论著

文章编号:1000-5404(2014)10-1026-05

视网膜干细胞体外诱导分化为神经节细胞的初步研究

李依瑶,叶 茂,吴 楠,王 一 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心)

[摘要] **目的** 探讨诱导视网膜干细胞(retinal stem cell,RSC)分化为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)的体外培养方法,提供视神经损伤后细胞移植治疗所需的种子细胞。**方法** 悬浮培养胎龄14 d LE大鼠来源的RSC,传2代流式细胞仪和免疫荧光鉴定后,用5%血清、BDNF、DAPT、DAPT联合BDNF 4组不同方式诱导14 d。流式细胞仪行成熟RGC特异性标志物thy1.1鉴定,并对DAPT联合BDNF组不同诱导时间点行RGC相关标志物math5、brn3b、thy1.1和神经干细胞标志物nestin、ki67表达的鉴定。**结果** 传2代的RSCs nestin、chx10、ki67表达强阳性,部分细胞math5表达阳性;5%血清、BDNF、DAPT、DAPT联合BDNF组诱导RSCs 14 d后thy1.1阳性率分别为(11.38±1.58)%、(19.10±2.29)%、(23.90±1.09)%、(31.31±2.98)%,两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。DAPT联合BDNF组诱导3~5 d后部分细胞nestin、ki67、brn3b、math5均阳性表达。**结论** 使用DAPT联合BDNF诱导,可以提高RSCs在体外分化成RGCs的比率,并且诱导3~5 d后,RGCs相关标志物出现,细胞仍具有一定增殖能力。

[关键词] 视网膜干细胞;视网膜神经节细胞;细胞培养
[中图法分类号] R322.91;R329-33;R329.21 [文献标志码] A

Differentiation of retinal stem cells into ganglion cells *in vitro*

Li Yiru, Ye Mao, Wu Nan, Wang Yi (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate how to induce the retinal stem cells (RSCs) differentiation into retinal ganglion cells (RGCs) *in vitro* in order to provide the seed cells for the repair of optic nerve injury after cell transplantation. **Methods** RSCs were isolated from the retina of LE rats at embryonic days 14, and then identified by flow cytometry and immunofluorescence staining after sub-culturing for 2 culture generations. Then the obtained cells were cultured in 4 different ways, 5% FBS (control), BDNF (10 ng/mL), DAPT (25 μmol/L), and DAPT + BDNF for 14 d. Flow cytometry was used to identify specific marker CD90.1 (thy1.1) of mature RGCs and markers math5, and brn3b, and neural stem cells' markers nestin, ki67 of DAPT + BDNF group at different time points. **Results** The obtained RSCs at passage 2 were strongly positive to nestin, chx10, and ki67, and some of them even to math5. The positive rate of thy1.1 was (11.38±1.58)%, (19.10±2.29)%, (23.90±1.09)% and (31.31±2.98)% respectively, in the RSCs cultured in the mediums containing 5% FBS, BDNF, DAPT, and DAPT + BDNF, with significant difference between any 2 groups ($P<0.05$). DAPT + BDNF induction for 3 to 5 d resulted in positive expression of nestin, ki67, brn3b and math5 in some cells. **Conclusion** DAPT + BDNF enhances the differentiation of RSCs into RGCs *in vitro*, and the cells express RGCs relative markers and remain reproductive capacity after 3 to 5 days' induction.

[**Key words**] retinal stem cells; retinal ganglion cells; cell culture

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (30901645). Corresponding author: Wu Nan, E-mail: zxhwnzzl@163.com; Wang Yi, E-mail: WangYieye@aliyun.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(30901645)
[通信作者] 吴 楠,E-mail:zxhwnzzl@163.com
王 一,E-mail:WangYieye@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140504.1525.006.html (2014-5-4)

