doi:10.11659/jjssx.05E020006

·基础研究·

Pax6 和 Wnt7a 在小鼠角膜中的表达分析

高 杰,穆 尧,向 松,丁 玲,胡 蓉,李 红,苏 敏 (贵州医科大学组织学与胚胎学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 观察 Pax6 和 Wnt7a 在小鼠角膜中的表达及分布情况,探讨 Pax6 和 Wnt7a 在角膜中的关系。**方法** 对小鼠与人、家兔、恒河猴的 Pax6 和 Wnt7a 氨基酸序列同源性进行生物信息学分析;石蜡切片法观察小鼠眼球壁的形态结构;免疫组织化学技术和流式细胞术分别检测 Pax6 和 Wnt7a 在小鼠角膜中的分布和表达。**结果** 小鼠和人、家兔、恒河猴的 Pax6 和 Wnt7a 蛋白氨基酸序列同源性都超过 90%,其中小鼠和人的同源性最高。HE 染色显示了正常小鼠的眼球壁结构。Pax6 的免疫阳性表达在小鼠角膜全层的细胞质和细胞膜上,阳性表达率约为 77.84%;Wnt7a 的免疫阳性主要表达在小鼠角膜全层的细胞膜上,阳性表达率约为 63.51%。**结论** Pax6 和 Wnt7a 均在小鼠角膜中高表达,可能参与角膜的形成。

[关键词] Pax6;Wnt7a;角膜;小鼠;石蜡切片法;免疫组织化学技术;流式细胞术

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-05-06

Expression analysis of Pax6 and Wnt7a in mouse cornea

GAO Jie, MU Yao, XIANG Song, DING Ling, HU Rong, LI Hong, SU Min (Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To observe the expression and distribution of Pax6 and Wnt7a in mouse cornea, and explore the relationship between Pax6 and Wnt7a in the cornea. **Methods** The bioinformatic analysis were conducted on the amino acid sequence homology of Pax6 and Wnt7a from mouse, human, rabbit and macaca mulatta. The paraffin section method was used to observe the morphological structure of the eyeball wall of the mouse. The immunohistochemistry and the flow cytometry were used to detect the distribution and expression of Pax6 and Wnt7a in the mouse cornea respectively. **Results** The amino acid sequence homology of Pax6 and Wnt7a proteins among mouse, human, rabbit and macaca mulatta were more than 90%, and the homology between mouse and human was the highest. HE staining results showed the normal structure of eyeball wall in mice. The immunopositive of Pax6 was expressed on the cytoplasm and cell membrane of the entire layer of the mouse cornea, and the positive expression rate was about 77.84%. The immunopositive of Wnt7a was mainly expressed on the cell membrane of the entire layer of the mouse cornea, and the positive expression rate was about 63.51%. **Conclusion** Both Pax6 and Wnt7a are highly expressed in mouse cornea, which may be involved in the corneal formation.

Keywords: Pax6; Wnt7a; cornea; mouse; paraffin sectioning; immunohistochemistry; flow cytometry

[基金项目] 贵州省科学技术项目(黔科合基础[2020]1Y408);贵州省科技厅学术新苗培养项目(黔科合平台人才[2018]5779-21);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2018]201);贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2012]2037 号)

[通信作者] 苏 敏,E-mail:summ30@163.com

[16] Santosh Martin S, Rabelo Melo F, Pejle G. The absence of tryptase Mcpt6 causes elevated cellular stress in response to modulation of the histone acetylation status in mast cells[J]. Cells, 2019, 8(10): 1190 - 1204. doi:10.3390/cells8101190.

[17] Smith NW, Shorten PR, Altermann EH, et al. Hydrogen cross-feeders of the human gastrointestinal tract[J]. Gut Microbes, 2019, 10(3): 270 - 288. doi:10.1080/19490976.2018.1546522.

[18] Libiad M, Motl N, Akey DL, et al. Thiosulfate sulfurtransferase-like domain-containing 1 protein interacts with thioredoxin[J]. J Biol Chem, 2018, 293(8): 2675 - 2686. doi:10.1074/jbc.RA117.000826.

[19] 扶 涛,张学云,骆 严. 硫氧还蛋白互作蛋白研究进展[J]. 生命的化学,2019,39(3):438 - 445. doi:10.13488/j.smhx.20180134.

[20] 刘 琪,杨 杰,Sattar H,等. 硫氧还蛋白在心肌疾病及其能量代谢中的作用[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(17):85 - 88. doi:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.1521.

[21] Wang H, Zhao L, Zhu LT, et al. Wogonin reverses hypoxia resistance of human colon cancer HCT116 cells via downregulation of HIF-1α and glycolysis, by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway[J]. Mol Carcinog, 2014, 53(Suppl 1): E107 - E108. doi:10.1002/mc.22052.

