论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0504-03

大鼠胚胎视杯干细胞的分布研究

黄小勇,阴正勤,王仕军,曾玉晓 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 探索视杯干细胞在大鼠胚胎视杯内的分布及分化特点。**方法** 对胚龄11~15 d的大鼠胚胎视杯组织做连续水平位冰冻切片,特异的抗CHX10及视网膜细胞标志蛋白免疫组化染色。**结果** 12.5 d龄胚胎的CHX10阳性细胞主要集中视杯的内外层,多呈复层上皮样排列,在视杯边缘层呈簇状分布;13.5 d龄胚胎中,视杯外层细胞内出现色素,内层玻璃体侧细胞出现Thy1.1阳性细胞,14.5 d龄,内层Thy1.1阳性细胞明显增加。**结论** 视杯干细胞分布在胚胎视杯内外层和边缘层,12.5 d龄胚胎的视杯中干细胞丰富,未见分化细胞出现。

关键词: 胚胎;视杯干细胞;分布

中图法分类号: R322.91; R329.1 **文献标识码**: A

Distribution of stem cells of optic cup in rat embryos

HUANG Xiao-yong, YIN Zheng-qin, WANG Shi-jun, ZENG Yu-xiao (Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the location of embryonic optic cup stem cells during tailbud stage. **Methods** The embryonic optic cup at embryonic day 11~15 (E11~15) in rats was sectioned horizontally at 15 μm thick. The distributive characteristics of embryonic optic cup progenitor cells were revealed by immunohistochemistry. **Results** ①The distribution of optic cup progenitors was mainly aggregated on the optic cup at E12.5. CHX10-positive cells were organized as stratified epithelium arrangement on optic cup inner layer. Clusters of CHX10-positive cells were observed at the edge of optic cup; ② Pigment appeared in the outer layer of optic cup at E13.5, and differentiation into ganglion cells was initiated. **Conclusion** The distribution of optic cup stem cells is mainly aggregated on the optic cup at E12.5 in which the differentiation into ganglion cells is not initiated.

Key words: embryo; optic cup stem cell; location

视网膜干细胞移植是眼科研究的前沿[1]。国内外在胚胎干细胞[2]、神经干细胞[3]、造血干细胞[4]、成体视网膜干细胞[5]等应用于视网膜细胞移植方面开展了广泛的研究,但作为种子细胞,它们都有明显的局限性:定向分化不确切或来源困难。因此,寻找定向分化确切、易于富集、相对纯化的种子细胞有重要意义。胚眼的发育过程为此提供了线索。在眼的发育过程中,神经胚期前脑泡两侧向外突起形成视泡,以后向内凹陷形成视杯,在尾芽胚期不断分裂增厚,进入变态期后逐渐从视杯发育成胚眼,分化出各层视网膜细胞,其中神经节细胞的发生最早[6]。那么,取自神经节细胞分化出现之前的视杯细胞进行培养,理论上能得到定向分化确切的视网膜移植的种子细胞。但目前缺乏对视杯中干细胞的分布、分化特点的研究。

本研究通过对有色素的Long Evans大鼠胚胎视杯组织中视网膜干细胞特异蛋白CHX10的表达、分布,以及各种类型视网膜神经标志蛋白的鉴定,研究干细胞在早期胚胎视杯中的分布、分化特点,为进一步开展视杯中干细胞的培养、分化和移植研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Long Evans大鼠32只(美国Taconic公司),孕龄11.5~14.5 d,相差1 d为1组,体质量200~300 g,共分4组。

1.2 主要试剂及主要仪器

抗Thy1.1 IgG(Chemicon公司);抗CHX10和抗PKCα IgG(武汉博士德公司);抗Rhodopsin抗体(NeoMarkers公司);SP9001及SP9002试剂盒(北京中山公司)。

恒冷箱切片机(德国Leica公司),体视显微镜(日本Nikon公司),手术显微镜、正置式显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 方法

