

# 抑制视网膜色素上皮细胞发生上皮-间充质转化的研究进展

李 铎, 沈 涵, 袁松涛, 刘庆淮

**基金项目:**国家重点研发计划项目(No. 2017YFA0104101)

**作者单位:**(210029) 中国江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院眼科

**作者简介:**李铎,男,南京医科大学在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

**通讯作者:**刘庆淮,男,教授,主任医师,研究方向:眼底病. liuqh@njmu.edu.cn

**收稿日期:**2018-07-18 **修回日期:**2018-11-05

## Progress of inhibiting epithelial - mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells

Duo Li, Han Shen, Song-Tao Yuan, Qing-Huai Liu

**Foundation item:** National Key R&D Program of China (No. 2017YFA0104101)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Qing-Huai Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China. liuqh@njmu.edu.cn

Received:2018-07-18 Accepted:2018-11-05

## Abstract

• Epithelial - mesenchymal transition (EMT) of retinal pigment epithelial cells (RPE) plays a key role in proliferative vitreoretinopathy (PVR), and also decreases the therapeutic effect of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) to choroidal neovascularization (CNV). In addition, cells transplantation has been becoming a potential therapeutic method to treat age-related macular degeneration (AMD), and some cells sources like human embryonic stem cells (hESC) or induced pluripotent stem cell (iPSC) induced RPE cells, and fetal RPE cells have been attempted. However, EMT, as a common problem, decreases cells proliferation and differentiation efficiency, and it will reduce therapeutic effect and the number of therapeutic populations. So, in this article, we reviewed some possible methods to inhibit EMT.

• **KEYWORDS:** retinal pigment epithelial; epithelial mesenchymal transition; review

**Citation:** Li D, Shen H, Yuan ST, *et al.* Progress of inhibiting epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(12):2160-2164

## 摘要

视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)的上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是增殖性玻璃体视网膜疾病(proliferative vitreoretinopathy, PVR)的主要发病机制,也是治疗脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)时,造成抗血管内皮生长因子(anti-vascular endothelial growth factor, anti-VEGF)疗效降低的重要因素。除此之外,随着细胞替代治疗作为年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)的新型治疗方式而兴起,人类胚胎干细胞(hESC-RPE)、体细胞诱导多能干细胞(iPSC-RPE)定向诱导分化的RPE细胞以及来自于流产胎儿的胎儿视网膜色素上皮细胞(fetal RPE, fRPE)逐渐受到了研究者的关注。为了发挥最好的治疗效果,保证治疗用细胞的稳定增殖及高效分化是极其重要的。但是在传代扩增的过程中,由于上皮间充质转化的存在,导致这些细胞出现增殖困难以及再分化能力下降,从而影响治疗效果并阻碍了治疗人群的普及,使细胞替代治疗难以推广。所以,鉴于上皮间充质转化在视网膜疾病的发生和治疗中都造成了重要影响,抑制视网膜色素上皮细胞发生上皮间充质转化就显得尤为重要,为此,我们将阻止上皮间充质转化研究的最新进展综述如下。

**关键词:** 视网膜色素上皮细胞; 上皮间充质转化; 综述

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.12.09

**引用:** 李铎, 沈涵, 袁松涛, 等. 抑制视网膜色素上皮细胞发生上皮-间充质转化的研究进展. 国际眼科杂志 2018;18(12):2160-2164

## 0 引言

上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞向间充质细胞转分化的现象,它主要特点体现在上皮细胞的形态变化、紧密连接消失及细胞迁移率增加,从而导致细胞侵袭性的提高,这种现象常出现于胚胎发育和组织的损伤修复过程中。但是EMT也可以促进一些疾病的发生发展,比如组织的纤维化和肿瘤的转移<sup>[1]</sup>。在视网膜疾病中,视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)的上皮间充质转化与增殖性玻璃

