

大鼠视网膜干细胞的增殖和多向分化**

余德立¹, 余资江²

Proliferation and multi-differentiation of retinal stem cells in rats

Yu De-li¹, Yu Zi-Jiang²

Abstract

BACKGROUND: Domestic studies on *in vitro* isolation and identification of retinal stem cells are still in the preliminary exploration stage.

OBJECTIVE: To isolate, culture and identify the retinal stem cells from newborn rats *in vitro* and to investigate the cell multi-differentiation capacity.

METHODS: The cells derived from the ciliary marginal zone (CMZ) of newborn 24-hour SD rats were isolated and cultured *in vitro*. The proliferating capacity and differentiating properties of the cultured cells were studied by using immunocytochemistry methods.

RESULTS AND CONCLUSION: The isolated cells derived from CMZ cultured in serum-free medium could give rise to neural spheres in the presence of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor. These cells could proliferate successively and generate secondary neural spheres, thus displaying potential to self-renew. These neural spheres could be expanded for up to 8 passages and could express constantly the neuroectodermal marker Nestin and Chx-10, a retinal stem cell marker, showing the undifferentiated stem cells properties *in vitro*. Analysis of the differentiation potential of the cultured cells *in vitro* showed that the cultured cells derived from CMZ were multipotential. Upon withdrawal of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor, and by addition of serum, the stem cells expressed cell type specific markers corresponding to neurons and glia, such as NSE, GFAP, Opsin, PKC, and β -tubulin.

Yu DL, Yu ZJ. Proliferation and multi-differentiation of retinal stem cells in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(6): 1015-1018. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 国内对视网膜干细胞的体外分离培养及鉴定仍处于初步探索阶段。

目的: 体外分离、培养及鉴定新生大鼠视网膜干细胞, 探讨其多向分化潜能。

方法: 用神经干细胞无血清培养方法分离和培养新生 24 h 的 SD 大鼠睫状体细胞, 第 6 代视网膜干细胞经胎牛血清诱导分化, 应用免疫细胞化学方法检测视网膜干细胞的分化特性。

结果与结论: 体外培养的细胞球具有连续克隆能力, Nestin 抗原阳性, BrdU 标记结果显示悬浮细胞团主要由分裂增殖的细胞组成, 并表达胚胎发育早期视网膜内原始细胞的特异性抗原 Chx-10; 诱导分化后的细胞表达星形胶质细胞特异性标志物 GFAP、神经元特异性标志物 NSE、感光细胞标志物 Opsin、双极细胞特异性抗原 PKC 和节细胞特异性抗原 β -tubulin, 实验初步证实培养的视网膜干细胞具有神经干细胞特性, 能自我更新和增殖分化成为感光细胞类型的细胞。

关键词: 视网膜干细胞; 细胞培养; 无血清; 细胞分化; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.06.015

余德立, 余资江. 大鼠视网膜干细胞的增殖和多向分化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(6):1015-1018.

[http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

视网膜变性疾病如年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性、Stargardt病等已成为世界范围内的主要致盲眼病之一, 此类疾病发生机制复杂, 感光细胞的丧失和凋亡是视网膜变性的共同特征, 造成永久性的视力丧失。目前在这类疾病的治疗中感光细胞的再生和视功能重建等根本问题一直未能取得突破性进展^[1]。

近年来发现哺乳动物的睫状缘区(Ciliary marginal zone, CMZ)存在视网膜干细胞(retinal stem cells, RSCs)^[2-3], 其在体外培养、分化与移植方面的研究为有效治疗致盲性眼病带来了希望^[4]。本实验拟在体外分离培养新生SD大鼠

睫状缘区视网膜干细胞, 探讨其多向分化潜能, 以期对视网膜变性疾病的细胞移植提供实验基础。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2010-10/2011-06在贵阳医学院人体解剖学实验室完成。

材料:

实验动物: 新生24 h内的SD大鼠20只, 由贵阳医学院实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(黔)2002-0001。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

¹Department of Ophthalmology, the Second Hospital Affiliated to Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou Province, China; ²Department of Anatomy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Yu De-li, Master's supervisor, Associate chief physician, Department of Ophthalmology, the Second Hospital Affiliated to Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou Province, China
ydlzyj@126.com

