论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0656-03

RCS大鼠视网膜色素变性过程中内源性干细胞激活的初步研究

陈丽峰,阴正勤,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 研究遗传性视网膜色素变性大鼠(Royal College of Surgeon's rat,RCS rat)在视网膜变性发展过程中是否有内源性视网膜干细胞(retinal stem cells,RSCs)激活。**方法** RCS-p+(视网膜含色素的变性大鼠)按出生后视网膜变性的发展状况分为变性早期(RCS 15 d)、中期(RCS 30 d)、晚期(RCS 90 d)3个时相点,分别采用相应时期的RCS-rdy+p+(视网膜含色素的正常大鼠)作为对照组(control groups, C15 d, C30 d, C90 d),每组4只8眼,对各组视网膜切片进行免疫荧光组织化学(抗Chx10)实验,以鉴定视网膜干细胞;进一步采用Western blot检测各组视网膜神经上皮总蛋白中Chx10表达。**结果** ①各正常组及变性15 d大鼠视网膜各层抗Chx10免疫荧光检测均为阴性,变性中、晚期视网膜光感受细胞层部位Chx10免疫荧光阳性;②Western blot检测各变性组视网膜神经上皮总蛋白中Chx10均有表达,但变性中期Chx10表达显著高于早期和晚期($P<0.05$)。**结论** RCS大鼠变性过程中视网膜感光细胞层出现视网膜干细胞激活。

关键词: 视网膜色素变性;感光细胞层;内源性干细胞

中图法分类号: R322.91; R329.24; R774.130.2 **文献标识码:** A

Activation of endogenous retinal stem cells in RCS rats during onset and development of retinal degeneration

CHEN Li-feng, YIN Zheng-qin, ZENG Yu-xiao (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate whether endogenous retinal stem cells can be activated in the retina of Royal College of Surgeons (RCS) rats during the onset and development of retinitis pigmentosa. **Methods** The RCS-p+ rats with inherited retinal dystrophy were divided into 3 groups: the initial stage group (15-day RCS rats), the mid-stage group (30-day RCS rats) and the advanced stage group (90-day RCS rats) according to the severity of degeneration ($n=4$ in each group). RCS-rdy+p+ rats without retinal degeneration served as controls, and divide into three groups (15-day control, 30-day control, 90-day control) matched with RCS-p+ rats. A transcription factor (Chx10) expressed by embryonic retinal progenitors was detected using immunofluorescence and Western blotting. **Results** All of the retinal layers in the three control groups and in the 15-day RCS rats did not express Chx10, while the positive expression was observed in the photoreceptor layers of the 30-day and 90-day RCS rats. Chx10 protein could be detected by Western blotting in all RCS groups, but expressed higher in 30-day RCS rats than in 15-day and 90-day RCS rats ($P<0.05$). **Conclusion** Endogenous retinal stem cells can be activated in the photoreceptor layer of RCS rat retina during the onset and development of retinitis pigmentosa.

Key words: retinitis pigmentosa; photoreceptor layer; endogenous retinal stem cells

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是属于视锥、视杆营养不良的一组遗传病,目前还没有阻止病变进展和恢复视网膜功能的治疗方法[1]。体外移植视网膜干细胞修复病变视网膜具有巨大的应用潜力,但如果能够有效地利用视网膜内源性干细胞群,无疑将与视网膜干细胞的体外移植起到相辅相成的作用。正常成人眼球中视网膜的睫状缘(ciliary marginal zone,CMZ)色素层存在视网膜干细胞,成为眼部疾病修复可能的潜在细胞来源,但数量非常有限[2]。如果能找到数量更多的内源性视网膜干细胞存在的部位,将能为眼部疾病修复提供更多潜在细胞来源。有研究表明视网膜急性损伤后,发现一种称为视锥前体细胞的内源性干细胞被激活[3],那么视网膜色素变性作为

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB724302) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Project, 2005CB724302)

作者简介: 陈丽峰(1975-),女,山西省太谷县人,博士研究生,助理研究员,主要从事视网膜色素变性疾病机制方面的研究。电话:(023)60662362,E-mail: chenlf5468@gmail.com

