DOI:10.16016/j.1000-5404.201501041

论著

# Mitf和Pax6基因在小鼠胚胎干细胞向视网膜色素上皮细胞分化过程中的表达

吴昊芊[1],彭广华[2],阴正勤[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心,视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室[1];100853 北京,解放军总医院眼科[2])

[摘要] **目的** 探讨Mitf和Pax6基因在小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells,mESCs)向视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)细胞分化过程中的表达规律及其作用。**方法** 免疫荧光染色、流式细胞仪检测分化前mESCs株在不同代数的干性标志表达情况。采用悬浮培养加诱导剂形成拟胚体(embryoid bodies,EBs)的方式诱导mESCs向RPE细胞分化,在分化前第0天,分化后第10、40天,采用流式细胞仪检测Mitf和Pax6在细胞中的表达规律及其与mESCs向RPE细胞分化的关系。**结果** mESCs株AB1在持续传代过程中形态一致且其干性标志SSEA1表达比例在不同代数之间差异无统计学意义($P>0.05$)。分化所得细胞的RPE细胞成熟标志Bestropih、CRALBP、RPE65的表达比例分别为(61.6±2.4)%、(31.0±3.9)%、(57.8±2.0)%。在分化前第0天,Mitf、Pax6的表达比例分别为(1.7±1.5)%、(6.5±0.2)%,分化第10天分别为(28.5±7.2)%、(60.2±15.6)%,分化第40天分别为(5.7±2.1)%、(4.6±0.6)%。**结论** 在mESCs向RPE细胞的分化过程中,Mitf和Pax6均呈先上升后下降的趋势,提示Mitf和Pax6参与了RPE细胞的分化过程。

[关键词] 胚胎干细胞;分化;视网膜色素上皮细胞;Mitf;Pax6
[中图法分类号] R322.91; R329.2; R394.2 [文献标志码] A

# Mitf and Pax6 are involved in differentiation of mouse embryonic stem cells to retinal pigment epithelium

Wu Haoqian[1], Peng Guanghua[2], Yin Zhengqin[1] ([1]Center of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Visual Damage and Regeneration & Restoration, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression profiles and roles of transcription factors Mitf and Pax6 in the differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs) to retinal pigment epithelium (RPE). **Methods** The cell marker of mESCs, SSEA1, was stained with immolunofluorescence and analyzed by fluorescence activated cell sorter (FACS) during the differentiation of ESCs to RPE. The serum-free embryoid body-like (SFEB) culture was performed to induce the differentiation of mESCs into RPE. Flow cytometry was used to analyze RPE precursor markers, Mitf and Pax6, before differentiation (Day 0), during differentiation (Days 10 and 40). **Results** During the passaging, the morphology of ESCs kept consistent and there was no statistically significant change in the level of embryonic marker SSEA1 ($P>0.05$). RPE-like cells were induced from mESCs by serum-free embryoid body-like method. In 40 d after differentiation, (61.6±2.4)% of cells were Bestrophin positive, (31.0±3.9)% of cells CRALBP positive, and (57.8±2.0)% of cells RPE65 positive. Before differentiation, (1.7±1.5)% of mESCs expressed Mitf and (6.5±0.2)% expressed Pax6. In 10 d after differentiation, (28.5±7.2)% of cells were Mitf positive and (60.2±15.6)% of cells were Pax6 positive. In 40 d after differentiation, (5.7±2.1)% of cells were Mitf positive and (4.6±0.6)% of cells were Pax6 positive. **Conclusion** Both the ratios of Mitf and Pax6 positive cells were raised and then dropped down during differentiation of mESCs to RPE cells, suggesting that Mitf and Pax6

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2013CB967001)
[通信作者] 阴正勤,E-mail:yzhengqin@163.com
彭广华,E-mail:peng63088@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.0959.004.html(2015-04-21)

are involved in the differentiation of mESC to RPE.