Supported by: the Science and Technology Plan of Guizhou Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 2009-96*; the Science Research Program of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, No. 2007-20*

Received: 2011-06-21
Accepted: 2011-08-06

¹ 贵阳中医学院临床二系眼科, 贵州省贵阳市 550001; ² 贵阳医学院人体解剖学教研室, 贵州省贵阳市 550004

余德立, 女, 1970年生, 重庆市人, 1994年贵阳医学院毕业, 硕士生导师, 副主任医师, 主要从事中西医结合眼科临床、教学和科研。
ydlyzj@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2012)06-01015-04

收稿日期: 2011-06-21
修回日期: 2011-08-06
(20110621009/M·W)

主要试剂:

主要试剂	来源
DMEM/F12(1:1)培养液、B27、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)	美国 Gibco 公司
100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素	北京华美生物工程公司
胎牛血清	杭州四季青
抗 GFAP IgG、抗 β -tubulin IgG、抗 IgG-FITC、IV型胶原酶、胰蛋白酶、抗 PKC	美国 Sigma 公司
抗 Nestin IgG、抗 Chx-10 IgG、抗 NSE IgG、SABC-Cy3 免疫荧光试剂盒	武汉博士德公司
BrdU 及抗 BrdU IgG	北京中山公司
抗 Opsin IgG	福建迈新公司

实验方法:

SD大鼠睫状缘区的分离及培养: 新生24 h内的SD大鼠, 断颈处死后, 置于体积分数为75%乙醇中消毒5 min, 取出眼球, 浸泡于D-Hank's液中, 在解剖显微镜下, 首先剔除眼球外组织及视神经, 在角巩膜缘后3.0~4.0 mm处环形剪开眼球, 仔细去除晶状体、玻璃体及视网膜, 取出睫状体组织, 置于另一清洁玻璃皿内, 剪碎, 胶原酶(100 U/mL)消化1 h后, 0.25%胰酶消化15 min。200目不锈钢滤网过滤, 制成单细胞悬液。采用锥虫蓝染色细胞计数后以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于25 mL培养瓶, 完全培养基成分为: DMEM/F12(1:1)、1% B27、bFGF(20 $\mu\text{g/L}$)、EGF(10 $\mu\text{g/L}$), 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5%CO₂细胞培养箱中培养。培养7~9 d后, 原代悬浮细胞团传代, 以后每隔5~7 d传代1次。传代方法: 首先胶原酶消化1 h, 然后用无菌注射器(带5号针头)反复吹打, 以1:2 或1:3的比例传代。

BrdU 标记: 将BrdU溶于DMEM/F12(1:1), 过滤除菌后备用。第4, 7代细胞传代完成后, 培养瓶内加入BrdU, 其终浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 。培养5 d的第5, 8代细胞团行FITC免疫荧光检测。方法: 40 g/L多聚甲醛PB液固定20 min, PBS冲洗。0.4% Triton X-100处理30 min, 冲洗, 细胞涂片, 冷风吹干。滴加兔抗BrdU IgG(1:80), 按照博士德公司SABC-FITC 染色系统染色, 荧光显微镜观察。

Nestin 免疫荧光鉴定: 培养5 d的第5, 8代细胞团行Nestin免疫荧光检测。方法: 取出玻片后以0.1 mol/L PBS 冲洗后, 40 g/L多聚甲醛PB液固定20 min, 以PBS冲洗5 min \times 3次, 0.4%

Triton X-100处理30 min, PBS冲洗, 加入血清室温封闭20 min, 倾去血清, 加入兔抗Nestin IgG(1:100)孵育过夜(4 $^{\circ}\text{C}$), PBS洗3次, 每次5 min。空白对照用PBS代替一抗。加入SABC-Cy3, 避光室温放置30 min, 0.1 mol/L PBS洗3次, 每次5 min, 缓冲甘油封固, 荧光显微镜下观察并照相。