通讯作者: 阴正勤,电话:(023)68754401

收稿日期: 2006-02-20;**修回日期:** 2006-03-03

一种慢性刺激因素在其疾病发展过程中，是否也能发生视网膜干细胞的激活，目前国内外少见报道。本研究探讨遗传性视网膜色素变性大鼠（Royal College of Surgeon's rat，RCS rat）在视网膜色素变性过程中是否存在内源性视网膜干细胞（retinal stem cells，RSCs）的激活，并对其分布进行初步研究，为寻求挽救视网膜色素变性患者的视功能新的治疗途径提供实验依据。

RCS 大鼠为先天遗传性视网膜变性模型[4]，病理表现为随鼠龄的增加而视细胞进行性丧失。RCS 大鼠分两种 4 系：RCS 及 RCS-rdy + ，RCS-p + 及 RCS-rdy + p + ，前两种大鼠网膜不含色素，后两种大鼠网膜含色素，各自又分为病变鼠和正常鼠。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

RCS-p + 大鼠（含色素视网膜变性大鼠）12 只，体质量 250 ~ 300 g，雌雄不限，按出生后 15、30、90 d 分为 3 组，每组 4 只。应用同时同龄组 RCS-rdy + p + 大鼠（含色素正常 RCS 大鼠）各组 4 只作各组正常对照。RCS 大鼠由重庆大坪医院实验动物中心提供。

1.2　材料

早期胚胎视网膜特异性抗原（Chx10）单抗（武汉博士德公司）；FITC-山羊抗兔二抗（北京中山生物工程公司）；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG（北京中山公司）；其他试剂及聚偏二氟乙烯（PVDF）膜等购自上海生工生物工程公司；Transwell（北京康宁生物工程公司）。

1.3　实验方法

1.3.1　免疫荧光组织化学检测　　常规麻醉动物，取出眼球后固定于 4% 多聚甲醛中过夜后，移至 30% 蔗糖溶液中过夜（4℃）。沿赤道部剪开大鼠眼球，去除晶状体和玻璃体，取视网膜做冰冻切片（8 μm），保存于 -20℃。在免疫荧光组织化学实验中均设阴性对照，用 PBS 代替一抗，重复 4 次实验。步骤如下：① 冰冻切片 4% 的多聚甲醛室温下固定 15 min；② PBS漂洗，5 min × 3 次；③ 0.1% BSA 的 PBS 在 37℃下孵育 15 min；④ PBS 漂洗，5 min × 3 次；⑤ 加入兔抗大鼠 Chx-10，置于湿盒内，4℃过夜；⑥ PBS 漂洗，5 min × 3 次；⑦ 加入 FITC-山羊抗兔荧光二抗，湿盒内，37℃孵育 60 min；⑧ PBS 漂洗，5 min × 4 次，最后去离子水漂洗 1 次；⑨ 50% 甘油封片，立即荧光显微镜显色照相。

1.3.2　视网膜神经上皮总蛋白 Chx10 免疫印迹分析　　各组分别提取视网膜神经上皮总蛋白。100 μg 总蛋白与变性缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 6.8，2% SDS，2 mmol/L EDTA，pH 7.0，143 mmol/L β-巯基乙醇，10% 甘油，0.03% 溴酚蓝，8 mol/L 尿素）混合，100 ℃加热 7 min、冰上冷却后行聚丙烯酰胺凝胶电泳（5% 浓缩胶、13% 分离胶）。然后电转移至 PVDF 膜，转印膜经含 1% BSA 的 TBST 封闭 1 h，与 Chx10 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 杂交，DAB 显色，对转印膜行薄层密度扫描，采用 Bio-Rad 公司的 Quantity One4.4 图像分析软件进行扫描分析，记录相应条带的积分光密度值（INT/mm^2）。