[**Key words**] mouse embryonic stem cells; differentiation; retinal pigment epithelium; Mitf; Pax6

Supported by the National Key Basic Research Program (973 Program, 2013CB967001). Corresponding authors: Yin Zhengqin, E-mail: yzhengqin@163.com; Peng Guanghua, E-mail: peng63088@163.com

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa,RP)是视网膜光感受细胞和视网膜色素上皮变性引起的致盲性、遗传性眼病,目前尚无治愈方法[1]。干细胞移植是治疗RP最具前景的治疗手段。其中胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)是一类具有无限扩增和多向分化潜能的干细胞,其中人胚胎干细胞来源的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)细胞已经成功用于干性老年黄斑变性和Stargart病的Ⅰ/Ⅱ期临床治疗,初步证实其在治疗视网膜色素变性疾病中的安全性和有效性[2]。

RPE位于视网膜神经上皮和脉络膜毛细血管层之间,具有特殊的结构和生理机能[3]。在脊椎动物,RPE来源于视杯的神经外胚叶外层,经过一系列诱导作用和时间、空间上的协调,形成成熟的RPE细胞,是体内最早产生黑色素的细胞。在视泡早期,视觉神经上皮的发育主要受多种细胞外转录因子和眼外间叶细胞分泌因子的影响,包括转化生长因子-β超家族(transforming growth factor β family,TGF-β)中的骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)和活化素A(activin A)以及成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors,FGFs)等[4]。目前研究表明,在成熟视泡向视杯发育的过程中,RPE细胞和视网膜神经元先后由同一视网膜前体细胞分化而来,参与RPE发育过程的主要转录因子包括小眼相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor,Mitf)、同源配对盒基因6(paired-box transcription factors 6,Pax6)等[5]。本研究在体外诱导小鼠胚胎干细胞(mESCs)向RPE细胞分化的过程中,通过检测不同时间点Mitf和Pax6的表达比例,旨在探讨Mitf和Pax6基因在此过程中的表达规律及其作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠饲养层细胞株SNLBP和小鼠ES细胞株AB1由协和医科大学基础医学研究所黄粤教授惠赠。细胞培养试剂均购自美国Life Technology公司。ES细胞株培养基成分如下:DMEM、15%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS),GlutaMAX、1×青链霉素(penicillin-Streptomycin)、1×非必需氨基酸、0.1 mmol/L 2-巯基乙醇(Sigma公司)和1 000 U/mL人白血病抑制因子(LIF,Millipore公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 ES细胞培养与传代 ES细胞每天换液,细胞长满70%~80%培养皿(直径60 mm)后,以1∶3比例传代。

1.2.2 ES细胞向RPE细胞分化 第0天:ES细胞剥除饲养层细胞后计数,以$5\times10^5$/培养皿的密度接种至低黏附培养皿中,加入4 mL用10% KSR(Gibco公司)替代FBS的ES分化培养基(含100 ng/mL Dkk-1,500 ng/mL Lefty-A)。于37 ℃ 5% $CO_2$孵箱中孵育72 h。分化第1天可见拟胚体(embryonic bodies,EBs)形成。第3天用广口移液管收集EBs于15 mL离心管中,静置15 min后吸除2 mL培养基,加入2 mL新鲜分化培养基和8% FBS。将EBs接种至一个新的培养皿上,于37 ℃ 5% $CO_2$孵箱中孵育24 h。第4天向培养基中加入Activin-A,终浓度为10 ng/mL,于37 ℃ 5% $CO_2$孵箱中孵育24 h。第5天用第3天的方法细胞全量换液后,将EBs接种于提前用多聚赖氨酸、明胶处理后的培养板上,观察EBs贴壁生长状况。待EBs贴壁后开始隔天换液培养。

1.2.3 细胞免疫荧光鉴定胚胎干细胞株在传代过程中稳定表达干性标志SSEA1 将传代至P21、P26、P31的细胞用4%多聚甲醛(PFA)固定15 min,PBS漂洗3遍后加入封闭液[10%山羊血清、1%牛血清蛋白(BSA)、0.25% Triton X-100]孵育1 h,吸干封闭液后加入SSEA1浓度(Santa Cruz公司)4 ℃孵育过夜。PBS漂洗3遍后加入FITC标记的兔抗小鼠IgG,37 ℃孵育1 h后,PBS漂洗后加入DAPI核染色,PBS漂洗3遍后晾干用抗荧光淬灭剂封片。