1.3.1 取材及固定 各胚龄的Long Evans孕鼠经10%乌拉坦腹腔麻醉后,剖腹取出胚胎,经4%多聚甲醛固定6 h,30%蔗

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270457)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270457)

作者简介:黄小勇(1973-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事视网膜疾病方面的研究。电话:(023)68754403
通讯作者:阴正勤,电话:(023) 68754401,E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-10-24;修回日期:2004-12-20

糖脱水，待沉底后取出。

1.3.2　冰冻切片　　把取出的胚胎组织修块，水平位连续冰冻切片(15 μm 片厚)、贴片。

1.3.3　免疫组织化学技术　　采用 ABC 法(DAB 显色)，按试剂盒说明操作。

2　结果

2.1　Long Evans 大鼠 11.5～14.5 d 胚胎及眼部发育情况

结果见表 1。

2.2　胚胎视杯中干细胞的分布及分化情况

2.2.1　E12.5 d 经胚胎头部作连续水平位切片免疫组化显示 CHX10 在胞浆中表达。CHX10 阳性细胞主要分布在视杯内层、外层、边缘层，在视杯内层呈复层上皮状，多呈三角形、圆形、椭圆形，呈放射状排列，与视杯内外层切面垂直，在视杯内层和外层交界处呈簇状分布，前脑泡中也有 CHX10 阳性细胞(图 4)。Thy1.1 免疫组化染色阴性(图 5)。

表 1　Long Evans 大鼠 11.5～14.5 d 胚胎及眼部发育分期表

Tab 1　Developmental stages of Long Evans rats during E11.5－14.5

Standard Stages (Witschi)	Age (d)	Size (mm)		Identification of stages	Ocular character
Tail bud Embryo	18	11.5	3.8	Somites 26-28; 3 visceral arches; arm buds recognizable.	Optic cup in pear shape, structure looms up; no pigment appears in the outer layer (Fig 1).
	25	12.5	6.2	Somites 41-42; 4 visceral arches; deep cervical sinuses; head somites disappears (Fig 2A)	Optic cup in round shape, beginning of pigment in the outer layer; start of superficial capillary formation, primary vitreous body vascularized (Fig 2B).
Metamorphosing Embryo	28	13.5	8.5	Somites 49-51; 1st visceral cleft transforms into external ear duct	Pigment appears in the outer layer of optic cup, some superficial capillary forms, blood vessel branchs in primary vitreous body (Fig 3)
	30	14.5	10.5	Somites 56-60; mandibular precartilage; nearly round opening of external ear duct.	Thick pigment appears in the outer layer of optic cup, more superficial capillary forms, blood vessel seems arborization in primary vitreous body.

Age (d): days after fertilization; Size (mm): largest and smallest dimensions

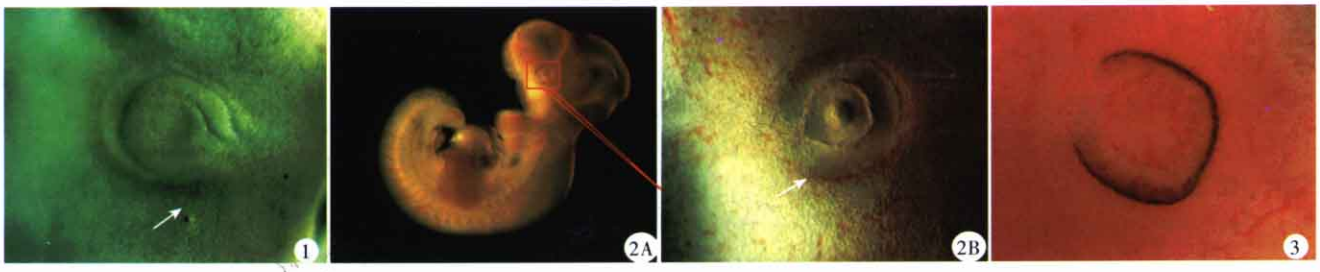


图 1　大鼠 11.5 d 胚胎视杯及其内外两层(可透见，箭头所示)　(ABC × 100)