青光眼、糖尿病、视网膜变性以及缺血性视神经病变等疾病均会引起大量视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell,RGC)损伤和进行性凋亡,从而导致视功能丧失。干细胞移植技术的出现提供了治疗这类疾病的新的希望。目前研究认为干细胞移植入视网膜可能替代感光细胞、视网膜色素上皮细胞以及神经节细胞。干细胞分化为RGC的研究进展相较于其他细胞较少,与参与RGC分化调控的机制复杂有关。胚胎和成年鼠及人的视网膜干细胞(retinal stem cell,RSC)已证明能被诱导分化为RGCs[1],但诱导分化率低,并且无法在移植宿主的视网膜内整合并形成功能[2]。因此如何提高其定向分化为目标细胞的分化率并具有一定的可塑性,是干细胞移植需要克服的难题之一。本研究以RSCs为种子细胞,用不同诱导方式对其进行诱导分化培养,观察其在不同诱导条件下分化生成RGCs的转化率,选择最合适的诱导方式,并观察不同诱导时间RGCs相关标记物的表达情况,希望找出既具有RGCs部分特性,又具有一定干细胞增殖能力的视网膜神经节样细胞,为视神经损伤后的细胞移植提供新的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

E14d LE大鼠由第三军医大学实验动物中心提供。DMEM/F12(1∶1)培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶、PBS溶液均购自美国HyClone公司,大鼠来源碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、脑源性神经因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)均购自PEPROTECH公司,DAPT(γ-Secretase Inhibitor)、多聚赖氨酸购自SIGMA公司,B27添加剂购自Gibco公司,兔来源nestin抗体购自SIGMA公司,Brn-3b抗体购于SANTA公司,兔来源Ki67抗体、小鼠来源math5购自abcam公司,小鼠来源thy1.1抗体购自BD公司,青霉素、链霉素、CY3标记驴抗山羊IgG购自碧云天公司,CY3标记羊抗兔IgG、FITC标记兔抗鼠IgG来自北京博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 RSCs细胞的分离培养 取胎龄14 d的LE大鼠,剖出眼球,在立体显微镜下,分离出白色视网膜,移入含0.125%胰酶的培养皿37 ℃消化10 min,镜下见消化为单细胞悬液后加入10% FBS终止消化。216×*g*离心5 min,弃上清。干细胞培养基(DMEM/F12 + 2% B27 + 20 ng/mL bFGF + 20 ng/mL EGF + 青链霉素双抗)重悬细胞呈单细胞溶液,以1×10^5/mL密度接种细胞于培养瓶后置于37 ℃ 5% CO_2细胞培养箱中培养。2~3 d半定量换液,5 d后传代。

1.2.2 RSCs免疫荧光细胞化学鉴定 将传2代RSC细胞216×*g*离心5 min,弃上清后加入少量培养基,滴于多聚赖氨酸包被的盖玻片上,37 ℃ 5% CO_2细胞培养箱过夜,吸取培养基,PBS漂洗5 min×3次,4% PFA室温下固定20 min,PBS漂洗5 min×3次;0.3% Triton X-100在37 ℃下孵育15 min,PBS漂洗5 min×3次;加入3% BSA 37 ℃下封闭15 min后,析出溶液,加入nestin和ki67一抗,对照组用PBS替代一抗;置于湿盒内,4 ℃过夜,PBS漂洗5 min×3次;加入对应荧光标记二抗,37 ℃下孵育1 h,PBS漂洗5 min×3次;加入DAPI室温下染核5 min,PBS漂洗5 min×3次;甘油封片,荧光显微镜下收集图像。

1.2.3 RSCs流式细胞仪检测 取出传2代的RSCs,收集1×10^6个细胞,PBS洗涤,96×*g*离心5 min;4%多聚甲醛4 ℃下固定30 min,96×*g*离心5 min;PBS重悬细胞,96×*g*离心5 min;用1 mL含0.3% Triton X-100的PBS重悬细胞,室温下放置10 min,96×*g*离心5 min;加入chx10和nestin一抗,4 ℃孵育30 min,96×*g*离心5 min后,PBS重悬细胞,96×*g*离心5 min,洗去未结合一抗,重复1次。对照组用PBS替代一抗;加入对应荧光标记二抗,4 ℃孵育30 min后,96×*g*离心5 min,去上清,PBS洗涤2次;3% FBS-PBS重悬细胞至300 μL,流式细胞仪上机检测。

