定向分化为神经外胚层前体细胞,随后将细胞转移至三维悬浮培养体系中,进一步促进视网膜类器官的生成。这种阶段性培养设计更贴近视网膜的生理发育轨迹,有利于获得具有完善分层结构和生理功能的视网膜组织<sup>[29,51-52]</sup>。

通过二维-三维联合培养法,MEYER等<sup>[29]</sup>将人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)成功分化培育出含光感受器前体细胞的视网膜类器官,该分化方案通过阶段特异性信号通路调控结合

化学成分明确的培养基,实现了hPSCs向视网膜类器官的高效定向分化。其中,神经上皮簇的机械分离技术有效提高了组织纯度,而三维悬浮培养系统的长期维持则成功模拟了视网膜的形态发生与细胞谱系特化过程,为研究视网膜发育的分子机制提供了可靠的体外模型。REICHMAN等<sup>[51]</sup>也系统证明了二维与三维结合法在视网膜类器官生成中的可行性,研究团队将iPSCs在二维培养中诱导形成神经外胚层,随后将其转移到悬浮培养中,成功生成了具有分层结构的视网膜类器,这一成果为后续研究奠定了基础。随着技术进步,研究者实现了特定视网膜细胞(如视锥细胞)的定向诱导,并通过培养条件标准化显著提高了类器官发育的同步性和可重复性<sup>[53]</sup>。近年来,单细胞转录组技术的应用进一步证实,该策略产生的类器官在分子水平上高度模拟人视网膜发育的动态过程<sup>[52]</sup>。

二维与三维结合法巧妙地融合了二维培养的精确可控性以及三维培养的复杂性,能够更精准地模拟视网膜的发育过程。该方法不仅促进了细胞间的相互作用,还显著提升了细胞的成熟度和功能化程度,从而使生成的视网膜类器官在结构和功能上更贴近原生视网膜。然而,尽管该方法在模拟视网膜发育方面具有显著优势,但其操作步骤较为繁琐,对技术要求也相对较高。特别是在二维培养向三维培养转换的过程中,需要对培养条件进行精确优化,

以确保细胞能够顺利过渡并保持其分化潜力。这一过程不仅要求实验操作的精细度,还对实验人员的经验提出了较高要求。

### 2.3 视网膜类器官分化方案的优化

近年来,视网膜类器官培养技术已从传统的2D/3D体系发展为更加精细化的分化平台。研究者在培养条件方面实现了重要突破,包括开发微流控动态培养系统以精确调控微环境,采用生物材料支架模拟细胞外基质,以及优化氧张力等关键参数。培养基组分也得到显著改进,无动物源成分的化学限定培养基配合阶段特异性营养配方,显著提升了分化效率。在分化策略上,基因编辑技术的应用使得能够实时监测分化进程,而共培养体系的建立则促进了细胞成熟和功能完善。这些优化使产生的视网膜类器官在细胞组成、组织结构和功能特性等方面更接近天然组织,为视网膜疾病建模、药物筛选和再生医学研究提供了理想平台。未来,自动化培养、血管化策略和器官芯片技术的整合将进一步提升该技术的应用价值。下面将总结类器官分化的常见优化方案。

**2.3.1 化学定义培养基法** 化学定义培养基法(chemically defined medium, CDM)是一种精确控制培养基成分的方法,所有成分均明确且可重复,常用于支持细胞的分化和组织形成。使用低浓度BMP4或9-*cis* RA等化学定义的培养基成分替代Matrigel,诱导iPSCs分化为视网膜类器官<sup>[29,41,53-55]</sup>。

KAYA等<sup>[43]</sup>利用化学定义培养基法从人类iPSCs中生成视网膜类器官,通过添加9-*cis* RA显著加快了光感受器的分化速度,并通过转录组分析建立了分子分期系统,证明了该培养基在提高分化效率和可重复性方面的优势。ELDRED等<sup>[56]</sup>通过化学定义培养基法从人类iPSCs中生成视网膜类器官,并利用甲状腺激素成功诱导了视锥细胞亚型的特异性分化,展示了该培养基在调控视网膜细胞类型分化中的潜力。CAPOWSKI等<sup>[57]</sup>通过化学定义培养基法从多种人类多能干细胞系中生成视网膜类器官,通过标准化培养基成分和操作步骤,显著提高了类器官的可重复性和发育一致性,证明了化学定义培养基在优化视网膜类器官生成中的有效性。

化学定义培养基法在视网膜类器官生成中具有显著优势,避免了Matrigel成分的复杂性和批次间差异,从而显著提高了分化效率和实验的可重复性。

此外,通过添加特定因子,该方法能够加速光感受器的成熟过程。然而,这种方法也存在一些挑战,包括需要对培养基成分和分化条件进行精确控制,以及较高的成本投入,目前大多数报道的化学定义培养体系仍部分依赖重组蛋白或合成基质,真正完全成分明确的视网膜类器官分化方案仍待开发<sup>[58-59]</sup>。未来的研究需要进一步优化生长因子和小分子化合物的组合,以提高在CDM条件下视网膜类器官的分化效率和功能成熟度。

**2.3.2 生物反应器辅助培养法 (bioreactor-assisted culture)** 类器官培养中常用的生物反应器主要包括四大类:旋转壁式生物反应器(rotating wall vessel bioreactor, RWV)、微流控生物反应器(microfluidic bioreactor, MFB)、搅拌式生物反应器(stirred tank bioreactor, STBR)和电刺激生物反应器(electrical stimulation bioreactor, ESB)<sup>[60]</sup>。这些生物反应器通过优化培养条件,显著提升了视网膜类器官的成熟度和功能化水平,尤其在促进光感受器发育方面表现出色<sup>[61]</sup>。

旋转壁式生物反应器通过模拟微重力环境,为视网膜类器官提供了一个动态的三维培养环境。这种设计不仅提高了视网膜类器官的分化效率,还显著增强了其成熟度和功能化程度,使其在疾病建模和再生医学研究中更具应用价值<sup>[58,61-62]</sup>。

微流控生物反应器通过精确调控微尺度下的流体流动和培养环境,为视网膜类器官的发育提供了高度仿生的条件。这种方法有效促进了光感受器的成熟,尽管其应用需要一定的技术基础,但其在视网膜类器官生成中的优势使其成为一种极具潜力的培养技术<sup>[59,63-64]</sup>。

搅拌式生物反应器通过机械搅拌系统实现培养体系的高效混合与氧传递,模拟体内动态微环境,为细胞生长提供仿生条件。这种反应器能够显著提高光感受器的生成效率,并使视网膜类器官在结构和功能上更接近原生视网膜,其提供的动态环境有助于细胞间的相互作用和组织形成<sup>[52]</sup>。

电刺激生物反应器是一种通过施加电场或电流来模拟体内电生理环境的培养系统,这种技术能够促进细胞的分化和成熟,尤其在神经组织和视网膜类器官的生成中表现出显著优势<sup>[65-66]</sup>。