1.2.4 流式细胞仪检测Mitf、Pax6阳性RPE前体细胞比例和Bestrophin、CRALBP、RPE65阳性色素上皮样细胞比例 将诱导分化中的细胞用0.05% Trypsin-EDTA消化为单细胞后,4% PFA室温固定30 min,离心后加入皂素溶液(BD公司)破膜30 min,离心后用皂素悬浮,以每组细胞量约$4\times10^5$个细胞分组,加入一抗室温孵育30 min,一抗用PBS稀释100倍。每组加入1 mL皂素,涡旋后离心,各管100 μL皂素悬浮,加入二抗室温避光孵育30 min。每组加入1 mL皂素,涡旋后离心,再用PBS洗1次离心后每组600 μL PBS悬浮后送检。一抗用PBS稀释100倍。

1.2.5 统计学处理 所有数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行分析,各组间比较行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 mESCs 的形态学观察

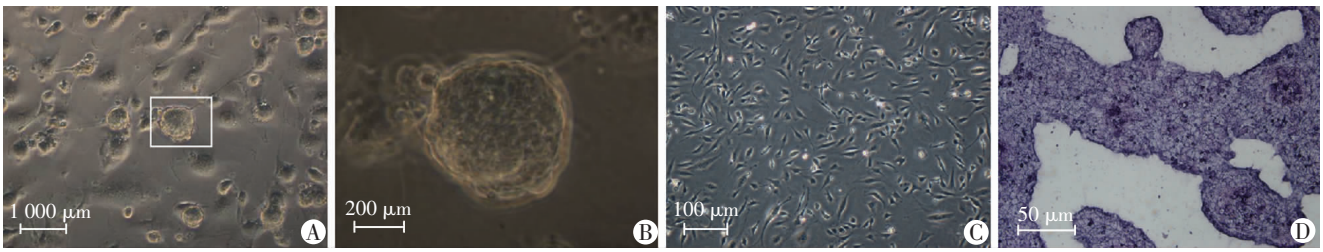
饲养层细胞贴壁生长，排列紧密呈短梭形。mESCs 生长于饲养层细胞之上，呈形状较规则、类似圆形的细胞克隆，细胞间紧密堆积，细胞界限不清。mESCs 碱性磷酸酶染色结果提示 mESCs 大部分处于未分化状态（图 1）。

### 2.2 mESCs 干性标志物的鉴定

分别对传代培养中的 P21、P26、P31 的 mESCs 进行干性标志 SSEA1 的细胞免疫荧光染色和流式细胞检测。SSEA1 阳性细胞主要集中在细胞克隆，散在细胞少见。经过流式细胞检测，结果显示传代 P21 的 mESCs 细胞群中 SSEA1 比例为（80.3 ± 4.9）%；P26 的 mESCs 细胞群中 SSEA1 比例为（74.9 ± 1.1）%；P31 的 mESCs 细胞群中 SSEA1 比例为（72.4 ± 2.3）%。mESCs 传代培养的不同代数之间干性标志 SSEA1 的表达比例两两相比差异无统计学意义（$P > 0.05$），提示 mESCs 的干性特质不会随着传代次数增加而下降（图 2、3）。