Fig 1　The optic cup of rat in E11.5 and its two layers　(ABC × 100)

图 2　大鼠 12.5 d 胚胎视杯及其内外两层(可透见，箭头所示)

Fig 2　The optic cup of rat in E12.5 and its two layers　A: ABC × 20; B: ABC × 100

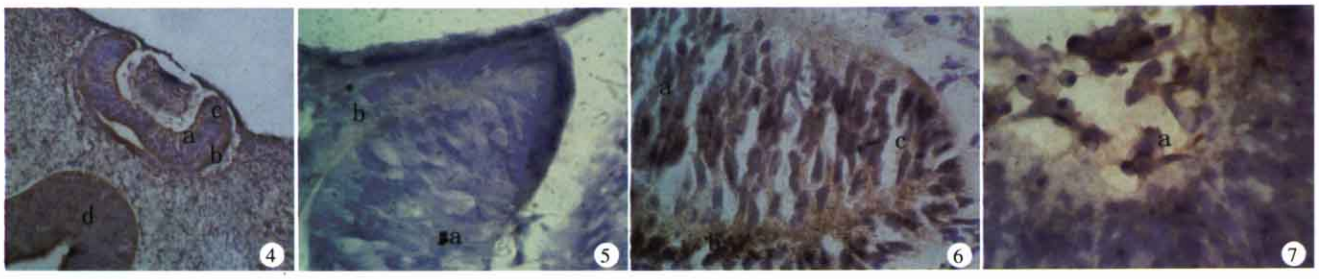
图 3　大鼠 13.5 d 胚胎视杯及其内外两层(可透见，箭头所示)　(ABC × 100)

Fig 3　The optic cup of rat in E13.5 and its two layers　(ABC × 100)

2.2.2　E13.5 d 切片显示　　胞浆中表达 CHX10 的阳性细胞主要在视杯内层、边缘层，视杯外层可见少许色素颗粒(图 6)。视杯内层晶体侧有少许细胞胞浆内出现 Thy1.1 阳性。

2.2.3　E14.5 d 切片显示　　CHX10 阳性细胞主要在视杯内层、边缘层，视杯外层可见较多色素颗粒。视杯内层晶体侧细胞呈 Thy1.1 免疫组化染色阳性，胞膜上强阳性表达，细胞发出明显的突起(图 7)。

各胚龄胚胎均未见 PKCα 和 Rhodopsin 的表达。



a: Inner layer of optic cup; b: Outer layer of optic cup; c: Edge of optic cup; d: Telencephalon

图 4　E12.5 视杯组织抗 CHX10 免疫组化染色　(ABC × 100)

Fig 4　Immunohistochemical staining of CHX10 in the optic cup of E12.5　(ABC × 100)

图 5　E12.5 视杯组织抗 Thy1.1 免疫组化染色　(ABC × 1 000)

Fig 5　Immunohistochemical staining of Thy1.1 in the optic cup of E12.5　(ABC × 1 000)

图 6　E13.5 视杯组织抗 CHX10 免疫组化染色　(ABC × 1 000)

Fig 6　Immunohistochemical staining of CHX10 in the optic cup of E13.5　(ABC × 1 000)

图 7　E14.5 视杯组织抗 Thy1.1 免疫组化染色　(ABC × 1 000)

Fig 7　Immunohistochemical staining of Thy1.1 in the optic cup of E14.5　(ABC × 1 000)

3 讨论

Long Evans 大鼠是 Wistar 大鼠和野生鼠的杂交鼠，眼部含有色素，与人视网膜结构更为接近，适合眼科学实验研究。本实验用 Long Evans 大鼠来研究胚胎视杯干细胞的定位和分化特点。