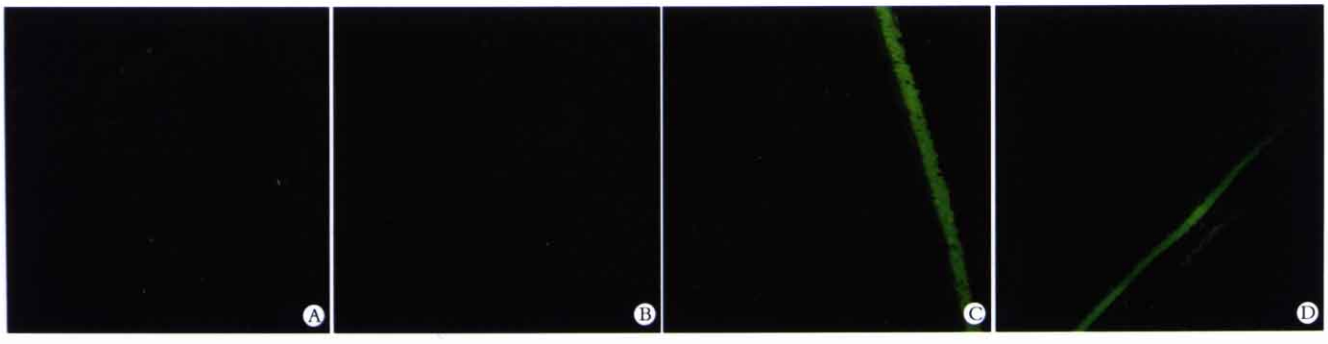
1.4　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示；采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析，各组均值的多重比较采用 LSD 法。

2　结果

2.1　免疫荧光组织化学检测

出生后 RCS-p + 大鼠 30、90 d 组视网膜光感受细胞层部位 Chx10 免疫荧光阳性（图 1）；各正常组及 RCS-p + 大鼠 15 d 组大鼠视网膜各层免疫荧光检测均为阴性。出生后 RCS-p + 大鼠 30、90 d 组视网膜光感受细胞层部位 Chx10 免疫荧光阳性。

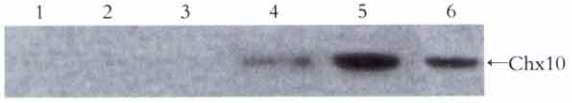


A：正常组；B：RCS-p + 大鼠 15 d 组；C：RCS-p + 大鼠 30 d 组；D：RCS-p + 大鼠 90 d 组

图 1　免疫荧光组织化学检测 Chx10　（免疫荧光 ×400）

2.2　Western blot 检测

出生后 RCS-p + 大鼠 15、30、90 d 组视网膜神经上皮总蛋白中 Chx10 均有表达，其中出生后 RCS-p + 大鼠 30 d 组 Chx10 表达显著高于 15 d 和 90 d 组（$P < 0.05$）（图 2）；各正常组大鼠视网膜神经上皮总蛋白中 Chx10 均未检测到。



1 - 3：RCS-RDY + p + 15 d，30 d，90 d；4 - 6：RCS-p^4 15 d，30 d，90 d

图 2　Western blot 检测结果

3 讨论

近年来,体外移植视网膜干细胞修复病变视网膜具有巨大的应用潜力,如果能够有效地利用视网膜内源性干细胞群,无疑将与视网膜干细胞的体外移植起到相辅相成的作用。对于修复视网膜功能具有重要的意义。

本实验各正常组及变性 15 d 大鼠视网膜各层免疫荧光检测均为阴性,变性中、晚期视网膜光感受细胞层部位 Chx10 免疫荧光阳性;Western blot 检测各变性组视网膜神经上皮总蛋白中 Chx10 均有表达,初步证实视网膜色素变性大鼠变性过程中视网膜感光细胞层有视网膜干细胞激活。正常成年哺乳动物眼球中睫状缘(ciliary marginal zone,CMZ)色素层存在视网膜干细胞,因此我们在本研究中取材部位去除了 CMZ 区,为的是排除前人已经证实的成年哺乳动物眼球中存在的少量视网膜干细胞,结果提示在正常成年鼠眼球中并未检测到视网膜干细胞,而在同样取材部位的视网膜色素变性大鼠眼球中检测到阳性视网膜干细胞标志,这就表明实验中检测到的视网膜干细胞是在视网膜色素变性过程中被激活的。Wu 等[3] 发现,在去除晶状体的金鱼中利用氩激光对视网膜光感受层进行切削制作急性损伤模型后,一种称为视锥前体细胞的内源性干细胞被激活,由内核层向外核层迁移,可以分化为视锥和视杆细胞。Fischer 等[5] 发现,鸡视网膜急性损伤后有再生神经元的潜能,通过眼内注射毒性水平剂量的 NMDA,诱导内核层神经元如无长突细胞和双极细胞的广泛死亡。注射 1 d 后,发现内层神经细胞广泛凋亡以及小胶质细胞的活化。活化的小胶质细胞 100% 为 Müller 细胞。次日则开始表达视网膜干细胞标志,新生的细胞分布于视网膜内、外核层,保持至少 3 周。视网膜急性损伤后激活了内源性干细胞,那么视网膜色素变性作为一种慢性刺激因素在其疾病发展过程中,是否也能够发生视网膜干细胞的激活,目前国内外尚少见报道。