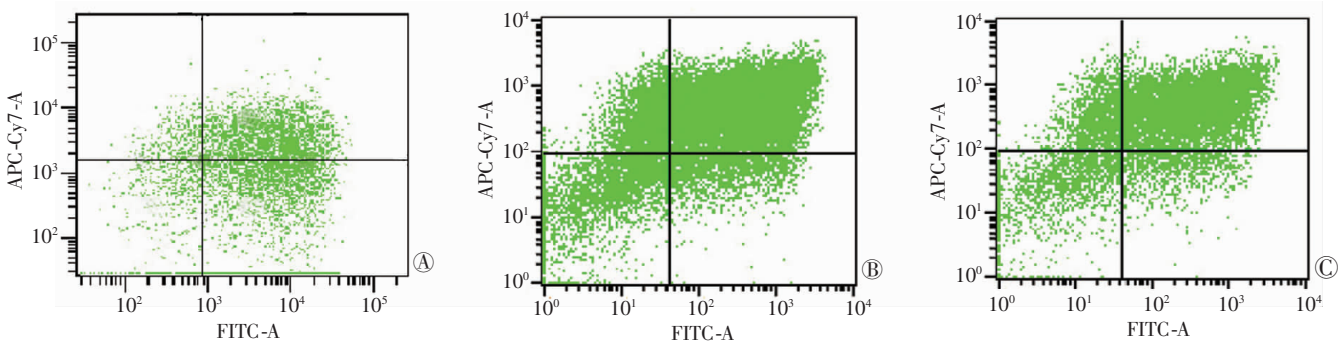
### 2.3 mESCs 向 RPE 细胞分化过程中的细胞形态学改变

mESCs 消化为单细胞后，撤除 LIF，悬浮培养 1 d 后可形成 EBs，大小较均一，随着培养天数增加，球体体积逐渐增大，相差显微镜下折光性良好（图 4A）。分化中第 6 天开始将 EBs 转为贴壁培养，EBs 贴壁后细胞逐渐从球体爬出形成单层结构（图 4B），于贴壁后第 16 天观察到连接紧密的类 RPE“铺路石”样单层细胞，胞体中可见黑色色素颗粒沉积（图 4C、D）。



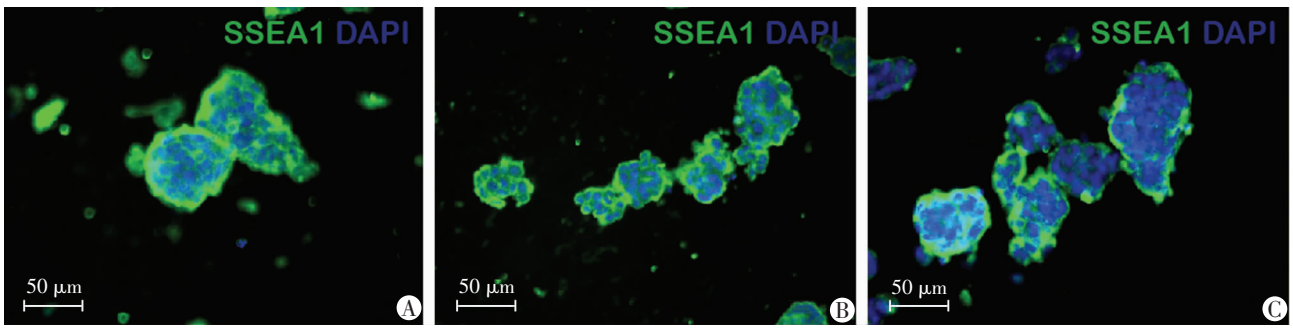

A：mESCs 呈类圆形的细胞克隆生长于饲养层细胞上，折光性好；B：A 图所框部分的放大图；C：单层生长的饲养层细胞呈梭形成纤维细胞样外观；D：mESCs 碱性磷酸酶染色，阳性表现为蓝色团块沉淀

**图 1 mESCs、饲养层细胞的形态特征及碱性磷酸酶染色** （倒置相差显微镜）



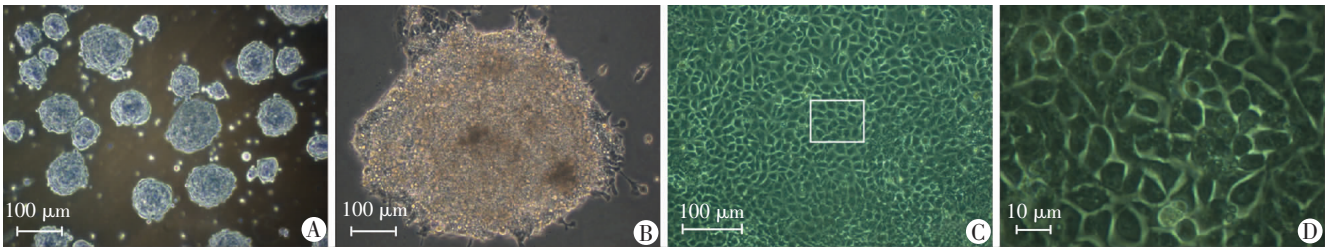

A：传代至 P21 的 mESCs 细胞群中 SSEA1 比例；B：传代至 P26 的 mESCs 细胞群中 SSEA1 比例；C：传代至 P31 的 mESCs 细胞群中 SSEA1 比例