这些生物反应器的使用,不仅优化了视网膜类器官的培养条件,还为相关研究提供了更接近生理

状态的模型,极大地推动了视网膜疾病研究和再生医学的发展。但由于设备成本较高、操作复杂,因此还需要优化生物反应器的设计和培养条件。

**2.3.3 基于报告基因的高通量筛选平台** 报告基因被广泛用于标记视网膜祖细胞或特定视网膜细胞类型。例如,研究人员采用SIX6-GFP报告系统标记视网膜祖细胞,通过定量分析GFP阳性细胞聚集体的比例评估视网膜类器官的分化效率。该方法不仅提高了分化过程的可重复性,还为分化条件的优化提供了直观的量化指标<sup>[67]</sup>。

高通量筛选平台能够同时处理大量样本,显著提高了实验效率。基于报告基因的高通量筛选平台在视网膜类器官分化中的应用,不仅提高了分化效率,还降低了实验差异性。通过引入荧光报告基因,研究者能够快速评估药物对视网膜类器官分化和功能的影响。这种方法为视网膜疾病的药物开发提供了新的工具,该方案适合大规模药物筛选和疾病建模,能够快速评估分化结果和药物效果<sup>[45,68-70]</sup>。

### 3 视网膜类器官诱导过程中面临的挑战

视网膜类器官技术作为研究视网膜发育和视网膜疾病的重要工具,目前已成功实现多种视网膜细胞的三维定向分化。然而,该技术仍存在若干亟待解决的关键问题,例如功能性血管系统和小胶质细胞网络的缺失等,这极大限制了其在血管性视网膜病变及神经炎症性眼病研究中的应用(图2B)。

#### 3.1 视网膜类器官血管化

人类视网膜因其极高的代谢需求,必须依赖完善的血管网络来维持正常生理功能。研究表明,视网膜血管内皮细胞可分泌多种神经营养因子(如BDNF、PEDF)调控神经元发育<sup>[71]</sup>,同时神经元和胶质细胞通过VEGF、PDGF等因子动态调节血管形态和功能,形成双向调控的神经-血管耦合系统<sup>[72]</sup>。现有视网膜类器官模型在模拟这一复杂系统时面临显著挑战。血管网络的缺失不仅制约了类器官的生长潜力和减少了其存活时间,更限制了其在血管相关性眼病研究中的应用价值<sup>[73]</sup>。为突破这一技术瓶颈,研究者在近年来探索了多种创新的血管化策略,旨在构建更接近生理状态的视网膜类器官模型。

**3.1.1 共培养技术** 内皮细胞共培养是目前最直接的血管化方法,通过将视网膜类器官与人脐静脉

内皮细胞或视网膜微血管内皮细胞共同培养,促进血管网络形成。科研人员借助iPSCs,分别培育出ROs和血管类器官(vascular organoids, VO),并通过将VOs来源的细胞与ROs共培养,构建具有血管结构的视网膜类器官(vascularized retinal organoids, vROs),这项研究所构建的vROs改善了传统ROs的性能,解决了部分难题,为后续科研提供了新方向<sup>[74]</sup>。此外,研究发现小胶质细胞缺失会降低Müller细胞成熟度和视网膜内血管密度,为视网膜血管疾病研究提供新思路<sup>[75]</sup>。未来研究需进一步优化共培养系统,提高血管网络的长期功能和生理相关性。

**3.1.2 基因编辑与分子调控** 基因编辑手段为视网膜类器官的血管化提供了另一条可行路径。通过CRISPR-Cas9等技术在hPSCs中让促血管生成基因稳定表达或调控相关抑制基因,可以增强分化得到的视网膜类器官的血管生成能力。例如,AGGF1是一种新型血管生成因子,在内皮细胞中高度表达,并表现出与VEGF相似的功能,可促进内皮细胞增殖、迁移和血管生成。研究发现,AGGF1在缺血性视网膜病变患者中表达水平升高并诱导视网膜病理性新生血管形成,靶向AGGF1治疗可以抑制视网膜病理性新生血管形成,揭示了内皮AGGF1依赖性视网膜病理性新生血管形成的潜在机制,为有效治疗缺血性视网膜病变提供了新思路<sup>[76]</sup>。YILMAZ等<sup>[77]</sup>研究发现,外源性GAS6补充或髓系SOCS3缺失均能抑制病理性新生血管生成,同时不影响生理性血管形成<sup>[77]</sup>。这些发现提示,靶向GAS6-MERTK通路可能是促进视网膜类器官血管化的有效策略。此外,研究人员发现,在视网膜新生血管性疾病中存在一种特殊的RIP3<sup>+</sup>小胶质细胞亚群,这些细胞在低氧条件下通过RIP1/RIP3/MLKL依赖的程序性坏死机制释放FGF2等促血管生成因子,促进病理性新生血管形成<sup>[78]</sup>,该发现不仅促进了领域内对小胶质细胞异质性的认知,也为实现视网膜类器官的血管化提供了关键的分子靶点。

**3.1.3 生物材料与工程化策略** 视网膜芯片系统通过微流体通道模拟血流动力学条件,为视网膜类器官提供持续的养分供应和进行废物清除,同时允许实时监测血管通透性、物质交换和细胞迁移等参数。CORTI等<sup>[79]</sup>利用患者特异性iPSC构建视网膜类器官和视网膜芯片模型,成功模拟了CLN2视网膜病变并验证了AAV基因治疗的疗效,视网膜芯片技术

的应用,实现了更接近生理的药物评估,为其他视网膜疾病研究提供了范式。

外泌体技术作为新兴策略也显示出促进血管化的潜力。外泌体是直径30~150 nm的细胞外囊泡,具有天然的组织趋向性和生物相容性,能携带蛋白质(如CD63、CD81)、核酸(miRNA、mRNA)和脂质等生物活性分子。与其他递送方法相比,外泌体具有多种优势,可穿透血视网膜屏障,表现出低免疫原性,具有良好的生物学安全性。研究发现,Müller胶质细胞来源小细胞外囊泡(MG-sEVs)在视神经损伤小鼠模型中具有神经保护作用,可有效延缓视网膜神经节细胞的退行性病变进程。这一发现为视神经损伤修复提供了一种无细胞治疗新策略<sup>[80]</sup>。此外,miR-205直接靶向血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)和血管生成素2(angiotensin-2, ANGPT2),研究人员将miR-205加载到间充质干细胞来源的外泌体中,为治疗威胁视力的血管疾病提供了一种新颖而有效的策略<sup>[81]</sup>。

### 3.2 视网膜类器官中小胶质细胞整合的研究突破

小胶质细胞作为中枢神经系统(包括视网膜)的常驻免疫细胞,在组织稳态维持、突触修剪、炎症调控和损伤修复等过程中扮演着不可或缺的角色。传统视网膜类器官中普遍缺乏这一关键细胞类型,极大限制了其在神经退行性疾病和神经炎症相关眼病研究中的应用价值。近年来,随着对小胶质细胞生物学特性认识的深入和细胞共培养技术的发展,研究者在视网膜类器官小胶质细胞整合方面取得了一系列突破性进展,为构建更完整的视网膜模型开辟了新途径。