体视网膜疾病 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 的发病最为密切相关<sup>[2-3]</sup>。正常情况下, RPE 细胞呈六边形整齐排列, 即所谓的铺路石样 (cobblestone appearance), 在相差显微镜的亮视野下可观察到明显的色素形成, 并且在细胞表面表达 ZO-1、E-cadherin 等上皮的特征性蛋白; 当细胞发生 EMT 时, 细胞逐渐丢失了上皮的特征, 形状呈梭形, 排列松散, 表达 Vimentin 和 N-cadherin 等蛋白, 这种细胞稳定性差, 极易迁移至玻璃体腔并改变细胞周围基质的环境, 促进视网膜前膜 (epiretinal membranes, ERM) 的形成, 而前膜的收缩导致牵拉性视网膜脱离 (tractional retinal detachment), 这是增殖性玻璃体视网膜疾病的发病机制, 也是影响内眼手术治疗效果的重要因素<sup>[3]</sup>。除此之外, 虽然抗 VEGF 已经是治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的常规手段, 但是由于玻璃体腔注射后的损伤易出现视网膜下纤维化 (subretinal fibrosis) 而造成的瘢痕形成, 导致 RPE、光感受器细胞等继续被损伤, 从而造成一部分患者出现抗新生血管治疗的抵抗并进一步发生视力损伤<sup>[4]</sup>, 其中瘢痕形成的重要原因就是视网膜色素上皮细胞的 EMT<sup>[5]</sup>。

上皮间充质转化作为一种重要的病理过程不仅影响着疾病的发展进程, 并且随着人类治疗理念及方式的不断更新, 也阻碍着一些新型治疗方式的展开。近年来细胞替代治疗作为治疗晚期干性年龄相关性黄斑变性的突破点逐渐被人们所认同<sup>[6-7]</sup>, 但是与其他体外培养的 RPE 细胞相似<sup>[8]</sup>, 作为治疗细胞来源的胎儿 RPE 细胞<sup>[8]</sup>、人胚胎干细胞来源的 RPE<sup>[9]</sup>以及体细胞诱导多能干细胞来源的 RPE<sup>[10-11]</sup>同样易在传代扩增的过程中发生 EMT 并导致无法继续传代, 例如已经诱导分化成 RPE 的 hESC 与 iPSC 细胞在体外通常只能传到 2~3 代<sup>[12]</sup>, 而胎儿视网膜色素上皮 (fetal RPE, fRPE) 细胞只能传至 4 代<sup>[13-14]</sup>, 至此这些细胞已不具有正常 RPE 的形态及功能, 这就造成了治疗成本的提高以及治疗效果的不稳定, 从而难以推广并扩大受治疗人群。因此抑制 EMT 的发生、提高细胞的传代次数并维持细胞的正常形态及功能是保证细胞替代治疗效果的重要前提。

## 1 上皮间充质转化的一般发生机制

上皮间充质转化的发生机制十分复杂, 目前并未十分明了, 通常被认为是多因素作用的结果, 这些因素包含异常分泌的细胞因子、细胞间基质成份的改变以及细胞连接和骨架的重塑, 这些因素共同促进了三类核心转录因子的表达, 即 SNAIL、锌指盒结合蛋白 (zinc-finger E-box-binding, ZEB) 以及碱性螺旋转录因子 (basic helix-loop-helix, bHLH), 他们通常会在 EMT 发生的早期表达, 并彼此协调, 不仅促进 EMT 的发生, 也抑制了正常上皮细胞类型的表达<sup>[15]</sup>。目前为止只有 TGF- $\beta$  信号通路与 EMT 发生的关系较为明确。

## 2 TGF- $\beta$ 信号通路与 RPE 上皮间充质转化

### 2.1 TGF- $\beta$ 信号通路的主要组成

TGF- $\beta$  信号通路又称转化生长因子 (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) 信号通路, 上游的细胞因子包括 3 种 TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1、