**图 2 mESCs 传代过程中干性标志 SSEA1 的流式细胞检测结果**




A：P21； B：P26； C：P31

**图 3 mESCs 传代过程中干性标志 SSEA1 的免疫荧光检测结果** （荧光显微镜）

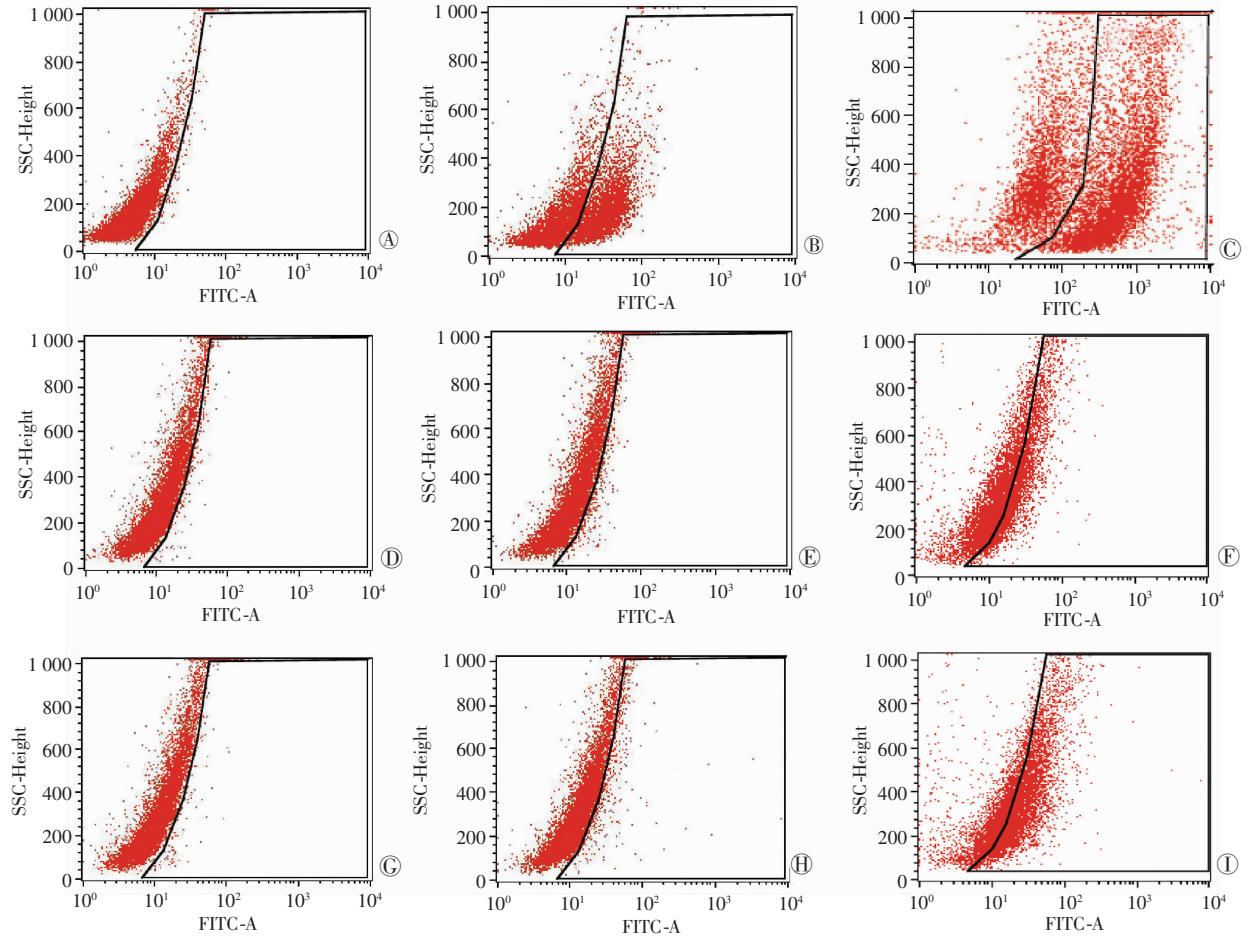



A:分化第1天mESCs聚集形成悬浮的EBs,球体形状均一,折光性好;B:分化第6天贴壁培养EBs后球体周边部逐渐爬出单层细胞;C:分化第16天开始观察到RPE细胞"铺路石"样单层细胞结构;D:C图所框部分的放大图