研究发现,小胶质细胞通过促进Müller细胞成熟和VEGFA表达,在视网膜内血管发育中起关键作用。小胶质细胞缺失会导致特定Müller细胞成熟标记物显著减少,进而影响视网膜内血管密度<sup>[75]</sup>。这一发现强调了小胶质细胞与神经胶质-血管单元之间的密切互动,提示了在视网膜类器官中引入小胶质细胞可能有助于血管网络的建立和维持。免疫监视与调控是小胶质细胞的另一核心功能。在健康视网膜中,小胶质细胞不断延伸和收缩其突起,动态监测微环境变化。当检测到组织损伤或病原体入侵时,小胶质细胞迅速激活并启动适当的免疫反应。OGAKI等<sup>[82]</sup>研究揭示了小胶质细胞通过补体依赖的机制吞噬非生物源性纳米颗粒的过程,该机制涉

及C3标记过程,这种精细的神经-免疫-血管相互作用对维持视网膜健康至关重要,也是视网膜类器官模型需要复现的关键特征。

为解决这些问题,未来的研究方向应包括:建立血管化培养体系、优化细胞空间定位、引入免疫细胞组分,以及构建视网膜与中枢神经系统的功能性连接。这些创新策略不仅能够优化细胞的空间分布与功能成熟度,还将显著提升模型在遗传性视网膜病变研究、高通量药物筛选和细胞替代治疗等领域的转化应用价值。

## 4 视网膜类器官的应用

视网膜类器官作为一种新兴的体外模型,在生物医学领域具有广泛的应用潜力,尤其在疾病建模、药物筛选、细胞治疗和发育生物学研究等方面展现出重要价值。以下是对视网膜类器官常见应用的总结。

### 4.1 视网膜类器官在常见眼部疾病中的应用

4.1.1 视网膜色素变性 视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一组最常见的遗传性视网膜疾病类型,患病率约为1/4 000,主要特征是光感受器细胞的进行性退化,导致患者逐渐失明<sup>[83]</sup>。RP的发病机制复杂,涉及多种基因突变,目前尚无有效的治疗方法<sup>[84-85]</sup>。基于患者来源的视网膜色素上皮细胞和视网膜类器官建立的RP模型,能够有效重现疾病的基因型-表型相关性。值得注意的是,由于RP具有显著的临床和遗传异质性,这些模型可以呈现出两种重要的病理特征:其一,同一基因内的不同变异可能导致差异性的视网膜变性表型;其二,不同基因的突变也可能引发相似的临床表现,这种复杂的基因型-表型关系使得患者特异性模型在RP研究中具有独特价值。例如,BASKIN等<sup>[46]</sup>利用RP患者来源的iPSCs生成视网膜类器官,发现PRPF31基因突变导致的剪接缺陷是RP发病的关键机制,通过纠正剪接缺陷,研究者成功恢复了光感受器的功能。类似地,ATKINSON<sup>[86]</sup>通过RP13型患者来源的iPSCs生成视网膜类器官,揭示PRPF8和hBrr2在剪接过程中的相互作用机制。此外,日本HIRAMI等<sup>[87]</sup>对两名晚期RP患者进行了同种异体iPSC源的视网膜类器官结构片移植,结果显示,两名受试者的移植物在稳定的状态下均存活了2年,移植部位的视网膜厚度增加,且没有发生严重不良事件。在随访期间,与未治

疗的眼睛相比,治疗眼睛的视觉功能恶化更为缓慢。这类同种异体iPSC源的视网膜类器官结构片移植是一种潜在的治疗视网膜色素变性症的有效方法,但其安全性和疗效还需要进行进一步评估。

**4.1.2 视网膜母细胞瘤** 视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是一种儿童期常见的恶性视网膜肿瘤,通常由视网膜细胞的基因突变引起,尤其是*RBI*基因的失活<sup>[88]</sup>。视网膜类器官能够模拟视网膜的发育过程,为研究RB的早期病变提供理想的平台。例如,研究人员利用hPSCs衍生的视网膜类器官成功模拟了RB的发生和发展过程,揭示了*RBI*基因失活后视网膜细胞异常增殖的机制,并确认了类器官中形成的肿瘤细胞具有RB的典型病理特征<sup>[89]</sup>。SAENGWIMOL等<sup>[90]</sup>利用视网膜类器官模型模拟RB的病理特征,发现某些化疗药物能够显著抑制肿瘤细胞的生长。ACHBERGER等<sup>[91]</sup>通过结合器官芯片技术,生成了复杂的多层视网膜模型,进一步模拟了RB的病理过程,并评估了多种药物的治疗效果。VINCENT等<sup>[92]</sup>揭示了*RBI*基因突变对视网膜类器官代谢具有影响,强调了代谢重编程在RB发病机制中的潜在作用,并为未来的治疗研究提供了新的方向。视网膜类器官还为RB的基因治疗提供了新的思路。例如,KANBER等<sup>[93]</sup>通过建立*RBI*基因敲除的视网膜类器官模型,揭示了*RBI*基因缺失导致视网膜分化受损和锥体感光细胞异常增殖的机制,并为RB的发病机制研究提供了新的视角和模型系统<sup>[93]</sup>。这些研究不仅加深了对RB发病机制的理解,还为开发个性化治疗策略提供了有力支持,展现了视网膜类器官在RB研究中的巨大应用潜力。

**4.1.3 青光眼** 青光眼(glaucoma)是一种神经退行性疾病,视网膜神经节细胞的进行性凋亡已被确认为是导致患者视力障碍的关键病理基础。作为视觉信号从视网膜向中枢神经系统传递的唯一效应神经元,RGCs的不可逆性损伤将直接导致视觉传导通路的完整性破坏,进而引发不可逆的视功能损害。研究表明,单纯依靠降低眼压的治疗策略,对于部分青光眼患者而言,并不能有效遏制其病情进展,也无法阻止RGCs的持续丢失<sup>[94]</sup>。这一临床现象凸显了开发神经保护辅助疗法的重要价值,其与现有降眼压治疗的协同作用可能为疾病管理提供更全面的干预策略。基于此,深入研究RGCs的存活机制及其功能维持策略,不仅有助于阐明青光眼的发病机制,还可能

为开发新型视神经保护疗法提供关键的理论依据。

视神经蛋白(optineurin, *OPTN*)基因的E50K突变是青光眼最常见的致病突变之一,该突变可导致RGCs的损伤和死亡,进而破坏视网膜向大脑视觉中枢传递信号的通路连接<sup>[95]</sup>。为了深入研究这一突变的影响,研究人员利用携带*OPTN*(E50K)突变的iPSCs分化出三维视网膜类器官,从视网膜类器官中分离并标记RGCs。携带*OPTN*(E50K)突变的RGCs在三维视网膜类器官中表现出显著的神经退行性表型,这些表型与青光眼患者视网膜神经节细胞的病理特征高度一致。这些结果表明,基于*OPTN*(E50K)突变的RGC可作为研究神经退行性疾病的有力体外模型,并有望助力开发新的青光眼治疗方法<sup>[96]</sup>。