2、3), 两种 Activin (Activin, Inhibin), 特异性受体为 TGF- $\beta$  受体, 这种受体是由两种亚基组成的复合物, 包括 II 型受体 (ActR-II A, ActR-II B, TGF- $\beta$ R-II) 和 I 型受体 (Activin receptor-Like-Kinases: ALKs 1-7)。配体首先和 II 型受体结合, 然后使 I 型受体磷酸化 (TGF- $\beta$ 1、2、3 通常激活 ALK4、5、7), 磷酸化后的 I 型受体激发下游通路, 下游通路通常有两条途径, 一种是 SMAD 途径, 另一种是非 SMAD 途径。其中 SMAD 途径在生物体内较为保守, 当 TGF- $\beta$  激活 I 型受体后, 受体型 SMAD2、3 (R-SMAD2、3) 被磷酸化, 继而使共同通路型 SMAD4 (co-SMAD) 磷酸化, 激活后的 SMAD4 在细胞核中发挥相应的生物效应, 这是 SMAD 途径的共同路径。这条路径在胚胎发育、细胞的生长分化及部分细胞功能中起到重要的作用<sup>[16-17]</sup>。而非 SMAD 途径与细胞中众多信号通路都有所交集, 包括 MAP 激酶信号通路 (MAP kinase pathways)、Rho-like GTPase 信号通路 (Rho-like GTPase signaling pathways)、磷脂酰三肌醇/AKT 信号通路 (phosphatidylinositol-3-kinase/AKT pathways) 等<sup>[18]</sup>, 但是这些通路之间的关系极为复杂, 目前尚不十分清楚。

### 2.2 抑制 TGF- $\beta$ 通路激活能减少体外培养的 RPE 细胞发生 EMT 并保持正常分化

Hunt 等在研究中发现, 在体外培养的人类 RPE 细胞中加入外源 TGF- $\beta$  可以诱导其发生上皮间充质转化, 但加用 20  $\mu$ mol/L 的 TGF- $\beta$  抑制剂 SB431542 后, TGF- $\beta$  所诱导的 EMT 被阻止, 但是他只阐述了 TGF- $\beta$  与 EMT 之间的关系, 并没有说明其对 RPE 的分化作用<sup>[19]</sup>。Radeke 等的研究发现, 在体外培养得 fRPE 细胞中加入 A83-01 (500nmol/L), 这是一种选择性抑制 ALK4、5、7 的 TGF- $\beta$  抑制剂<sup>[20]</sup>, 连续运用 32d 后, 细胞不仅没有发生 EMT 而且能够向正常 RPE 分化, 细胞的传代次数也可以提升至 P7 代, 但是随着的传代次数的增加, 有效分化的细胞越来越少, 增殖能力越来越弱, 超过 P7 代时, 细胞已无色素产生, 这意味着 TGF- $\beta$  抑制剂的作用虽然有效但也有限<sup>[13-21]</sup>。除此之外, Ishikawa 等<sup>[22]</sup>利用 Resveratrol 活化的 SIRT1 使 SMAD4 去乙酰化, 从而阻止 fRPE 发生 EMT, 说明抑制 TGF- $\beta$  下游通路的也可以达到目的, 但是也没有说明 fRPE 的增殖及最终的分化情况。

TGF- $\beta$  抑制剂之所以能够抑制 EMT 的发生, 可能是由于其阻止了磷酸化的 SMAD3 与 SMAD4 结合, 减少了 SNAIL1 等关键转录因子的激活, 抑制 EMT 的发生<sup>[23]</sup>, 并在一定程度上阻止了 TGF- $\beta$  诱导的细胞凋亡<sup>[24]</sup>, 保持了细胞的增殖能力。除此之外, 运用 TGF- $\beta$  抑制剂后, MITF 以及 OTX2 这两种与 RPE 分化相关的转录因子的表达提高, 促进了体外培养的 fRPE 向正常 RPE 分化<sup>[13-21]</sup>; 在 iPSC 诱导分化为 RPE 的研究中, Choudhary 等<sup>[25]</sup>在第 2~6d 加用 TGF- $\beta$  抑制剂 SB431542 并在第 9~28d 时加用 Activin A, 这样的方式提高了 iPSC 向 RPE 的分化效率, 但是令人奇怪的是 Activin A 也可以激活 TGF- $\beta$  下游的 SMAD2/3, 可是加用这种细胞因子并不能引起视网膜色素上皮细胞发生 EMT, 而且在 Fuhrmann 等<sup>[26]</sup>的研究中发