1.2.4 不同方法对RSCs向RGC方向的诱导分化 取传2代的RSC细胞216×*g*离心5 min,弃上清,加入0.25%胰酶37 ℃ 5% CO_2细胞培养箱中消化5 min,10%胎牛血清终止消化,216×*g*离心5 min,弃上清。以5%血清组为对照(DMEM/F12 + 5% FBS),实验组分别加入3组不同的诱导分化培养基:DAPT组(DMEM/F12 + DAPT 25 μmol/L + 5% FBS),BDNF组(DMEM/F12 + BDNF 10 ng/mL + 5% FBS),DAPT联合BDNF组(DMEM/F12 + DAPT 25 μmol/L + BDNF 10 ng/mL + 5% FBS)。重悬细胞呈单细胞悬液后,以1×10^5/mL接种于多聚赖氨酸包被的培养瓶内,37 ℃ 5% CO_2细胞培养箱中培养,每3天换液1次,持续诱导14 d。

1.2.5 RGCs流式细胞仪检测 取出4组分化14 d的RSCs,0.25%胰酶37 ℃ 5% CO_2细胞培养箱中消化5 min,10% FBS终止消化,96×*g*离心5 min,弃上清。PBS洗涤后96×*g*离心5 min,弃上清。70%冰乙醇4 ℃下固定30 min,96×*g*离心5 min,弃上清。PBS洗涤后96×*g*离心5 min,弃上清。各加入100 μL 3% FBS的PBS重悬,每组均调整细胞密度为1×10^6/100 μL,加入抗小鼠来源thy1.1抗体,4 ℃孵育30 min,对照组用PBS替代一抗;3% FBS-PBS 96×*g*离心5 min,加入FITC标记山羊抗鼠IgG,4 ℃避光孵育30 min,3% FBS-PBS 96×*g*离心5 min,3% FBS-PBS重悬细胞至300 μL,流式细胞仪检测,统计各诱导组thy1.1阳性率。

1.2.6 RSCs诱导分化后免疫荧光细胞化学鉴定 取传2代的RSC细胞216×*g*离心5 min,弃上清,加入0.25%胰酶37 ℃ 5% CO_2细胞培养箱中消化5 min,10% FBS终止消化,216×*g*离心5 min,弃上清。用DAPT联合BDNF诱导分化培养基分别诱导1、3、5 d,3 d换液1次。对其进行神经干细胞标

记物 nestin、ki67 和 RGC 相关 marker brn3b、math5、thy1.1 的染色，染色方法同 1.2.3，荧光显微镜下收集图像。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件对传 2 代 RSC 经 5% 血清组、BDNF 组、DAPT 组、DAPT 联合 BDNF 组诱导后的 thy1.1 阳性细胞率的流式细胞仪检测结果进行方差分析。

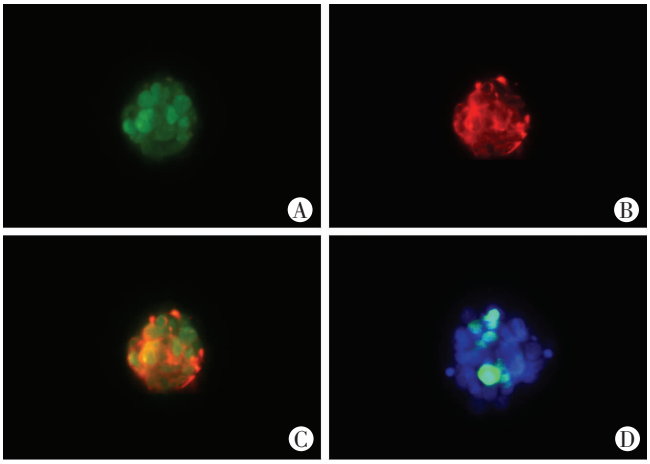
2 结果

2.1 RSC 的形态学观察

生长 2 d 时仍呈单个细胞状态，3 d 后部分细胞分裂形成 4～8 个细胞的细胞克隆球，并出现较多的细胞碎片。随时间的推移，到 5 d 时细胞克隆球数目迅速增加，体积变大呈圆形或椭圆形，悬浮生长，细胞形态规则。经传 2 代后的细胞仍具有良好的增殖能力，形态上成规则的克隆球，细胞克隆不断增大。