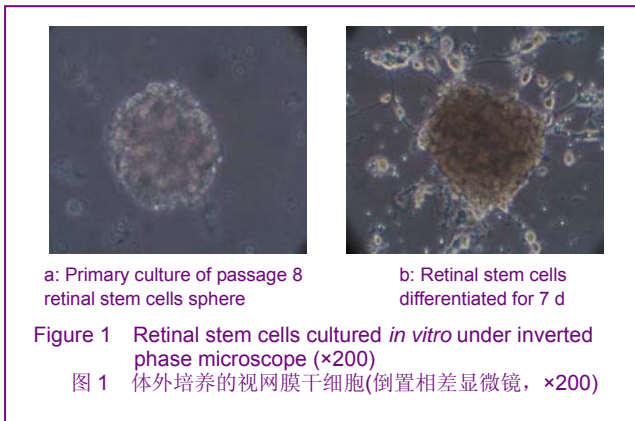
Chx-10 免疫荧光鉴定: 培养5 d的第5, 8代细胞团行Chx-10免疫荧光检测。滴加兔抗Chx-10, 过夜。PBS冲洗, 吹干。滴加即用型羊抗兔IgG-FITC, 60 min, PBS冲洗, 50%缓冲甘油封固, 荧光显微镜观察。

胎牛血清诱导细胞分化及鉴定: 选取第6代细胞, 离心、冲洗, 重新接种于培养瓶, 培养条件: DMEM/F12+体积分数为5%胎牛血清。7 d后, 大部分细胞集落经血清诱导形成放射状贴壁生长的分化细胞。选取1瓶细胞用0.25%的胰酶消化、冲洗, 均匀接种于6孔板中(预置有多聚赖氨酸处理过的盖玻片), 接种浓度 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 培养条件不变。2 d后, 收集长有细胞的盖玻片, 分别进行下列鉴定: 抗NSE、抗GFAP、抗Opsin、抗 β -tubulin、抗PKC免疫细胞或免疫荧光染色(方法同抗BrdU荧光染色)。以上实验均用0.01 mol/L PBS 替代一抗阴性对照。

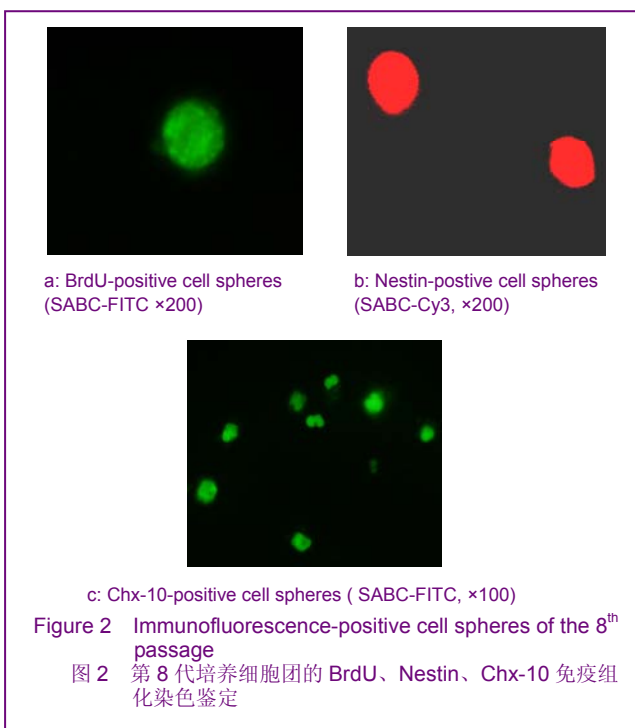
主要观察指标: ①体外培养视网膜干细胞的形态学观察。②第8代培养的视网膜干细胞团BrdU、Nestin、Chx-10免疫组化染色鉴定。③细胞分化后NSE、GFAP及感光细胞标志物Opsin、 β -tubulin、PKC免疫细胞或免疫荧光染色鉴定。

2 结果

2.1 体外培养细胞团的形态观察 原代细胞培养48 h后, 未见明显的细胞团形成, 仍为折光性强的单细胞。培养3 d后, 可见悬浮的细胞出现分裂现象, 并可见到数量较少的细胞团(2~8个细胞)形成。至第5天, 仍可见到单个细胞的分裂象, 悬浮生长的细胞团形态增大、数量增多。随着不断的适时传代, 新生的细胞团不断增多。到第8代, 形成的细胞生长活力良好, 细胞折光性强, 细胞团边缘的细胞界限清楚, 见图1a。随传代次数增加, 某些细胞团内可发现黑色或棕黄色色素细胞。第6代细胞诱导分化7 d后, 大部分细胞集落经血清诱导有细胞自细胞团周围移出, 形成放射状贴壁生长的分化细胞, 见图1b。