现,在鸡眼的胚胎发育中,眼外间充质组织分泌的 Activin A 可以促进 RPE 的发育,因此,我们认为,TGF- $\beta$  抑制剂对于 rRPE 来讲可能并不是简单粗暴地抑制,而是对 TGF- $\beta$  信号通路起到了某种调节的作用,具体原因我们尚不清楚。

### 3 BMP 通路与 RPE 的上皮间充质转化

BMP (bone morphogenetic proteins) 通常被称为骨形成蛋白,它是 TGF- $\beta$  超家族中的一类,其亚型种类众多 (BMP1、2、3 等)。BMP 通路与 TGF- $\beta$  不同,其特异性受体的 I 类亚基为 ALK2 和 ALK3,下游的 R-SMAD 是 SMAD1、5。多项研究表明 BMP 与 EMT 呈现负相关性, Samavarchi-Tehrani 等<sup>[27]</sup> 发现 BMP 能诱导 miR-205 及 miR-200 的产生,这两种微小 RNA 能抑制 SNAIL1 和 ZEB1 的功能,使细胞发生间充质上皮转化 (Mesenchymal-epithelial transition, MET),即 EMT 的相反过程; Higgins 等<sup>[28]</sup> 和 Zeisberg 等<sup>[29]</sup> 在研究中发现 BMP7 也可以诱导已发生纤维化的肾脏出现 MET,因此 BMP 信号通路与 EMT 在一定程度上确实存有负相关性。反之,当 BMP 的作用在体内受到抑制时,EMT 则容易发生,Scheel 等<sup>[30]</sup> 在研究中发现,两种内源性的 BMP 抑制因子 Gremlin1 及 Chordin-like 2 在发生 EMT 的乳腺癌细胞中表达较高,反之较低; Yin 等<sup>[31]</sup> 则进一步证明了 Gremlin1 是调节 EMT 的重要因子,其过高的表达反而可以促进 TGF- $\beta$  通路的激活。在针对视网膜色素上皮细胞的研究当中, Yao 等<sup>[32]</sup> 发现在 1:1 数量培养的 ARPE-19 和原代人 RPE 的细胞中加用 BMP4 可以抑制 TGF- $\beta$  诱导的 EMT,这在 RPE 水平上也证明了 BMP4 的负相关作用,但遗憾的是,也并没有指出细胞的增殖能力及最终的分化状况。除此之外,在眼部胚胎发育的研究中, Astrid Vogel-Höpker 发现鸡胚视泡表面覆盖的表面外胚层可以分泌 BMP4 和 BMP7 并特异性地促进 RPE 细胞的分化,证实了 BMP 也具有促进 RPE 分化的作用<sup>[33-34]</sup>。

### 4 ROCK 与 RPE 的上皮间充质化

ROCK 是一种 Rho 相关蛋白激酶 (rho-associated protein kinase),它是 Ras 超家族中 Rho 蛋白偶联信号通路下游重要的效应分子,其重要的作用就是调节细胞骨架和细胞之间的连接<sup>[35-36]</sup>。Ni 等<sup>[37]</sup> 在研究中发现,通过 ROCK 抑制剂 Y27632 可以提高 ARPE19 的生存能力而减少细胞凋亡; Croze 等<sup>[38]</sup> 同样运用 Y27632 延长了 hESC-RPE 和 iPSC-RPE 的传代次数,并使细胞在高传代次数时能够分化为具有正常 RPE 特征和功能的细胞,其中将 hESC-RPE 延长到了 14 代,但是在 15 代时开始出现上皮间充质转化,18 代时已无法汇合;而 iPSC-RPE 可以被传至 13 代,超过 13 代后已经无法继续生长。ROCK 抑制剂之所以能够抑制 RPE 细胞发生 EMT 并保证细胞分化, Croze 等<sup>[39]</sup> 通过转录组测序分析发现 ROCK 抑制剂的作用非常广泛,包括多种信号通路的改变 (TGF- $\beta$  通路、Wnt 通路等),这些变化共同抑制 EMT 的发生,促进细胞向 RPE 分化并提高传代次数,但是这些细胞通路之间的联系并不十分清楚,不过 Croze 等在另一项研究中证实了