2.2 RSCs 免疫荧光鉴定

传 2 代 RSCs 免疫荧光鉴定神经干细胞特异性标志物 nestin阳性表达，ki67 阳性表达显示细胞处于活跃的增殖期，部分细胞 RGC 相关标志物 math5 阳性表达，brn3b 和 thy1.1 均阴性表达，说明 RSC 已启动向 RGC 方向分化的进程，但还在分化初始阶段（图 1）。



A：RSCs Ki67 抗体染色；B：RSCs Nestin 抗体染色；C：A 与 B 的融合图像；D：RSCs 部分 math5 抗体染色

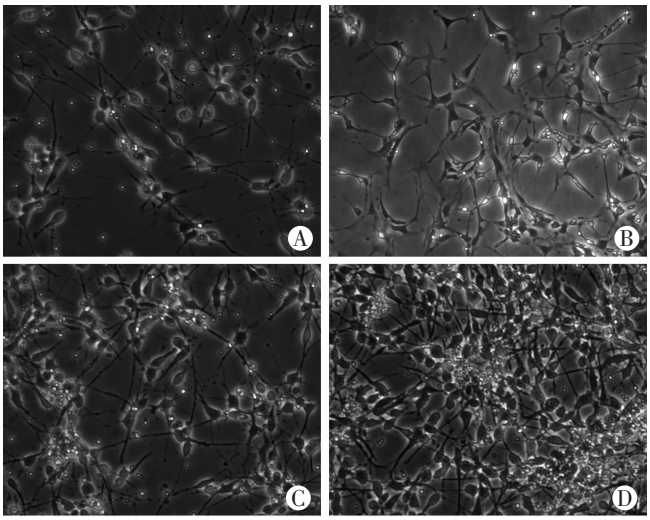
图 1 传 2 代视网膜干细胞免疫荧光鉴定结果 （荧光显微镜 ×400）

2.3 RSCs 的流式细胞仪检测结果

经流式细胞仪检测，传 2 代大鼠视网膜干细胞 RSC 标记物 chx10 纯度为 87.98%；神经干细胞标记物 Nestin 纯度为 93.34%。

2.4 不同方法对 RSCs 向 RGC 方向诱导分化后的形态学观察

传 2 代后 RSCs 经 DAPT 组、BDNF 组、DAPT 联合 BDNF 组、血清组 4 组不同诱导分化培养基诱导 14 d 后各组均出现轴突样细胞，其中 DAPT 联合 BDNF 组轴突样细胞镜下可见数量最多，轴突连接成网状结构（图 2）。



A：5% 血清组；B：BDNF 组；C：DAPT 组；D：DAPT 联合 BDNF 组

图 2 不同方法诱导分化视网膜干细胞 14 d 形态变化

（倒置显微镜 ×200）

2.5 RGCs 的流式细胞仪检测结果

应用大鼠成熟神经节细胞特异性标记物 thy1.1 对 4 组诱导分化 14 d 的 RSCs 细胞进行流式细胞仪检测，thy1.1 阳性率分别为 5% 血清组（11.38 ± 1.58）%、BDNF 组（19.10 ± 2.29）%、DAPT 组（23.90 ± 1.09）%、DAPT 联合 BDNF 组（31.31 ± 2.98）%，两两比较差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。DAPT 联合 BDNF 组 thy1.1 阳性率最高，与各组之间均有显著统计学差异（$P < 0.01$）。

2.6 RSCs 诱导分化后免疫荧光细胞化学鉴定

DAPT 联合 BDNF 诱导 RSCs、6 h 后细胞贴壁，诱导 1 d 后部分细胞 nestin、ki67、math5 阳性表达，brn3b、thy1.1 阴性表达；诱导 3 d 后部分细胞 nestin、ki67、math5 和 brn3b 阳性表达，thy1.1 阴性表达，分化的细胞已具有部分 RGCs 特性，但还未完全成熟；诱导 5 d 后 thy1.1 仍阴性表达（图 3）。