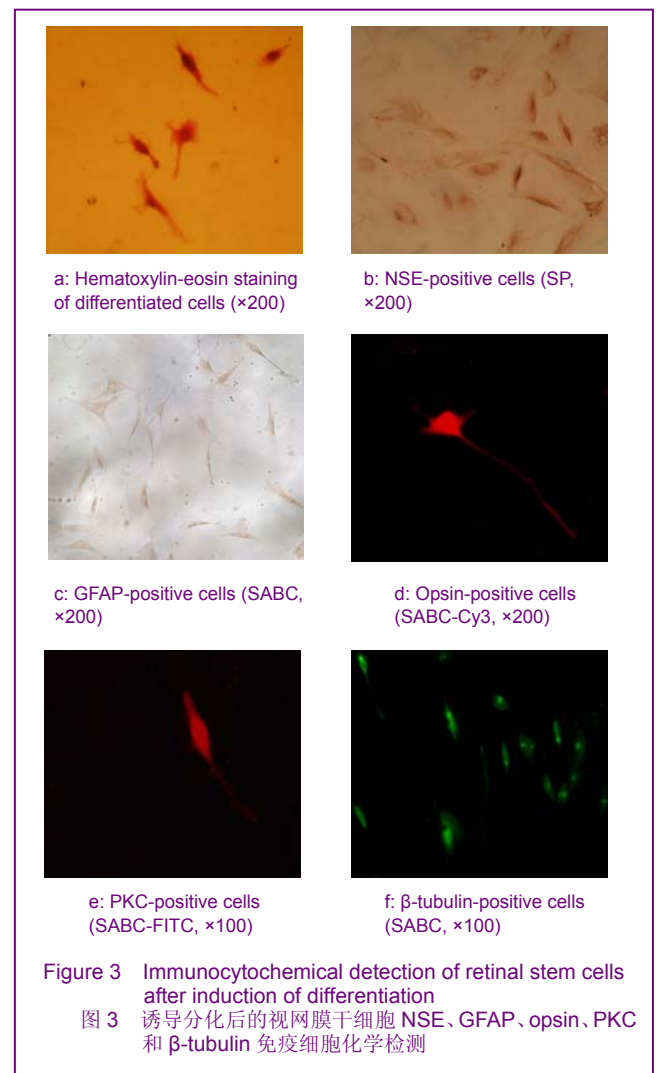


2.2 细胞团的荧光检测结果 分别对BrdU、Nestin、Chx-10抗原荧光染色, 镜下可见不同培养阶段细胞团形态不一, 均为明亮荧光。阴性对照组无荧光显示。Nestin抗原SABC-Cy3染色显示红色荧光, BrdU、Chx-10抗原IgG-FITC染色显示绿色荧光, 见图2。并且3种抗原表达经多次分离传代后无明显衰减。



2.3 分化细胞NSE、GFAP、Opsin、PKC、 β -tubulin抗原免疫细胞化学检测结果 分化细胞经常规苏木精-伊红染色示神经元样细胞形态, 细胞呈梭形、多极形, 见图3a; NSE是神经元特异性烯醇化酶, 常作为鉴定神经元的特异性标记, 镜下可见较多细胞表达NSE, 见图3b; GFAP为胶质细胞纤维酸性蛋白, 作为星形胶质细胞的特异性标志物, 在分化细胞中明显表达, 诱导4周后可见胶质细胞相互间连成片状, 胞体较大, 细胞核明显, 见图3c; Opsin为感光细胞中表达的视蛋白, 可作为鉴定感光细胞的特异性抗原。镜下阳性细胞数极少, 发红色荧光, 见图3d; PKC在视网膜研究中常作为双极

细胞的特异性抗原。荧光显微镜下发现PKC阳性细胞形态清晰, 发红色荧光, 见图3e。视网膜中 β -tubulin可在节细胞的胞体和轴突内特异表达, 见图3f。以上细胞染色和荧光检测的阴性对照均为阴性结果。