**图4 mESCs向RPE细胞分化过程中的细胞形态学变化** (倒置相差显微镜)

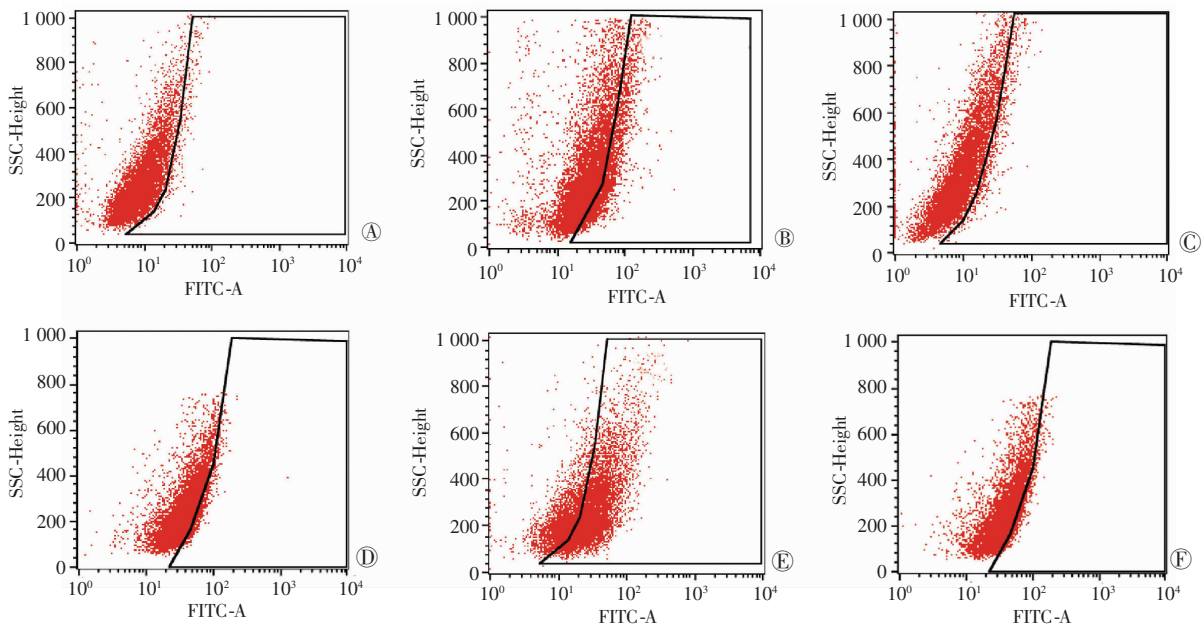
### 2.4 mESCs来源的RPE细胞鉴定

Bestrophin、RPE65和CRALBP三者是成熟RPE细胞的标志。由流式细胞检测结果可见,Bestrophin、RPE65、CRALBP在分化过程中均呈由低到高的上升趋势,其中Bestrophin较其余两者的上升时间早。分化前第0天流式细胞检测mESCs中Bestrophin比例为(1.2±0.2)%,分化第10天Bestrophin比例为(45.5±1.2)%,其与第0天相比差异具有统计学意义($P<0.01$);分化第40天Bestrophin比例为(61.6±2.4)%,其与第0、10天相比差异具有统计学意义($P<0.01$)。分化前第0天检测CRALBP比例为(2.3±0.3)%,分化第10天CRALBP比例为(6.0±0.1)%,其与第0天相比差异没有统计学意义($P>0.05$);分化第40天CRALBP比例为(31.0±3.9)%,其与第0、10天相比差异具有统计学意义($P<0.01$)。分化前第0天检测RPE65比例为(1.3±0.1)%,分化第10天RPE65比例为(4.3±2.2)%,其与第0天相比差异没有统计学意义($P>0.05$);分化第40天RPE65比例为(57.8±2.0)%,其与第0、10天相比差异具有统计学意义($P<0.01$,图5)。