ROCK 抑制剂能够促进细胞的增殖以及细胞间的紧密连接。

### 5 Wnt 通路与 RPE 的上皮间充质转化

Wnt 通路是指通过 Wnt 蛋白刺激细胞表面的 Frizzled 家族的受体而激活下游信号转导的通路,其主要分为经典途径, Wnt/Ca<sup>2+</sup> 途径以及极化途径,在细胞间通常以旁分泌和自分泌实现效应。Wnt 通路在生物中高度保守,并在胚胎发育中 (细胞分化方向、细胞增殖等) 起到了重要的作用,同时,在 EMT 的发生中存在部分作用<sup>[40]</sup>。Chen 等<sup>[41]</sup> 利用 Wnt 抑制剂 XAV939 阻止了 EGTA 处理的 ARPE19 细胞发生 EMT (EGTA 是一种破坏细胞紧密连接的分子),原因是抑制 Wnt 通路后可以干扰 EGF (epidermal growth factor, EGF) 和 FGF (fibroblast growth factor, FGF) 对细胞的促增殖作用,从而降低了细胞的增殖能力,抑制已发生 EMT 细胞的增殖并减缓 EMT 在部分正常 ARPE19 细胞中的发生。同时,此研究还发现抑制 Wnt 通路也可以阻止 TGF- $\beta$  激活其下游的转录因子,干扰 TGF- $\beta$  诱导 EMT,不过作用有限。除此之外, Kim 等<sup>[42]</sup> 和 Zhou 等<sup>[43]</sup> 发现当 Wnt5a 和 DDK1 (Dickkopf1) 等内源性 Wnt 抑制因子过量表达时,同样可以抑制 ARPE19 细胞发生 EMT,但是这两种抑制因子不仅仅抑制 EMT 的发生,同时也降低了 RPE 细胞的增殖,这可能是因为 Wnt 本身具有促进 RPE 增殖以及分化的作用,因为在 Leach 等<sup>[44]</sup> 的研究中发现,利用外源 Wnt 信号通路促进剂 CHIR99021 可以提高 hESC 细胞向 RPE 的分化效率;同样的,在鸡胚眼中, Steinfeld 等<sup>[34]</sup> 和 Carpenter 等<sup>[45]</sup> 发现表面外胚层分泌的 Wnt 可以促进背侧视泡细胞向 RPE 细胞分化。因此, Wnt 信号通路可能具有双向性,如果简单地抑制 Wnt 信号通路有可能会阻止 RPE 细胞的正常分化。

### 6 展望

视网膜色素上皮在维持视网膜正常结构和功能中起到了多种作用,比如参与视循环、吞噬视细胞脱落的外节、参与血-视网膜屏障的形成以及营养作用等,因此其损伤及变性是很多视网膜疾病发生发展的重要因素,上皮间充质转化是 RPE 反复损伤后出现的最主要的变化之一,它不仅造成 PVR 的发生,影响抗 VEGF 对 CNV 的治疗效果,也限制了细胞替代治疗年龄相关性黄斑变性的应用,因此阻止 RPE 发生 EMT 并使已经发生 EMT 的 RPE 逆转成为具有正常功能及结构的细胞对于疾病治疗以及改善内眼手术的预后有着极其重要的意义。从各项研究结果以及我们的研究总结来看,抑制 EMT 发生最理想的方式应当具有以下特点,即在抑制 EMT 发生的同时维持细胞的增殖能力和分化能力,这样才能够使发生 EMT 的 RPE 重新获得正常的结构与功能而不影响其他暂时健康的 RPE 细胞,如果仅仅抑制 EMT 的发生而不考虑增殖和分化能力是不合适的,也是没有办法用于临床治疗的,因此,就目前细胞水平的实验来看,利用 TGF- $\beta$  抑制剂和 ROCK 抑制剂来阻止 RPE 发生上皮间充质转化是比较有效的,因为两者不仅可以抑制 EMT 的发生也可以保证体外新接种的 RPE 细胞正常分化,但是随着细胞传代次数的增加,这两