3 讨论

视神经损伤是致盲最常见的眼科疾病，损伤后修复与再生的研究包括补充外源性神经营养因子、基因治疗、组织工程修复与干细胞移植等，其中干细胞移植由于发展迅速潜力巨大成为现在研究的热点。目前干细胞移植主要的种子细胞有胚胎干细胞、诱导多能干细胞和成体干细胞，均有各自的优缺点[3]。胚胎干细胞能被诱导分化为几乎所有的细胞类型，但有致瘤性的危险，并且一直存在伦理和道德的争议[4]；诱导多能干细胞有自我更新及记忆能力等特点，并在不同微环境的条件下可以分化为不同细胞，但会通过患者自身将原有的基因缺陷再次导入使供体细胞发生病变[5]；成体干细胞由于可自体移植，无免疫排斥的问题，

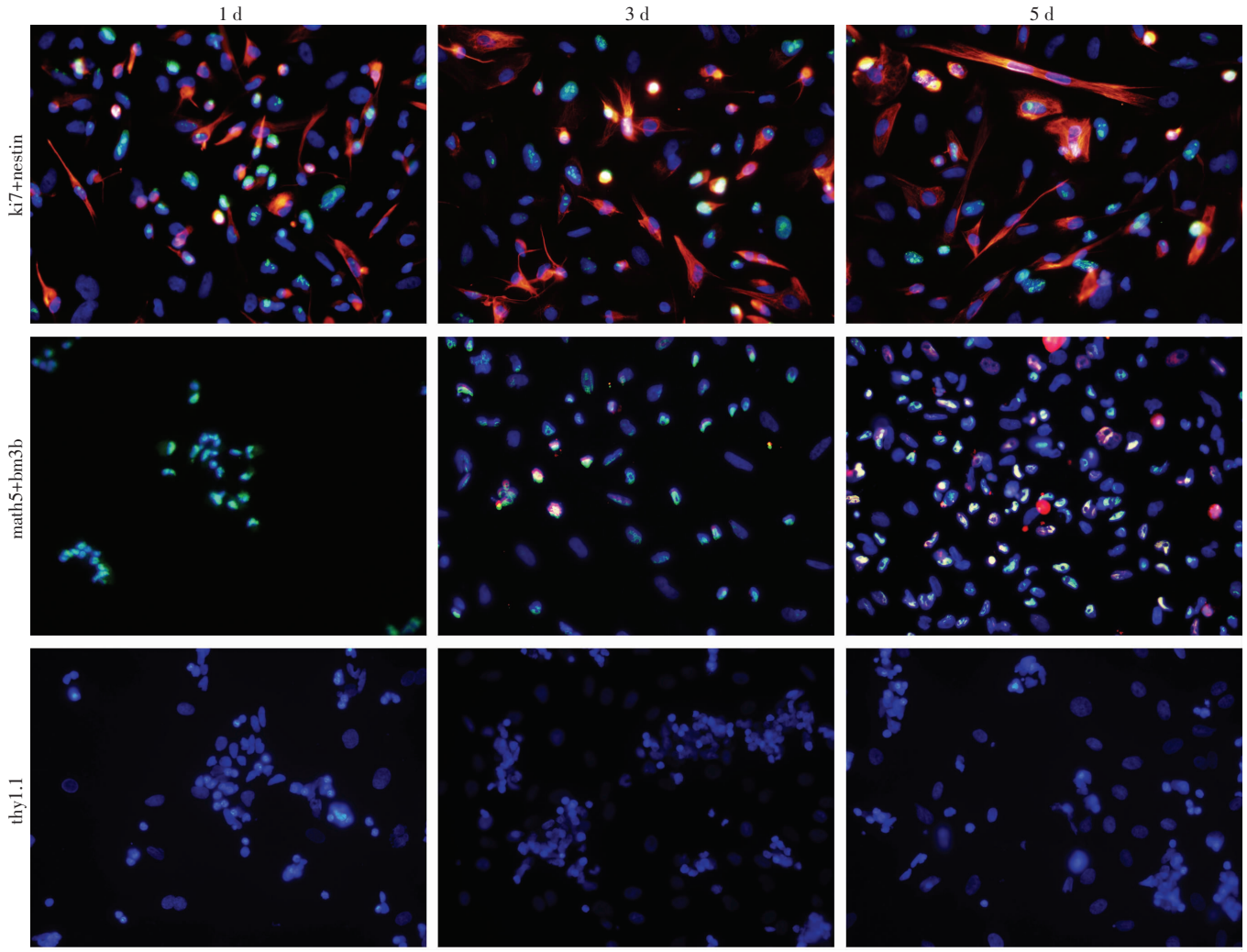


图 3　不同时间点 DAPT 联合 BDNF 诱导视网膜干细胞荧光染色观察　（荧光显微镜　×400）

但分化效率低下。视网膜干细胞作为成体干细胞的一种类型，在体外能分化成视网膜组织的各种细胞，并具有操作简单易行的特点[1,6-7]。但视神经损伤主要因大量节细胞凋亡等导致视神经难以再生，限制了视功能的恢复，所以为了补充丢失的细胞，我们通过研究视网膜干细胞向 RGCs 的定向分化，提高 RSC 向 RGC 的分化率，希望找到移植效率更高的种子细胞。而目前 RSCs 向 RGCs 诱导的方法有很多，但由于均未取得理想的纯度，现阶段尚无公认的成熟的诱导方法。

视网膜神经节细胞是视网膜最早开始发育的神经细胞，多种信号通路参与其发育的调控，其中 Notch 信号通路在视网膜神经细胞形成的过程中起着决定性作用[8]。Notch 基因存在 Notch 1 ~4 种亚型，其中 notch1 信号上调时，细胞分化被抑制，维持未分化的增殖状态[9]，当信号下调后，推动细胞开始分化，主要向较早出现的神经元方向分化。DAPT 即 γ-分泌酶抑制剂，它通过抑制 notch-1 信号通路，介导细胞之间的信号传递正向调节 RGC 的分化。现已有研究用 DAPT 成功诱导 hMGSCs 细胞分化成 RGCs 细胞[10-11]。