A~C:Bestrophin;D~F:CRALBP;G~I:RPE65;A、D、G:第0天;B、E、H:第10天;C、F、I:第40天

**图5 mESCs向RPE细胞分化过程中成熟RPE标志的表达趋势变化**




A ~ C:Mitf;D ~ F:Pax6;A、D:第 0 天;B、E:第 10 天;C、F:第 40 天

**图 6 mESCs 向 RPE 细胞分化过程中 Mitf、Pax6 的表达趋势变化**

### 2.5 mESCs 向 RPE 细胞分化过程中 Mitf、Pax6 阳性细胞的变化趋势

分化前第 0 天流式细胞仪检测 mESCs 中 Mitf 比例为(1.7 ± 1.5)%,分化第 10 天 Mitf 比例为(28.5 ± 7.2)%,其与第 0 天相比差异具有统计学意义($P < 0.01$);分化第 40 天 Mitf 比例为(5.7 ± 2.1)%,其与第 10 天相比差异具有统计学意义($P < 0.01$),与第 0 天相比差异没有统计学意义($P > 0.05$)。分化前第 0 天流式细胞仪检测 mESCs 中 Pax6 比例为(6.5 ± 0.2)%,分化第 10 天 Pax6 比例为(60.2 ± 15.6)%,其与第 0 天相比差异具有统计学意义($P < 0.01$);分化第 40 天 Pax6 比例为(4.6 ± 0.6)%,其与第 10 天相比差异具有统计学意义($P < 0.01$),与第 0 天相比差异没有统计学意义($P > 0.05$)。由流式细胞检测结果可见 Mitf 和 Pax6 在分化过程中第 10 天达到高峰,第 40 天时两者比例明显下降(图 6)。

## 3 讨论

mESCs 是一种来自于囊胚内细胞群(inner cell mass,ICM)的全能性细胞,分离获得后在特定的培养条件和不同的刺激下可以接近无限制的增殖,并可分化为内胚层、中胚层、外胚层来源的多种组织细胞系[6]。在 1981 年,mESCs 首先由 Evans 等[7]成功分离出来。在视网膜变性疾病的干细胞移植治疗中,mESCs 被认为是一种重要的种子细胞来源,在体外它可以自发地或在特殊培养环境下分化形成 RPE 细胞等靶细胞[6]。目前,将 ESCs 体外诱导分化成 RPE 细胞的研究已经取得了一定的成果,诱导方法主要分为两种:①采用 PA6 间充质细胞系作为饲养细胞层,在无 bFGF 培养基条件下分离出 RPE 细胞并进一步扩增;②采用 mESCs 悬浮培养形成 EBs,再将 EBs 在层黏连蛋白和纤维连接蛋白或者明胶处理过的培养皿上贴壁培养后得到 RPE 细胞[8]。第 1 种方法诱导效率低、诱导时间长,本研究采用同第 2 种方法相似的诱导方法,将 mESCs 悬浮培养形成拟胚体,在诱导分化的第 1 天加入 Letfy-A 和 Dkk-1 因子,第 4 天加入 Activin-A 因子,这些因子都有促进 mESCs 向神经视网膜细胞分化的作用。于分化的第 6 天将悬浮球贴壁培养,于分化第 10 天可检测到视网膜前体细胞标志 Pax6 和 RPE 前体细胞标志 Mitf 的表达,说明成功将 mESCs 向眼前体细胞诱导。继续分化可于第 22 天开始在镜下观察到“铺路石”样的细胞结构形成,随着培养时间的延长可于镜下观察到黑色素颗粒。除了在细胞形态方面观察到了 RPE 细胞样的结构外,我们通过流式细胞技术于分化过程中的 3 个时间点分别检测了成熟 RPE 细胞标志的表达情况,发现在 mESCs 向 RPE 细胞分化的过程中上述标志均呈现先上升后下降的变化趋势,说明分化细胞在逐渐向成熟 RPE 细胞发展。本研究采用的添加诱导因子的悬浮培养法诱导 mESCs 分化为 RPE 细胞,能够达到比较满意的分化效果,对干细胞移植治疗视网膜变性疾病所需的细胞来源而言有十分重要的意义。

RPE来源于视杯的神经外胚叶外层,它的发育受多种因素影响,涉及细胞间、细胞与基质间以及细胞内部多种转录因子间相互作用的复杂过程,其中Mitf和Pax6是RPE生理发育过程中起重要作用的基因。