种抑制剂又失去了阻止 RPE 细胞发生上皮间充质转化的能力。因此 EMT 的发生是复杂的,仅仅依靠某一种药物或小分子来对抗 EMT 是局限的,这是因为在不同细胞中发生 EMT 的机制都有可能不同,而这也正是造成对抗 EMT 研究的不确定性以及实验的难以重复性的主要原因。近年来,学术界越来越多地提倡精准医学,所以在解决视网膜色素上皮发生 EMT 时也应该针对细胞因子、信号通路以及细胞骨架、细胞连接等因素进行综合考虑,这样才能对因下药。与此同时,关于 EMT 的研究几乎都仅限于细胞水平,体内研究非常少,但是体内实验又是必不可少的,假使这些药物在体内也可以抑制 EMT 的发生,抗 EMT 的药物才有可能进一步进入临床试验,从而减少术后 PVR 的发生,改善手术预后;提高抗 VEGF 等抗新生血管治疗的效率;提高细胞替代治疗 ARMD 时移植细胞在视网膜下腔的存活能力和分化效率。但是体内实验对于动物实验模型有着较高要求,并且体内环境更加复杂,因此这些药物能否在体内也有同样的作用依然有待我们去探索。

#### 参考文献

- 1 Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, et al. EMT:2016. *Cell* 2016;166(1):21-45
- 2 刘帅,金海鹰. 上皮-间充质转化在增生性玻璃体视网膜病变发病机制中的作用. *国际眼科纵览* 2016;40(4):266-271
- 3 Tamiya S, Kaplan HJ. Role of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* 2016;142:26-31
- 4 Daniel E, Toth CA, Grunwald JE, et al. Risk of scar in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* 2014;121(3):656-666
- 5 Ishikawa K, Kannan R, Hinton DR. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2015;142:19-25
- 6 沈涵,刘庆淮,袁松涛. 老年性黄斑变性视网膜色素上皮细胞替代治疗研究进展. *中华眼底病杂志* 2016;32(1):92-96
- 7 Alexander P, Thomson HA, Luff AJ, et al. Retinal pigment epithelium transplantation: concepts, challenges, and future prospects. *Eye* 2015;29(8):992
- 8 Lee SC, Kwon OW, Seong GJ, et al. Epitheliomesenchymal transdifferentiation of cultured RPE cells. *Ophthalmic Res* 2001;33(2):80-86
- 9 Alverve PV, Berglin L, Gouras P, et al. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994;32(12):707-716
- 10 Da CL, Fynes K, Georgiadis O, et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol* 2018;36(4):328-337
- 11 Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England J Med* 2017;376(11):1038
- 12 Singh R, Phillips MJ, Kuai D, et al. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(10):6767-6778
- 13 Radeke MJ, Radeke CM, Shih YH, et al. Restoration of mesenchymal retinal pigmented epithelial cells by TGFβ pathway inhibitors: implications for age-related macular degeneration. *Genome Med* 2015;7(1):58