3 讨论

2000年加拿大科学家Tropepe等^[2]发现成年小鼠睫状体边缘区的视网膜色素上皮层内存在视网膜干细胞, 为视网膜损伤或变性疾病的治疗带来了希望。从神经发育上来看, 来源于视杯内部的神经上皮层被认为是哺乳动物眼发育中神经发生的位置。通过对睫状体区视网膜干细胞的成功分离, 显示了眼源性组织与脑的某些部位的相似性, 后者存在静止的神经干细胞群, 在特定生长因子作用下可增殖及自我更新^[3,5]。本实验显示, 来自大鼠睫状缘区的分离细胞体外培养可维持强烈的增殖潜能并表达神经干细胞特异性抗原Nestin。经过多次传代, 这种增殖潜能及Nestin的表达无明显衰减。

研究显示, 神经干细胞体外培养必须依赖有丝分裂

原的持续刺激作用。有丝分裂原可模拟干细胞的体内环境,在一定程度上维持干细胞的增殖及自我更新潜能。**bFGF**和**EGF**是啮齿类动物神经干细胞的有丝分裂原,这些神经干/前体细胞可来自胚胎视网膜、皮质、海马、纹状体、脊髓以及室下区, **bFGF**在视网膜中的含量较为丰富,对视网膜的神经元起支持营养作用, **EGF**可以促进视网膜干细胞长期存活, **bFGF**除了可以支持营养神经元细胞,还可促进细胞向一定方向分化。二者联合可延缓细胞衰老,减少细胞分化,保持分裂能力^[6-8]。本实验显示在**bFGF**作用下来自睫状缘区的细胞培养8代后, **Nestin**及**Chx-10**仍有较高表达,表达培养细胞仍然维持较原始的未分化状态,另外可以看出培养细胞传代后增殖及自我更新能力没有衰减。

利用细胞在分裂增殖过程中可以吸收**BrdU**而合成自身核苷酸的原理验证视网膜干细胞的增殖能力,结果显示大部分细胞**BrdU**染色阳性,为分裂增殖而产生的新生细胞,且在不断分裂增殖过程中依旧维持了这种能力^[8]。

Nestin属第IV类中间丝,是一个中等纤维骨架蛋白,它的表达起始于神经胚形成时,当神经细胞的迁移基本完成后,表达量开始下降,并随着神经细胞分化的完成而停止表达,由于视网膜来源于神经外胚层,因此**Nestin**的表达是检测视网膜干细胞的特异性标志。本实验发现不管是原代还是传代培养细胞都呈**Nestin**阳性表达。考虑这些细胞处于视网膜前体细胞向终末分化的中间阶段,在此阶段这些细胞胞质内的神经元物异性抗体合成尚未完成,因而细胞仍继续表达**Nestin**,具有分化潜能,说明分离的细胞具有神经干细胞属性^[9-10]。

Chx-10是视网膜胚胎发育阶段原始细胞表达的特异性标记,在视觉上皮的发育过程中, **Chx-10**严格地表达在视泡或视杯可生成视网膜神经感觉区的部位,而在视网膜色素上皮中则不表达,因此, **Chx-10**的表达说明从睫状缘区分离的培养细胞具有视网膜细胞的特性,可分化成视网膜各类神经元^[8,11-13]。实验发现增殖细胞**Chx-10**的表达均为阳性,且经多次传代荧光无明显衰减。体外培养的视网膜干细胞在无外源性有丝分裂原并添加血清时,可诱导细胞改变细胞周期增殖循环,进入自主分化状态。

Opsin是一种视蛋白,可作为视网膜感光细胞特异性标志物,对第6代细胞采取血清诱导的方法使其贴壁分化生长,分别检测了**Opsin**、**β-tubulin**、**PKC**呈阳性表达^[14-18]。这些具有增殖潜能及保持未分化的细胞可沿着神经元及胶质细胞途径分化,并分别表达感光细胞、节细胞及双极细胞的特异性抗原,说明分离培养的细胞具有多向分化潜能。