Mitf是由Mitf基因编码的一个拥有碱性螺旋-环-螺旋拉链(basic helix-loop-helix zipper,bHLH-Zip)结构的转录因子,其主要表达于神经嵴来源的黑色素细胞和神经上皮来源的RPE细胞[9]。特异性灭活小鼠Mitf基因可以导致RPE层过增殖和无色素形成,但视杯仍能够形成,视网膜也正常发育,原本发育成为RPE的细胞层的背侧部分转分化形成一层视网膜样结构[10-11]。Hou等[10]通过小鼠胚胎原位杂交实验证实Mitf早期表达在神经嵴来源的细胞,最初在头部,后来移向尾部。Mitf从小鼠胚胎期9.5 d开始出现在视神经上皮层。在胚胎期10.5~15.5 d Mitf表达局限在未来的RPE区域。在胚胎期16.5 d Mitf阳性细胞仍然局限在RPE和视杯后的细胞中,经鉴定,这些细胞来源于神经嵴,并且能够发育成脉络膜和虹膜的色素细胞。

Pax基因家族的共同特点是含有配对盒基元序列,Pax6除有配对盒序列外还有同源结构域序列[12]。Pax6的表达主要在眼睛、中枢神经系统、鼻和胰腺的发育中起重要作用。在眼睛的发育方面,Pax6表达于眼球各种组织中,包括视盘、视泡、晶状体、角膜上皮、神经视网膜以及RPE中[13]。在小鼠发育过程中,起初Pax6广泛表达于头表皮外胚层,然后局限于预定的晶状体和角膜区域,之后依次表达于视窝、视神经沟、视泡内。在视杯形成的初期,Pax6分布在整个视杯结构中,包括视杯内层的视网膜祖细胞和外层的RPE祖细胞。当眼部祖细胞开始向各终末细胞分化后,Pax6在RPE层的表达逐渐消失,只局限表达在虹膜和睫状体上皮中[12]。

本研究在体外诱导mESCs向RPE细胞分化的过程中以分化前,分化第10、40天为重要时间点检测了Mitf、Pax6的表达情况,可见两个因子均在分化第10天达到表达的高峰,在分化第40天表达量几乎消失,在整个分化过程中呈先升高后降低的发展趋势。这说明在由mESCs向RPE细胞定向分化的体外培养过程中,基因Mitf和Pax6的表达变化趋势同在RPE细胞生理发育过程中两者的表达变化相似,说明这一体外培养体系很好地模仿了在体发育的过程,为日后更深入地了解mESCs向RPE细胞发育过程中Mitf和Pax6基因参与调控的具体机制提供了稳定、可靠的模型。

**参考文献:**


[1] Lin T C, Hsu C C, Chien K H, *et al*. Retinal stem cells and potential cell transplantation treatments[J]. J Chin Med Assoc, 2014, 77(11): 556-561.

[2] Schwartz S D, Hubschman J P, Heilwell G, *et al*. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report [J]. Lancet, 2012, 379(9817): 713-720.

[3] Bharti K, Nguyen M T, Skuntz S, *et al*. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye[J]. Pigment Cell Res, 2006, 19(5): 380-394.

[4] Martinez-Morales J R, Rodrigo I, Bovolenta P. Eye development: a view from the retina pigmented epithelium [J]. Bioessays, 2004, 26(7): 766-777.

[5] Gregory-Evans C Y, Wallace V A, Gregory-Evans K. Gene networks: dissecting pathways in retinal development and disease[J]. Prog Retin Eye Res, 2013, 33: 40-66.

[6] Ramsden C M, Powner M B, Carr A J, *et al*. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future[J]. Development,2013,140(12):2576-2585.

[7] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-156.

[8] Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, *et al*. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells[J]. Nat Protoc, 2009, 4(6): 811-824.

[9] Shibahara S, Takeda K, Yasumoto K, *et al*. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 2001, 6(1): 99-104.

[10] Hou L, Pavan W J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? [J]. Cell Res, 2008, 18(12): 1163-1176.

[11] Nguyen M, Arnheiter H. Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF[J]. Development, 2000, 127(16): 3581-3591.

[12] Shaham O, Menuchin Y, Farhy C, *et al*. Pax6: a multi-level regulator of ocular development[J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(5): 351-376.

[13] Collinson J M, Quinn J C, Hill R E, *et al*. The roles of Pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo[J]. Dev Biol, 2003, 255(2): 303-312.


(**收稿**:2015-01-06;**修回**:2015-02-03)

(编辑 张 维)