**4.1.4 年龄相关性黄斑变性** 年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是导致老年人视力下降和失明的主要原因之一,AMD的病理特征包括视网膜色素上皮细胞的退化和光感受器的损伤<sup>[97]</sup>。近年来,诱导多能干细胞技术已成为研究AMD病理机制的重要工具,通过体细胞重编程技术,研究人员能够将患者来源的成纤维细胞等体细胞高效转化为具有多向分化潜能的iPSCs<sup>[98]</sup>。这些重编程获得的iPSCs在特定诱导条件下,可进一步分化为与AMD发病密切相关的视网膜细胞类型,尤其是RPE细胞和视锥、视杆光感受器细胞。大量研究证据表明,这种基于iPSC的疾病建模方法能够有效保留患者的遗传背景信息,为建立个体化、高保真的眼部疾病研究模型提供了创新性解决方案<sup>[99-100]</sup>。例如,基于AMD患者特异性iPSC分化的RPE细胞模型研究表明,烟酰胺干预可显著改善细胞功能状态,揭示了烟酰胺在改善AMD病理特征中的潜在作用机制<sup>[101]</sup>。利用携带补体因子H(complement factor H, CFH) Y402H多态性的AMD患者来源的诱导多能干细胞分化出的视网膜色素上皮细胞,表现出AMD的典型病理特征,包括氧化应激增加、炎症反应增强和细胞凋亡增加<sup>[102]</sup>。

然而,传统单层RPE培养模型在AMD研究中存在显著局限性,主要体现在其难以模拟视网膜组织的三维微环境结构(包括光感受器、Bruch膜和脉络膜等关键组分),因此开发更接近生理条件的三维模型对于研究AMD的早期变化至关重要。例如,SHO-KOOHMAND等<sup>[103]</sup>利用RPE细胞和光感受器细胞,结

合生物可降解的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 支架, 构建了一种 3D 培养模型, 为 AMD 早期病理变化的研究和药物筛选提供了一个有力的工具。

#### 4.2 药物筛选与毒性测试

与传统二维培养系统相比, 视网膜类器官的最大优势在于其完整保留了视网膜组织的复杂细胞组成, 能够同时评估药物对不同视网膜细胞的差异性影响。这种多细胞类型的综合毒性评估能力不仅克服了传统模型细胞类型单一的局限性, 还为全面解析药物毒性机制提供了新的研究平台。近年来, 视网膜类器官模型在药物毒性评估领域展现出独特的优势。

通过已知视网膜毒性药物, 如地高辛 (digoxin)、噻嗪嗪 (thioridazine) 和西地那非 (sildenafil) 等处理后的视网膜类器官能够准确再现感光细胞凋亡、Müller 胶质细胞结构损伤以及光信号转导功能减退等典型的体内毒性表型<sup>[104]</sup>, 这些发现为临床用药安全评估和防护策略开发提供了重要的理论基础。视网膜母细胞瘤类器官模型能重现拓扑替康和美法仑等化疗药物对 RB 的临床效果<sup>[90]</sup>。间歇性缺氧通过上调环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 促进前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 和前列环素 (prostacyclin, PGI<sub>2</sub>) 的过量生成, 这一机制在早产儿视网膜病变等缺血-再灌注性视网膜损伤的发病过程中起关键作用。BEHARRY 研究团队<sup>[105]</sup>创新性地构建了人视网膜微血管内皮细胞与视网膜星形胶质细胞的 3D 共培养模型, 成功模拟了血-视网膜屏障的血管-神经胶质微环境特征。研究结果表明, COX-2 特异性抑制剂 (如酮咯酸) 在该 3D 模型中展现出显著的抗炎作用和血管稳态调节功能。这项研究不仅系统验证了该模型的可靠性, 也确立了该平台在眼科创新药物研发和药效评价中的应用价值, 为缺血性视网膜疾病的靶向治疗提供了新的研究思路。此外, 研究人员通过三维自动报告基因定量 (3D-ARQ) 技术整合荧光标记与自动化检测系统, 实现了视网膜类器官的高通量多参数分析, 可同步检测线粒体膜电位、细胞凋亡标志物、氧化应激水平等多个关键毒性指标, 标志着视网膜类器官研究从定性分析向量化筛选的重要转变, 为视网膜疾病治疗药物的研发提供了强有力的技术支撑<sup>[45]</sup>。

#### 4.3 视网膜类器官在发育生物学中的研究

人类多能干细胞来源的 3D 视网膜类器官在体

外发育过程中能够依次重现视泡、视杯、分层化等阶段, 最终形成包含所有主要视网膜细胞类型的完整层状结构。多个研究团队已揭示了在视网膜类器官的分化过程中, 其基因表达谱、组蛋白修饰和 DNA 甲基化图谱与体内胚胎视网膜发育相似, 以此阐明视网膜各类细胞的分化轨迹和调控机制<sup>[106]</sup>。

单细胞多组学分析揭示了从多能祖细胞到终末分化细胞的连续发育轨迹, 并构建了细胞类型特异的基因调控网络, 阐明了 OTX2、CRX 和 NRL 等关键转录因子在细胞命运决定中的调控机制<sup>[107]</sup>。通过优化培养条件, 如添加 9-*cis* RA、甲状腺激素 T3、BMP4 和  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 DAPT 等, 研究者能够定向诱导特定光感受器亚型的分化<sup>[108]</sup>。结合 CRISPR 等基因编辑技术, 视网膜类器官技术已用于研究基因在视网膜发育中作用。TAKATA 等<sup>[109]</sup>发现 R-spondin2 的 Six3 抑制是小鼠神经视网膜分化的关键步骤, 揭示了 Rspo2 和 Six3 在神经视网膜发育中的作用。CAPOWSKI 等<sup>[110]</sup>发现 MITF 的表达缺失会破坏视网膜色素上皮发育和视泡细胞增殖, 揭示了 MITF 可调控早期视泡细胞的增殖能力。这些进展不仅有助于深入理解视网膜发育的分子机制, 还为研究视网膜发育相关疾病提供了理想的模型基础。

#### 4.4 细胞治疗与再生医学

视网膜类器官作为细胞来源为退行性视网膜疾病的替代治疗提供了新的可能。研究表明, 通过特异性表面标志物筛选可获得不同发育阶段的视网膜前体细胞。LAKOWSKI 等<sup>[111]</sup>成功从人视网膜类器官中分离出感光前体细胞, 移植后其能在宿主视网膜内存活并整合。类似地, GARITA-HERNANDEZ 等<sup>[112]</sup>证实视锥前体细胞移植可部分恢复视网膜变性小鼠的光感受功能。研究表明, 从人类视网膜类器官中分离获得的 C-Kit<sup>+</sup>/SSEA4<sup>-</sup>视网膜祖细胞群具有显著的治疗潜力, 这些细胞被移植至视网膜变性动物模型后, 展现出多方面的修复功能, 为开发视网膜退行性疾病的细胞替代疗法提供了重要的实验依据<sup>[113]</sup>。此外, 化学诱导多能干细胞 (chemically induced pluripotent stem cells, CiPSCs) 衍生的视网膜类器官为退行性视网膜疾病治疗提供了新策略。研究表明, 这些类器官可分化为功能性感光细胞, 移植后能在宿主视网膜中整合并建立突触连接, 显著改善视网膜变性模型视觉功能<sup>[114]</sup>, 该技术避免了基因操作风险, 为视网膜退行性疾病提供了更安全的细胞治疗选择。