视网膜色素变性作为一种慢性刺激因素,是如何激活内源性视网膜干细胞的、内源性视网膜干细胞的来源是什么? 等等一系列问题尚有待进一步的研究。目前根据实验结果,我们推测可能是由于遗传性视网膜色素变性大鼠其变性的光感受细胞层释放某种刺激因子,或局部微环境产生的变化所导致内源性干细胞的激活。但这些干细胞的来源及去向,是否能够分裂增殖等具体机制和问题均尚待研究。有研究表明,成年哺乳动物脑内处于静息状态的神经干细胞,在脑缺血损伤出现某些细胞因子的作用下被激活(或抑制因子失活)[6]。内源性神经干细胞在损伤原位出现或异位增生后,在趋化因子的作用下向损伤部位迁移并分化。有实验证实,视网膜急性损伤后促有丝分裂物质表达上调是使 Müller 细胞重新进入细胞循环的因素之一[7,8]。因此视网膜色素变性过程中其变性的光感受细胞层可能也是受到这些促有丝分裂物质的调控从而使得某些细胞再次进入细胞循环。Cowan 等[9] 在 Science 报道,关于成年皮肤细胞如何重编程(reprogrammed)从而再次回到胚胎细胞,这就给科研工作者提供了一个线索,如果我们能掌握重编程过程,那么今后就可以直接将成年细胞返回到胚胎细胞,进而取代外源性干细胞的移植。

内源性视网膜干细胞的激活是非常重要和现实的问题,而能否对这种激活的视网膜干细胞进行原位特异性诱导,使其较高比例地分化为视网膜光感细胞从而能够替代变性的视网膜,将是我们今后实验的重点。本研究中,变性中期 Chx10 表达显著高于早期和晚期,这可能与视网膜色素变性的发展程度相关,但机制尚有待研究,但可以提示今后如果能够将这些内源性干细胞有效利用使其增殖并分化为特异性神经元,那么视网膜变性中期可能是比较合适的时期,此时存在有足够量的内源性干细胞,从而为从事视网膜变性损伤修复的研究者提供了一种新的治疗策略。

参考文献:

[1] LUND R D, ONO S J, KEEGAN D J, *et al*. Retinal transplantation: progress and problems in clinical application[J]. J Leukoc Biol, 2003, 74(2): 151 - 160.

[2] TROPEPE V, COLES B L, CHIASSON B J ,*et al* . Retinal stem cells in the adult mammalian eye[J]. Science, 2000, 287(5460): 2032 - 2036.

[3] WU D M, SCHNEIDERMAN T, BURGETT J, *et al*. Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(9): 2115 - 2124.

[4] CHEN Z S, YIN Z Q, CHEN S, *et al*. Electrophysiological changes of retinal ganglion cells in Royal College of Surgeons rats during retinal degeneration[J]. Neuroreport, 2005, 16(9): 971 - 975.

[5] FISCHER A J, REH T A. Muller glia are a potential source neural regeneration in the postnatal chicken retina[J]. Nat Neurosci, 2001, 4(3): 247 - 252.

[6] MICHELL A W, PHILLIPS W, BARKER R A. Can endogenous stem cells be stimulated to repair the degenerating brain? [J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56(10): 1201 - 1210.

[7] FISCHER A J, SCHMIDT M, OMAR G, *et al*. BMP4 and CNTF are neuroprotective and suppress damage-induced proliferation of Muller glia in the retina[J]. Mol Cell Neurosci, 2004, 27(4): 531 - 542.

[8] FISCHER A J, OMAR G. Transitin, a nestin-related intermediate filament, is expressed by neural progenitors and can be induced in Muller glia in the chicken retina[J]. J Comp Neurol, 2005, 484(1): 1 - 14.

[9] COWAN C A, ATIENZA J, MELTON D A, *et al*. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells[J]. Science, 2005, 309(5739): 1369 - 1373.

(编辑 薛国文)