本实验成功分离培养了大鼠视网膜干细胞,初步证实其具有自我更新和多向分化潜能,为后续实验提供了实验依据。

4 参考文献

- [1] Abouammoh M, Sharma S. Ranibizumab versus bevacizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011;22(3):152-158.
- [2] Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*. 2000;287(5460):2032-2036.
- [3] Vossmerbaeumer U, Kuehl S, Kern S, et al. Induction of retinal pigment epithelium properties in ciliary margin progenitor cells. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2008;36(4):358-366.
- [4] Ali RR, Sowden JC. Regenerative medicine: DIY eye. *Nature*. 2011;472(7341):42-43.
- [5] Phillips MJ, Otterson DC. Differential expression of neuronal genes in Müller glia in two- and three-dimensional cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(3):1439-1449.
- [6] Angénioux B, Schorderet DF, Arsenijevic Y. Epidermal growth factor is a neuronal differentiation factor for retinal stem cells in vitro. *Stem Cells*. 2006;24(3):696-706.
- [7] Jian Q, Xu H, Xie H, et al. Activation of retinal stem cells in the proliferating marginal region of RCS rats during development of retinitis pigmentosa. *Neurosci Lett*. 2009;465(1):41-44.
- [8] Ji J, Luo M, Feng X, Yanke Xinjinzhan. 2008;28(6):429-431. 计普, 罗敏, 冯霞. 大鼠胚胎视网膜中神经干细胞的体外培养与鉴定[J]. 眼科新进展, 2008, 28(6):429-431.
- [9] Shi Q, Peng XJ, Jiefangjun Yixue Zazhi. 2009;34(11):1340-1342. 石平, 彭秀军. 新生小鼠视网膜光感受器前体细胞的体外培养及鉴定[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(11):1340-1342.
- [10] Chen HL, Yuh CH, Wu KK. Nestin is essential for zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis. *PLoS One*. 2010;5(2):e9318.
- [11] Desmaison A, Vigouroux A, Rieubland C, et al. Mutations in the LHX2 gene are not a frequent cause of micro/anophthalmia. *Mol Vis*. 2010;16:2847-2849.
- [12] Katoh K, Omori Y, Onishi A, et al. Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development. *J Neurosci*. 2010;30(19):6515-6126.
- [13] Reichman S, Kalathur RK, Lambard S, et al. The homeobox gene CHX10/VSX2 regulates RdCVF promoter activity in the inner retina. *Hum Mol Genet*. 2010;19(2):250-261.
- [14] Caporale N, Kolstad KD, Lee T, et al. LiGluR restores visual responses in rodent models of inherited blindness. *Mol Ther*. 2011;19(7):1212-1219.
- [15] Ma B, Lei X, Guan Y, et al. Maintenance of retinal cancer stem cell-like properties through long-term serum-free culture from human retinoblastoma. *Oncol Rep*. 2011;26(1):135-143.
- [16] Sheedlo HJ, Heath A, Brun AM, et al. Microscopic characterization of rat retinal progenitor cells. *Brain Res*. 2007;1185:59-67.
- [17] Nistor G, Seiler MJ, Yan F, et al. Three-dimensional early retinal progenitor 3D tissue constructs derived from human embryonic stem cells. *J Neurosci Methods*. 2010;190(1):63-70.
- [18] Sharma RK, Zhou Q, Netland PA. CNS targets support and sustain differentiation of cultured neuronal and retinal progenitor cells. *Neurochem Res*. 2011;36(4):619-626.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 贵州省中医药管理局科技计划项目(2009-96); 贵阳中医学院科研项目(2007-20)。

作者贡献: 实验设计为第一作者, 实验实施为第一作者, 实验评估为第一、第二作者, 资料收集为第一作者。第一作者成文, 第二作者审核, 第一、二作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 目前国外对视网膜干细胞的原代培养方法较多, 但国内对视网膜干细胞的体外分离培养及鉴定仍处于初步阶段, 如何有效地分离培养视网膜干细胞, 是当今眼科学界研究的热点之一, 本实验完全采用神经干细胞无血清培养和胶原酶消化方法, 成功获得原代视网膜干细胞, 初步证实培养的视网膜干细胞具有神经干细胞特性, 能自我更新和增殖分化成为感光细胞类型的细胞。