Müller胶质细胞作为视网膜中主要的神经胶质细胞,在不同物种中展现出显著的神经再生潜力。在鱼类和禽类中, MG在视网膜损伤刺激下能够去分化为多能祖细胞,进而再生所有类型的视网膜神经元<sup>[15,115]</sup>。虽然哺乳动物的MG再生能力相对有限,但研究证实啮齿类动物在急性视网膜应激下, MG仍能增殖并产生少量神经元<sup>[116]</sup>。这些发现为探索MG的神经可塑性及其在视网膜再生治疗中的应用奠定了基础,为类器官技术提供了重要启示。UEKI等<sup>[117]</sup>率先证实 *Ascl1* 过表达可使年轻小鼠MG转分化为多种视网膜神经元,该技术随后通过联合曲古抑菌素A的应用扩展至成年个体<sup>[118]</sup>。YAO等<sup>[119]</sup>发展的两步法策略通过 $\beta$ -连环蛋白和Otx2/Crx/Nrl组合成功诱导MG分化为功能性视杆细胞,显著改善视觉功能。人源视网膜类器官中包含视网膜基本的细胞类型如Müller细胞、感光细胞等,为探索人视网膜Müller细胞的神经再生提供了重要的人源化研究体系。

研究人员发现,通过AAV递送的CRISPR-Cas9系统靶向敲除 *Nrl* 基因,不仅能够促进视杆细胞向视锥样细胞的表型转化,还在视网膜变性进程中有效促进了视锥细胞的存活,并保护了其正常功能<sup>[120]</sup>。NAKAMURA等<sup>[121]</sup>开发靶向Nr2e3的小分子疗法,抑制Nr2e3可有效促进视杆细胞获得视锥细胞样特性,在视网膜色素变性动物模型中展现出显著的神经保护作用。这种基于细胞命运重编程的治疗策略为视网膜退行性疾病的干预提供了新的思路,能够直接调

控内源性感光细胞的特性,避免了外源细胞移植带来的整合和免疫排斥等问题,推进了视网膜退行性疾病的细胞替代治疗临床转化进程。

此外,3D打印技术在视网膜类器官研究中的创新应用正推动该领域快速发展。科研人员创新性地开发了一种基于3D打印PDMS微孔平台的视网膜类器官培养系统,该平台通过精确设计的62个V型微孔结构,实现了人诱导多能干细胞向视网膜类器官的一站式组装培养,在无BMP4和胎牛血清条件下即可同步生成神经视网膜、视网膜色素上皮和睫状缘干细胞三大结构域,完全符合GMP级无异种培养标准<sup>[122]</sup>。美国专利US12247220B2描述的3D打印微流控生物反应器可与微孔平台外接,提供低剪切力动态培养环境,有效解决了类器官中心坏死问题。LEE等<sup>[123]</sup>创新性地采用3D打印技术开发了柔性微电极阵列,实现了对RGC发育过程中电生理活动的精准监测,为评估类器官功能成熟度提供了重要工具。该技术通过高时空分辨率记录,证实了类器官RGC的突触特性与天然视网膜相似,为视网膜疾病研究提供了新型平台。

## 5 总结与展望

视网膜类器官作为新型人源体外模型,在视网膜研究领域展现出重要价值。随着干细胞与生物工程技术的发展,该模型在疾病模拟、药物评估和再生治疗等方面取得突破性进展(图3)。

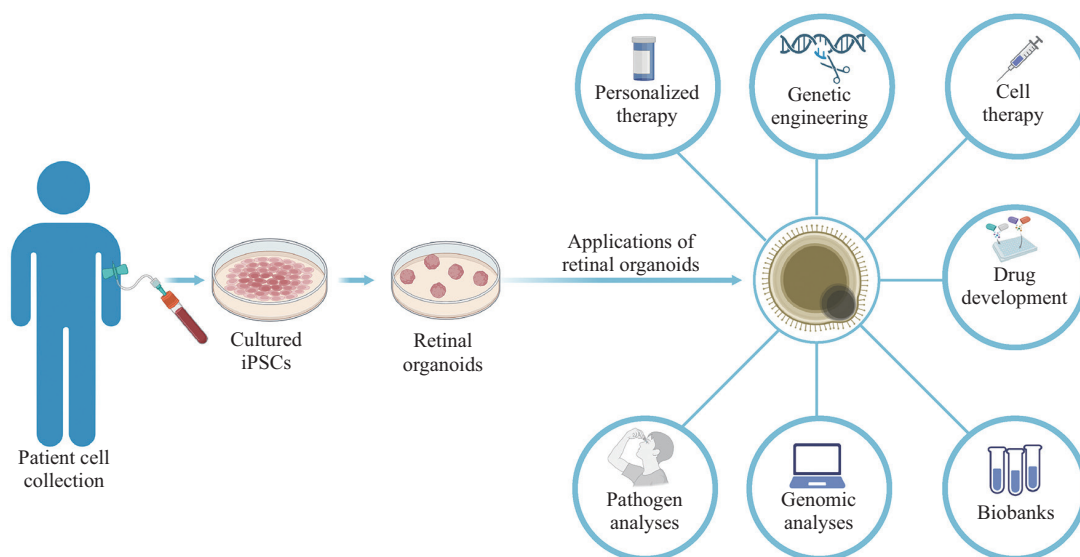


图3 视网膜类器官的应用(该图在BioRender.com绘制)

Fig.3 The applications of retinal organoids (this figure was created in BioRender.com)

在疾病建模方面,视网膜类器官能够模拟多种视网膜疾病的病理特征,包括视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性和青光眼等。例如,通过引入特定基因(如*PRPF8*、*CEP290*等)突变,研究者能够生成具有疾病特征的视网膜类器官,为研究疾病机制提供了理想的模型。此外,视网膜类器官还为高通量药物筛选提供了理想的平台,通过引入报告基因和自动化筛选技术,研究者能够快速评估药物对视网膜细胞分化、功能和病理的影响。

在基因治疗方面,视网膜类器官为基因治疗提供了新的思路。通过基因编辑技术,研究者能够纠正视网膜类器官中的致病基因突变,为开发基因治疗策略提供理论基础。此外,视网膜类器官还为细胞治疗提供了潜在的细胞来源。通过将iPSCs分化为视网膜细胞,能够生成具有功能的光感受器和视网膜色素上皮细胞,为视网膜疾病的细胞治疗提供了新的可能性。

尽管视网膜类器官在视网膜疾病研究中取得了显著进展,但仍面临一些挑战和未来的研究方向。首先,需要进一步优化视网膜类器官的培养条件,提高其成熟度和功能化程度。例如,通过引入生物反应器技术和动态培养环境,能够更好地模拟体内视网膜的发育和功能。其次,利用单细胞转录组学、蛋白质组学和代谢组学等技术,深入研究视网膜类器官的分子机制和疾病特征。这些技术能够揭示视网膜类器官在发育和疾病中的基因表达和代谢变化,为开发新的治疗方法提供理论基础。

最后,将视网膜类器官的研究成果转化为临床应用是未来的重要方向。通过基因治疗和细胞治疗策略,有望改善视网膜疾病的预后。此外,开发高通量药物筛选平台,评估更多潜在药物对视网膜类器官的影响,也将是未来研究的重点。

通过优化培养条件、引入多组学分析技术和推动临床转化,视网膜类器官有望在视网膜疾病的诊断、治疗和研究中发挥更大的作用。

### 参考文献 (References)

- [1] MASLAND R H. The neuronal organization of the retina [J]. *Neuron*, 2012, 76(2): 266-80.
- [2] SUNG C H, CHUANG J Z. The cell biology of vision [J]. *J Cell Biol*, 2010, 190(6): 953-63.
- [3] WÄSSLE H. Parallel processing in the mammalian retina [J].

- Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(10): 747-57.
- [4] SWAROOP A, KIM D, FORREST D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(8): 563-76.
- [5] CORRÒ C, NOVELLASDEMUNT L, LI V S W. A brief history of organoids [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(1): C151-c65.
- [6] FLAXMAN S R, BOURNE R R A, RESNIKOFF S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis [J]. *The Lancet Global health*, 2017, 5(12): e1221-e34.
- [7] YAU K W, HARDIE R C. Phototransduction motifs and variations [J]. *Cell*, 2009, 139(2): 246-64.
- [8] BEN-YOSEF T. Inherited retinal diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13467.
- [9] FREDERIKSEN R, FAIN G L, SAMPATH A P. A hyperpolarizing rod bipolar cell in the sea lamprey, *Petromyzon marinus* [J]. *J Exp Biol*, 2022, 225(8): jeb243949.
- [10] MÜLLER B, PEICHL L. Horizontal cells in the cone-dominated tree shrew retina: morphology, photoreceptor contacts, and topographical distribution [J]. *J Neurosci*, 1993, 13(8): 3628-46.
- [11] YAN W, LABOULAYE M A, TRAN N M, et al. Mouse retinal cell atlas: molecular identification of over sixty amacrine cell types [J]. *J Neurosci*, 2020, 40(27): 5177-95.
- [12] VERNAZZA S, ODDONE F, TIRENDI S, et al. Risk factors for retinal ganglion cell distress in glaucoma and neuroprotective potential intervention [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7994.
- [13] SANES J R, MASLAND R H. The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2015, 38: 221-46.
- [14] REICHENBACH A, BRINGMANN A. New functions of Müller cells [J]. *Glia*, 2013, 61(5): 651-78.
- [15] GOLDMAN D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(7): 431-42.
- [16] STRAUSS O. The retinal pigment epithelium in visual function [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(3): 845-81.
- [17] ONYAK J R, VERGARA M N, RENNA J M. Retinal organoid light responsivity: current status and future opportunities [J]. *Transl Res*, 2022, 250: 98-111.
- [18] ASTASHKINA A, MANN B, GRAINGER D W. A critical evaluation of *in vitro* cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 134(1): 82-106.
- [19] CARTER-DAWSON L D, LAVAIL M M. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy [J]. *J Comp Neurol*, 1979, 188(2): 245-62.
- [20] SIMÓ R, STITT A W, GARDNER T W. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter [J]? *Diabetologia*, 2018, 61(9): 1902-12.
- [21] PANG J J, CHANG B, KUMAR A, et al. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis [J]. *Mol Ther*, 2006, 13(3): 565-72.
- [22] CHARBEL ISSA P, BARNARD A R, SINGH M S, et al. Fundus autofluorescence in the *Abca4*<sup>-/-</sup> mouse model of Stargardt disease-correlation with accumulation of A2E, retinal function, and histology [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(8): 5602-12.

- [23] KARLSTETTER M, SCHOLZ R, RUTAR M, et al. Retinal microglia: just bystander or target for therapy [J]? *Prog Retin Eye Res*, 2015, 45: 30-57.
- [24] HAUSWIRTH W W. Retinal gene therapy using adeno-associated viral vectors: multiple applications for a small virus [J]. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(8): 671-8.
- [25] CASTRO B, STEEL J C, LAYTON C J. AAV-mediated gene therapies for glaucoma and uveitis: are we there yet [J]? *Expert Rev Mol Med*, 2024, 26: e9.
- [26] WEI M, LI S, LE W. Nanomaterials modulate stem cell differentiation: biological interaction and underlying mechanisms [J]. *J Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 75.
- [27] SHI Y, INOUE H, WU J C, et al. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(2): 115-30.
- [28] KRUCZEK K, SWAROOP A. Pluripotent stem cell-derived retinal organoids for disease modeling and development of therapies [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(10): 1206-15.
- [29] MEYER J S, SHEARER R L, CAPOWSKI E E, et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(39): 16698-703.
- [30] BASSETT E A, WALLACE V A. Cell fate determination in the vertebrate retina [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(9): 565-73.
- [31] PHILLIPS M J, WALLACE K A, DICKERSON S J, et al. Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form retinal laminae and develop synapses [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(4): 2007-19.
- [32] ADLER R, CANTO-SOLER M V. Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies [J]. *Dev Biol*, 2007, 305(1): 1-13.
- [33] IKEDA H, OSAKADA F, WATANABE K, et al. Generation of Rx<sup>+</sup>/Pax6<sup>+</sup> neural retinal precursors from embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11331-6.
- [34] LAMBA D A, KARL M O, WARE C B, et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(34): 12769-74.
- [35] KROHNE T U, WESTENSKOW P D, KURIHARA T, et al. Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(2): 96-109.
- [36] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [37] ZHONG X, GUTIERREZ C, XUE T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4047.
- [38] PARK J W, YANG J, XU R H. PAX6 Alternative splicing and corneal development [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(6): 367-77.
- [39] PHILLIPS M J, PEREZ E T, MARTIN J M, et al. Modeling human retinal development with patient-specific induced pluripotent stem cells reveals multiple roles for visual system homeobox 2 [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(6): 1480-92.
- [40] NAKANO T, ANDO S, TAKATA N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 771-85.
- [41] OSAKADA F, IKEDA H, MANDAI M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(2): 215-24.
- [42] EIRAKU M, TAKATA N, ISHIBASHI H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture [J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 51-6.
- [43] KAYA K D, CHEN H Y, BROOKS M J, et al. Transcriptome-based molecular staging of human stem cell-derived retinal organoids uncovers accelerated photoreceptor differentiation by 9-*cis* retinal [J]. *Mol Vis*, 2019, 25: 663-78.
- [44] YANG J, TIAN M, LI J, et al. Induction of human ESC-derived and adult primary multipotent limbal stem cells into retinal pigment epithelial cells and corneal stromal stem cells [J]. *Exp Eye Res*, 2024, 239: 109778.
- [45] BUSKIN A, ZHU L, CHICHAGOVA V, et al. Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes PRPF31 retinitis pigmentosa [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4234.
- [46] VERGARA M N, FLORES-BELLVER M, APARICIO-DOMINGO S, et al. Three-dimensional automated reporter quantification (3D-ARQ) technology enables quantitative screening in retinal organoids [J]. *Development*, 2017, 144(20): 3698-705.
- [47] KUWAHARA A, OZONE C, NAKANO T, et al. Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6286.
- [48] GONZALEZ-CORDERO A, KRUCZEK K, NAEEM A, et al. Recapitulation of human retinal development from human pluripotent stem cells generates transplantable populations of cone photoreceptors [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(3): 820-37.
- [49] HALLAM D, HILGEN G, DORGAU B, et al. Human-induced pluripotent stem cells generate light responsive retinal organoids with variable and nutrient-dependent efficiency [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(10): 1535-51.
- [50] CHICHAGOVA V, DORGAU B, FELEMBAN M, et al. Differentiation of retinal organoids from human pluripotent stem cells [J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2019, 50(1): e95.
- [51] REICHMAN S, TERRAY A, SLEMBROUCK A, et al. From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(23): 8518-23.
- [52] HOSHINO A, RATNAPRIYA R, BROOKS M J, et al. Molecular anatomy of the developing human retina [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(6): 763-79, e4.
- [53] LAMBA D A, GUST J, REH T A. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 73-9.
- [54] REGENT F, CHEN H Y, KELLEY R A, et al. A simple and efficient method for generating human retinal organoids [J]. *Mol Vis*, 2020, 26: 97-105.
- [55] XIE H, ZHANG W, ZHANG M, et al. Chromatin accessibility analysis reveals regulatory dynamics of developing human retina and hiPSC-derived retinal organoids [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(6): eaay5247.
- [56] ELDRED K C, HADYNIK S E, HUSSEY K A, et al. Thyroid hormone signaling specifies cone subtypes in human retinal or-