BDNF 于 1982 年由 Barde 等首次从猪脑中分离纯化出，它广泛分布于中枢神经系统内，对神经元的分化和存活起重要作用[12-13]，能显著地促进 RGCs 存活以及轴突生长。血清是干细胞分化的天然诱导物，能诱导 RSCs 分化成多种神经细胞和胶质细胞。Math5 是视网膜开始向神经元分化最早出现的标志物，它可以促进视网膜祖细胞向 RGCs 方向分化，但并不能充分的决定 RGCs 的分化命运[14-16]，转录因子 brn3b 在 RGCs 的发育和存活中扮演了关键角色[16-17]，二者都是 RGCs 早期发育的标记物[18]。Thy1.1 是 RGCs 的特异性标记物，标志着 RGCs 已发育成熟。本研究分别用 DAPT、BDNF、DAPT 联合 BDNF、5% 血清组诱导 RSCs，观察不同诱导条件下视网膜干细胞向视网膜节细胞分

化的比率,希望找到目前诱导效率比较高的诱导方式。结果显示,RSCs 在 DAPT 联合 BDNF 诱导条件下,分化为 thy1.1 阳性细胞的比例最高,为(31.31 ± 2.98)%,与其他各组相比有显著统计学差异,提示 DAPT 联合 BDNF 诱导提高了 RSCs 向 RGCs 的分化率;BDNF 与 DAPT 单独作用依然可以提高节细胞的分化率,而在 5% 血清诱导下分化为节细胞的比例最低。虽然 DAPT 联合 BDNF 诱导 RSC 分化为节细胞优于其他诱导方式,但获得的 thy1.1 阳性细胞比例仍较低,是否会有更好的诱导和改进的方法有待进一步研究。DAPT 联合 BDNF 诱导 RSCs3-5dRGCs 相关标志物 brn3b、math5 均阳性表达,thy1.1 仍阴性表达,说明神经节细胞仍处在发育过程中,且尚未完全成熟。此时部分细胞 ki67 和 nestin 染色阳性,细胞仍具有较强的增殖能力和神经干细胞特性,说明 DAPT 联合 BDNF 诱导 RSCs 3 ~ 5 d 的细胞成为已具有一定 RGCs 特性以及自我增殖能力的视网膜神经节样细胞,可能成为干细胞移植理想的种子细胞。移植后的可塑性和功能性需要后续对在体实验进行进一步研究。