视网膜干细胞存在于各发育阶段的视杯视网膜中，视杯干细胞是视杯发育成胚眼之前的视网膜干细胞，CHX10 是视网膜胚胎发育阶段原始细胞表达的特异性标记[6]。在胚胎视网膜发生过程中，视杯干细胞最开始广泛分布于视杯的内层和外层，以后不断分裂增殖。视杯内层最终形成成年的视网膜感觉部，这种视网膜的发生层在发育期指的是视杯边缘层，在成年期指的是睫状缘区[1]。在发育过程中，视杯内层视网膜干细胞最早分化为神经节细胞[7]。Thy1.1 是视网膜神经节细胞表达的特异性标记，在胞浆内合成，最终定位于胞膜上，它的出现，意味着胚胎发育阶段的原始视网膜细胞向神经节细胞分化。在 12.5 d 的胚胎中，CHX10 阳性细胞广泛分布于视杯的内外两层和边缘层中，但前脑泡中也有表达，而且此时还未出现视网膜神经节细胞的分化，说明由于视杯刚从前脑泡中发育衍生而来，这时前脑泡细胞和视杯干细胞表现出一定的一致性。在 13.5 d 的胚胎中，CHX10 阳性细胞仍广泛分布于视杯的内层和边缘层中，而且此时视杯内层晶体侧部分细胞胞浆中出现 Thy1.1 阳性，说明这些细胞胞浆内开始合成神经节细胞的标志蛋白，可能是向神经节细胞分化进程已经启动的表现。而在 14.5 d 的胚胎中，CHX10 主要分布于视杯的内外两层靠近边缘层处，即以后发育成的视网膜睫状缘部的部位，而视杯内层晶体侧的部分细胞胞膜呈 Thy1.1 强阳性，而且伸出的突起的膜也表达 Thy1.1，说明此时视杯内层晶体侧已经出现了向神经节细胞的分化，但视杯内层外侧细胞仍保持着较原始的未分化状态。前脑泡未见 CHX10 阳性细胞，这时前脑泡细胞已经向神经细胞特化，与视杯干细胞出现了较大的差异。

在 11.5 ~ 14.5 d 龄的胚胎发育过程中 PKC 和 Rhodopsin 始终阴性，以上结果显示，12.5 d 大鼠胚胎的视杯中干细胞丰富，从视杯中取材视杯干细胞，将有可能获得较原始、未分化、更易富集的细胞。

本组研究结果显示：①尾芽胚期大鼠的胚胎视杯干细胞，主要分布于视杯内层、外层和边缘层；②12.5 d 龄大鼠胚胎视杯干细胞已经增多增厚，但还未见明显的神经节细胞分化，此时取材获得的视杯干细胞，相对较丰富。这一实验结果可能为视网膜移植提供了新的种子细胞。

（致谢：感谢第三军医大学基础医学部组织胚胎学蔡文琴教授、周德山教授、李泽桂教授的指导和帮助，感谢病理生理学教研室谭小玲博士在研究工作和论文撰写中的积极参与和大力支持。）

参考文献：

[1] Tropepe V, Coles B L K, Chiasson B J, *et al*. Retinal stem cells in the adult mammalian eye[J]. Science, 2000, 287: 2032 - 2036.

[2] Schraermeyer U, Thumann G, Luther T, *et al*. Subretinally transplanted embryonic stem cells rescue photoreceptor cells from degeneration in the RCS rats[J]. Cell Transplant, 2001, 10(8): 673 - 680.

[3] Van Hoffelen S J, Young M J, Shatos M A, *et al*. Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1): 426 - 434.

[4] Smith L E H. Bone marrow-derived stem cells preserve cone vision in retinitis pigmentosa[J]. J Clin Invest, 2004, 114(6): 755 - 757.

[5] Chacko D M, Rogers J A, Turner J E, *et al*. Survival and differentiation of cultured optic cup progenitors transplanted in the subretinal space of the rat [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268: 842 - 846.

[6] Gilbert S F, College S. Developmental biology[M]. 6th edi. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, 2000. 90 - 94.

[7] Fischer A J, McGuire C R, Dierks B D. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina[J]. J Neurosci, 2002, 22(21): 9387 - 9398.

（编辑 汪勤俭）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每3位分1节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如2,431改为2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部