- 14 袁松涛,薛志刚,林卿,等. 胎儿视网膜色素上皮细胞的原代培养和体外增殖能力的测定. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)* 2014;1(1):13-16
- 15 Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178-196
- 16 Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming Growth Factor-β Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol* 2017;27(9):658-672
- 17 Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(10):616-630
- 18 Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-β signaling. *Cell Res* 2009;19(1):128
- 19 Parapuram SK, Chang B, Li L, et al. Differential effects of TGF beta and vitreous on the transformation of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(12):5965-5974
- 20 Vogt J, Traynor R, Sapkota GP. The specificities of small molecule inhibitors of the TGFβ and BMP pathways. *Cell Signal* 2011;23(11):1831-1842
- 21 Shih YH, Radeke MJ, Radeke CM, et al. Restoration of Mesenchymal RPE by Transcription Factor-Mediated Reprogramming. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(1):430
- 22 Ishikawa K, He S, Terasaki H, et al. Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium and development of proliferative vitreoretinopathy. *Sci Rep* 2015;5(1):16386
- 23 Du D, Katsuno Y, Meyer D, et al. Smad3-mediated recruitment of the methyltransferase SETDB1/ESET controls Snail1 expression and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep* 2017;19(1):e201744250
- 24 Ji X, Wang H, Wu Z, et al. Specific Inhibitor of Smad3 (SIS3) Attenuates Fibrosis, Apoptosis, and Inflammation in Unilateral Ureteral Obstruction Kidneys by Inhibition of Transforming Growth Factor β (TGF-β)/Smad3 Signaling. *Med Sci Monit* 2018;24:1633-1641
- 25 Choudhary P, Booth HD, Gutteridge A, et al. Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage. *Stem Cells Translational Med* 2017;6(2):490-501
- 26 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
- 27 Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 2010;7(1):64-77
- 28 Higgins DF, Ewart LM, Masterson E, et al. BMP7-induced Pten inhibits Akt and prevents renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863(12):3095-3104
- 29 Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone Morphogenetic Protein-7 Induces Mesenchymal to Epithelial Transition in Adult Renal Fibroblasts and Facilitates Regeneration of Injured Kidney. *J Biol Chem* 2005;280(9):8094-8100
- 30 Scheel C, Eaton EN, Li SH, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 2011;145(6):926
- 31 Yin M, Tissari M, Tamminen J, et al. Gremlin-1 is a key regulator of the invasive cell phenotype in mesothelioma. *Oncotarget* 2017;8(58):98280-98297
- 32 Yao H, Li H, Yang S, et al. Inhibitory Effect of Bone Morphogenetic Protein 4 in Retinal Pigment Epithelial-Mesenchymal Transition. *Sci Rep* 2016;6(1):32182
- 33 Müller F, Rohrer H, Vogel-Höpker A. Bone morphogenetic proteins

specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo. *Development* 2007;134(19):3483

34 Steinfeld J, Steinfeld I, Coronato N, *et al.* RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling. *Development* 2013;140(24):4959-4969

35 Riento K, Ridley AJ. Rocks; Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:446-456

36 Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 2000;261(1):44-51

37 Ni Y, Qin Y, Fang Z, *et al.* ROCK inhibitor Y-27632 promotes human retinal pigment epithelium survival by altering cellular biomechanical properties. *Curr Mol Med* 2017;17(9):637-646

38 Croze RH, Buchholz DE, Radeke MJ, *et al.* ROCK Inhibition Extends Passage of Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Translational Med* 2014;3(9):1066-1078

39 Croze RH, Thi WJ, Clegg DO. ROCK Inhibition Promotes Attachment, Proliferation, and Wound Closure in Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium. *Transl Vis Sci Technol* 2016;5(6):7

40 Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(12):767-779

41 Chen HC, Zhu YT, Chen SY, *et al.* Wnt Signaling Induces Epithelial-Mesenchymal Transition with Proliferation in ARPE-19 Cells upon Loss of Contact Inhibition. *Lab Invest* 2012;92(5):676-687

42 Kim JH, Park S, Chung H, *et al.* Wnt5a attenuates the pathogenic effects of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human retinal pigment epithelial cells via down-regulating  $\beta$ -catenin and Snail. *Bmb Reports* 2015;48(9):525-530

43 Zhou J, Jiang J, Wang S, *et al.* DKK1 inhibits proliferation and migration in human retinal pigment epithelial cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Exp Therapeutic Med* 2016;12(2):859

44 Leach LL, Buchholz DE, Nadar VP, *et al.* Canonical/ $\beta$ -catenin Wnt Pathway Activation Improves Retinal Pigmented Epithelium Derivation from Human Embryonic Stem Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(2):1002-1013

45 Carpenter AC, Smith AN, Wagner H, *et al.* Wnt ligands from the embryonic surface ectoderm regulate 'bimetallic strip' optic cup morphogenesis in mouse. *Development* 2015;142(5):972-982