随着细胞生物学和分子生物学的发展,模拟体内 RSCs 向各神经细胞定向分化微环境的研究会越来越多,具体调控机制的研究会更加深入细化,最终通过体外诱导获得高纯度具有 RGC 功能的细胞,从而为视神经损伤后节细胞凋亡的治疗带来新的希望。

参考文献:

[1] Boyd J G, Skihar V, Kawaja M, *et al*. Olfactory ensheathing cells: historical perspective and therapeutic potential[J]. Anat Rec B New Anat, 2003, 271(1): 49 - 60.

[2] Chen M, Chen Q, Sun X, *et al*. Generation of retinal ganglion-like cells from reprogrammed mouse fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(11): 5970 - 5978.

[3] Ballios B G, van-der-Kooy D. Biology and therapeutic potential of adult retinal stem cells[J]. Can J Ophthalmol, 2010, 45(4): 342 - 351.

[4] Carr A J, Smart M J, Ramsden C M, *et al*. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration[J]. Trends Neurosci, 2013, 36(7): 385 - 395.

[5] Polo J M, Liu S, Figueroa M E, *et al*. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(8): 848 - 855.

[6] Klassen H, Sakaguchi D S, Young M J. Stem cells and retinal repair [J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(2): 149 - 181.

[7] Bi Y Y, Feng D F, Pan D C. Stem/progenitor cells: a potential source of retina-specific cells for retinal repair[J]. Neurosci Res, 2009, 65(3): 215 - 221.

[8] Walker L, Carlson A, Tan-Pertel H T, *et al*. The notch receptor and its ligands are selectively expressed during hematopoietic development in the mouse[J]. Stem Cells, 2001, 19(6): 543 - 552.

[9] Ahmad I, Das A V, James J, *et al*. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(1): 53 - 62.

[10] Becker S, Singhal S, Jones M F, *et al*. Acquisition of RGC phenotype in human Müller glia with stem cell characteristics is accompanied by upregulation of functional nicotinic acetylcholine receptors [J]. Mol Vis, 2013, 19: 1925 - 1936.

[11] Singhal S, Bhatia B, Jayaram H, *et al*. Human Muller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors *in vitro* and partially restore RGC function *in vivo* following transplantation[J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(3): 188 - 199.

[12] Zhou X, Xia X B, Xiong S Q. Neuro-protection of retinal stem cells transplantation combined with copolymer-1 immunization in a rat model of glaucoma[J]. Mol Cell Neurosci, 2013, 54: 1 - 8.

[13] Lepski G, Maciaczyk J, Jannes C E, *et al*. Delayed functional maturation of human neuronal progenitor cells *in vitro*[J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 47(1): 36 - 44.

[14] Prasov L, Glaser T. Pushing the envelope of retinal ganglion cell genesis: context dependent function of Math5 (Atoh7)[J]. Dev Biol, 2012, 368(2): 214 - 230.

[15] Brzezinski J A 4th, Prasov L, Glaser T. Math5 defines the ganglion cell competence state in a subpopulation of retinal progenitor cells exiting the cell cycle[J]. Dev Biol, 2012, 365(2): 395 - 413.

[16] Moshiri A, Gonzalez E, Tagawa K, *et al*. Near complete loss of retinal ganglion cells in the math5/brn3b double knockout elicits severe reductions of other cell types during retinal development[J]. Dev Biol, 2008, 316(2): 214 - 227.

[17] Badea T C, Nathans J. Morphologies of mouse retinal ganglion cells expressing transcription factors Brn3a, Brn3b, and Brn3c: analysis of wild type and mutant cells using genetically-directed sparse labeling [J]. Vision Res, 2011, 51(2): 269 - 279.

[18] Jagatha B, Divya M S, Sanalkumar R, *et al*. *In vitro* differentiation of retinal ganglion-like cells from embryonic stem cell derived neural progenitors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(2): 230 - 235.

(**收稿**:2014-02-26;**修回**:2014-04-04)

(编辑 张 维)