- ganoids [J]. *Science*, 2018, 362(6411): eaau6348.
- [57] CAPOWSKI E E, SAMIMI K, MAYERL S J, et al. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines [J]. *Development*, 2019, 146(1): dev171686.
- [58] DISTEFANO T, CHEN H Y, PANEBIANCO C, et al. Accelerated and improved differentiation of retinal organoids from pluripotent stem cells in rotating-wall vessel bioreactors [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(1): 300-13.
- [59] LOWE A, HARRIS R, BHANSALI P, et al. Intercellular adhesion-dependent cell survival and ROCK-regulated actomyosin-driven forces mediate self-formation of a retinal organoid [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(5): 743-56.
- [60] LICATA J P, SCHWAB K H, HAR-EL Y E, et al. Bioreactor technologies for enhanced organoid culture [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11427.
- [61] OVANDO-ROCHE P, WEST E L, BRANCH M J, et al. Use of bioreactors for culturing human retinal organoids improves photoreceptor yields [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 156.
- [62] PHELAN M A, LELKES P I, SWAROOP A. Mini and customized low-cost bioreactors for optimized high-throughput generation of tissue organoids [J]. *Stem Cell Investig*, 2018, 5: 33.
- [63] KIM S, LOWE A, DHARMAT R, et al. Generation, transcriptome profiling, and functional validation of cone-rich human retinal organoids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(22): 10824-33.
- [64] XUE Y, SEILER M J, TANG W C, et al. Retinal organoids on-a-chip: a micro-millifluidic bioreactor for long-term organoid maintenance [J]. *Lab on a chip*, 2021, 21(17): 3361-77.
- [65] O'HARA-WRIGHT M, MOBINI S, GONZALEZ-CORDERO A. Bioelectric potential in next-generation organoids: electrical stimulation to enhance 3D structures of the central nervous system [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 901652.
- [66] RAJENDRAN NAIR D S, GUPTA A, ISERI E, et al. Extrinsic electric field modulates neuronal development and increases photoreceptor population in retinal organoids [J]. *Front Neurosci*, 2024, 18: 1438903.
- [67] HARKIN J, PEÑA K H, GOMES C, et al. A highly reproducible and efficient method for retinal organoid differentiation from human pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(25): e2317285121.
- [68] KAEWKHAW R, SWAROOP M, HOMMA K, et al. Treatment paradigms for retinal and macular diseases using 3-D retina cultures derived from human reporter pluripotent stem cell lines [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(5): ORSF11-11.
- [69] GONZALEZ-CORDERO A, GOH D, KRUCZEK K, et al. Assessment of AAV vector tropisms for mouse and human pluripotent stem cell-derived RPE and photoreceptor cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(10): 1124-39.
- [70] MOOKHERJEE S, CHEN H Y, ISGRIG K, et al. A CEP290 C-terminal domain complements the mutant CEP290 of Rd16 mice in trans and rescues retinal degeneration [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(3): 611-23, e6.
- [71] DORRELL M I, FRIEDLANDER M. Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25(3): 277-95.
- [72] SAPIEHA P, SIRINYAN M, HAMEL D, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis [J]. *Nat Med*, 2008, 14(10): 1067-76.
- [73] GREBENYUK S, RANGA A. Engineering organoid vascularization [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 39.
- [74] INAGAKI S, NAKAMURA S, KUSE Y, et al. Establishment of vascularized human retinal organoids from induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells*, 2025, 43(3): sxae093.
- [75] ROTHORN-APEL N, VRIDHACHALAM N, CONNOR K M, et al. Microglial depletion decreases Müller cell maturation and inner retinal vascular density [J]. *Cell Commun Signal*, 2025, 23(1): 90.
- [76] CHENG Y, ZHANG M, LI C, et al. Endothelial AGGF1 promotes retinal angiogenesis by coordinating TNFSF12/FN14 signalling [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 1332.
- [77] YILMAZ C, KOROVINA I, WITT A, et al. Modulation of microglial phagocytosis via the GAS6-MERTK pathway regulates pathological angiogenesis in the mouse oxygen-induced retinopathy model [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 428.
- [78] HE C, LIU Y, HUANG Z, et al. A specific RIP3<sup>+</sup> subpopulation of microglia promotes retinopathy through a hypoxia-triggered necroptotic mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(11): e2023290118.
- [79] CORTI S, KIM K H, CHEN T, et al. Recreating pathophysiology of CLN2 disease and demonstrating reversion by TPP1 gene therapy in hiPSC-derived retinal organoids and retina-on-chip [J]. *Cell Rep Med*, 2025: 102244.
- [80] QIAN H D, SONG X Y, HE G W, et al. Müller glial-derived small extracellular vesicles mitigate RGC degeneration by suppressing microglial activation via Cx3cl1-Cx3cr1 signaling [J]. *Adv Healthc Mater*, 2025, 14(12): e2404306.
- [81] ZHANG H Y, ZHANG Q Y, LIU Q, et al. Exosome-loading miR-205: a two-pronged approach to ocular neovascularization therapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 36.
- [82] OGAKI A, KINOSHITA S, IKEGAYA Y, et al. Chemokine-complement cascade in glial-vascular units protects neurons from non-biogenic nanoparticles [J]. *J Neuroinflammation*, 2025, 22(1): 182.
- [83] TSANG S H, SHARMA T. Autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1085: 69-77.
- [84] HARTONG D T, BERTSON E L, DRYJA T P. Retinitis pigmentosa [J]. *Lancet*, 2006, 368(9549): 1795-809.
- [85] LIU W, LIU S, LI P, et al. Retinitis pigmentosa: progress in molecular pathology and biotherapeutic strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4883.
- [86] ATKINSON R, GEORGIOU M, YANG C, et al. PRPF8-mediated dysregulation of hBrr2 helicase disrupts human spliceosome kinetics and 5'-splice-site selection causing tissue-specific defects [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3138.
- [87] HIRAMI Y, MANDAI M, SUGITA S, et al. Safety and stable survival of stem-cell-derived retinal organoid for 2 years in patients with retinitis pigmentosa [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(12): 1585-96, e6.
- [88] PEELER C E, GONZALEZ E. Retinoblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(25): 2412.
- [89] NORRIE J L, NITYANANDAM A, LAI K, et al. Retinoblastoma from human stem cell-derived retinal organoids [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4535.

- [90] SAENGWIMOL D, ROJANAPORN D, CHAITANKAR V, et al. A three-dimensional organoid model recapitulates tumorigenic aspects and drug responses of advanced human retinoblastoma [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15664.
- [91] ACHBERGER K, PROBST C, HADERSPECK J, et al. Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform [J]. *eLife*, 2019, 8: e46188.
- [92] VINCENT A, KRISHNAKUMAR S, PARAMESWARAN S. Heterozygous RB1 mutation enhanced ATP production in human iPSC-derived retinal organoids [J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 606.
- [93] KANBER D, WOESTEFELD J, DÖPPER H, et al. RB1-negative retinal organoids display proliferation of cone photoreceptors and loss of retinal differentiation [J]. *Cancers*, 2022, 14(9): 2166.
- [94] DAVIS B M, CRAWLEY L, PAHLITZSCH M, et al. Glaucoma: the retina and beyond [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 132(6): 807-26.
- [95] QUIGLEY H A, BROMAN A T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90(3): 262-7.
- [96] VANDERWALL K B, HUANG K C, PAN Y, et al. Retinal ganglion cells with a glaucoma OPTN(E50K) mutation exhibit neurodegenerative phenotypes when derived from three-dimensional retinal organoids [J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15(1): 52-66.
- [97] ARMENTO A, UEFFING M, CLARK S J. The complement system in age-related macular degeneration [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(10): 4487-505.
- [98] MCCAUGHEY T, LIANG H H, CHEN C, et al. An interactive multimedia approach to improving informed consent for induced pluripotent stem cell research [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(3): 307-8.
- [99] HUNG S S C, KHAN S, LO C Y, et al. Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 177: 32-43.
- [100] WONG R C B, LIM S Y, HUNG S S C, et al. Mitochondrial replacement in an iPSC model of Leber's hereditary optic neuropathy [J]. *Aging*, 2017, 9(4): 1341-50.
- [101] SAINI J S, CORNEO B, MILLER J D, et al. Nicotinamide ameliorates disease phenotypes in a human iPSC model of age-related macular degeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(5): 635-47, e7.
- [102] HALLAM D, COLLIN J, BOJIC S, et al. An induced pluripotent stem cell patient specific model of complement factor H (Y402H) polymorphism displays characteristic features of age-related macular degeneration and indicates a beneficial role for UV light exposure [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(11): 2305-20.
- [103] SHOKOOHMAND A, JEON J E, THEODOROPOULOS C, et al. A novel 3D cultured model for studying early changes in age-related macular degeneration [J]. *Macromol Biosci*, 2017, doi: 10.1002/mabi.201700221.
- [104] DORGAU B, GEORGIU M, CHAUDHARY A, et al. Human retinal organoids provide a suitable tool for toxicological investigations: a comprehensive validation using drugs and compounds affecting the retina [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11(2): 159-77.
- [105] BEHARRY K D, CAI C L, VALENCIA G B, et al. Human retinal endothelial cells and astrocytes cultured on 3-D scaffolds for ocular drug discovery and development [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2018, 134: 93-107.
- [106] COWAN C S, RENNER M, DE GENNARO M, et al. Cell types of the human retina and its organoids at single-cell resolution [J]. *Cell*, 2020, 182(6): 1623-40, e34.
- [107] WAHLE P, BRANCATI G, HARMEL C, et al. Multimodal spatiotemporal phenotyping of human retinal organoid development [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(12): 1765-75.
- [108] UEDA K, ONISHI A, ITO S I, et al. Generation of three-dimensional retinal organoids expressing rhodopsin and S- and M-cone opsins from mouse stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(4): 2595-601.
- [109] TAKATA N, ABBEY D, FIORE L, et al. An eye organoid approach identifies Six3 suppression of R-spondin 2 as a critical step in mouse neuroretina differentiation [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(6): 1534-49.
- [110] CAPOWSKI E E, SIMONETT J M, CLARK E M, et al. Loss of MITF expression during human embryonic stem cell differentiation disrupts retinal pigment epithelium development and optic vesicle cell proliferation [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(23): 6332-44.
- [111] LAKOWSKI J, WELBY E, BUDINGER D, et al. Isolation of human photoreceptor precursors via a cell surface marker panel from stem cell-derived retinal organoids and fetal retinae [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(5): 709-22.
- [112] GARITA-HERNANDEZ M, LAMPIČ M, CHAFFIOL A, et al. Restoration of visual function by transplantation of optogenetically engineered photoreceptors [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4524.
- [113] ZOU T, GAO L, ZENG Y, et al. Organoid-derived C-Kit<sup>+</sup>/SSEA4<sup>-</sup> human retinal progenitor cells promote a protective retinal microenvironment during transplantation in rodents [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1205.
- [114] ZHAO N, ZHANG C J, ZHANG X, et al. Transplantation of derivative retinal organoids from chemically induced pluripotent stem cells restored visual function [J]. *NPJ Regen Med*, 2024, 9(1): 42.
- [115] FISCHER A J, REH T A. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina [J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(3): 247-52.
- [116] JADHAV A P, ROESCH K, CEPKO C L. Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2009, 28(4): 249-62.
- [117] UEKI Y, WILKEN M S, COX K E, et al. Transgenic expression of the proneural transcription factor Ascl1 in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(44): 13717-22.
- [118] JORSTAD N L, WILKEN M S, GRIMES W N, et al. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice [J]. *Nature*, 2017, 548(7665): 103-7.
- [119] YAO K, QIU S, WANG Y V, et al. Restoration of vision after de novo genesis of rod photoreceptors in mammalian retinas [J]. *Nature*, 2018, 560(7719): 484-8.
- [120] ZHU J, MING C, FU X, et al. Gene and mutation independent therapy via CRISPR-Cas9 mediated cellular reprogramming in rod photoreceptors [J]. *Cell Res*, 2017, 27(6): 830-3.

- [121] NAKAMURA P A, TANG S, SHIMCHUK A A, et al. Potential of small molecule-mediated reprogramming of rod photoreceptors to treat retinitis pigmentosa [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(14): 6407-15.
- [122] SUN X, CUI Z, LIANG Y, et al. One-stop assembly of adherent 3D retinal organoids from hiPSCs based on 3D-printed derived PDMS microwell platform [J]. *Biofabrication*, 2023, doi: 10.1088/1758-5090/acc761.
- [123] LEE S, CHUNG W G, JEONG H, et al. Electrophysiological analysis of retinal organoid development using 3D microelectrodes of liquid metals [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(35): e2404428.