(编辑:魏 源)

角膜位于眼球壁的最外层,其表面的角膜上皮不断更新和脱落从而维持角膜的通透性。内外环境因素导致角膜上皮损伤会严重影响视力和外观。角膜上皮由角膜缘基底层内的角膜缘干细胞(limbal stem cells,LSCs)不断增殖、分化补充,使其处于动态平衡,维持其正常的生理功能[1-2]。研究表明,LSCs 对角膜损伤修复具有非常重要的作用[3-4]。配对盒基因 6(paired box gene,Pax6)是脊椎动物 Pax 家族成员之一,具有控制眼球形成的作用[5]。有研究表明,Pax6 基因不仅与虹膜发育有关,同时与角膜、神经及视网膜的形成也密切相关[6]。Wnt 信号通路广泛存在于多种生物体内,在调节干细胞自我更新中发挥着重要作用[7-9]。Ouyang等[10]体外研究表明,Wnt7a 和 Pax6 是调控 LSCs 分化的关键因子,并首次将皮肤表皮干细胞诱导分化为 LSCs 用于眼表疾病治疗。但 LSCs 在体内的分化是否也受到 Wnt7a 和 Pax6 的调控有待进一步明确。因此,本研究结合国内外研究进展,以小鼠眼球为研究对象,通过生物信息学分析、形态学和流式细胞技术观察 Wnt7a 和 Pax6 在角膜中的定位和表达情况,以期为小鼠的眼球形态结构提供实验数据,为进一步研究 Wnt7a 和 Pax6 在小鼠角膜干细胞损伤修复中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级 C57BL/6 小鼠,体质量 18 ~ 20 g,周龄7 ~ 8 周,由贵州医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SYXK(黔)2018-001。甲醛 - 乙醇 - 冰醋酸(AFA)固定液配置:20% 甲醛 40 mL + 95% 乙醇 60 mL + 冰醋酸 5 mL。兔抗 Pax6 多克隆抗体(稀释浓度 1∶200)、兔抗 Wnt7a 单克隆抗体(稀释浓度 1∶300)、APC 山羊抗兔荧光二抗(稀释浓度 1∶500)购自 abcam 公司,Cy3 荧光山羊抗兔二抗(稀释浓度 1∶300)购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 Pax6和Wnt7a蛋白氨基酸序列同源性分析

在美国国家生物技术信息中心网站查阅小鼠(NP_001231127.1)、人(NP_001245391.1)、恒河猿(XP_014969995.1)及家兔(XP_001075686.1)Pax6 蛋白氨基酸序列,查阅小鼠(NP_033553.2)、人(NP_004616.2)、恒河猿(NP_001252867.1)及家兔(XP_008258519.1)Wnt7a 蛋白氨基酸序列,利用 Clustal Omega 软件对 Pax6 和 Wnt7a 蛋白氨基酸序列进行同源性比对和分析。

1.2.2 小鼠眼球壁的形态学观察

采用 10% 水合氯醛麻醉处理 C57BL/6 小鼠,摘取眼球,置入垫有脱脂棉的 AFA 固定液固定,间隔 6 h 换等量 AFA 固定液固定,眼球后壁开窗,共固定 18 h。常规乙醇梯度脱水,氯仿透明,石蜡包埋制作眼球切片,厚度 7 μm,常规 HE 染色,化蜡 - 染色 - 上行 - 氯仿透明,封片后正置荧光显微镜下观察并采集图片。

1.2.3 免疫荧光染色

将眼球组织切片常规化蜡后,用柠檬酸蒸煮 10 min,PBS 洗涤3 次。加入山羊血清工作液封闭 30 min。去掉山羊血清,不洗,直接加入一抗(Pax6 或 Wnt7a)4 ℃过夜。隔天取出,PBS 洗涤 3 次,加入 Cy3 荧光二抗 37 ℃水浴 2 h。PBS 洗涤 3 次,加入 DAPI 染核 15 min,PBS 洗涤 3 次,荧光淬灭剂封片后正置荧光显微镜下观察并采集图片。

1.2.4 流式细胞术检测

取正常 C57BL/6 小鼠的眼球,小心除去周围的结缔组织,从角膜与巩膜交界的地方分离角膜组织。用眼科剪尽可能剪碎角膜组织,加入 4% 甲醛固定 40 min,加入 2% BSA 重悬组织细胞,调整组织细胞量约 1×10^6 个/管,加入一抗(Pax6 或 Wnt7a),混匀冰上孵育 45 min,PBS 洗涤 2 次,去掉一抗,2% BSA 100 μL 重悬后,加入 APC 山羊抗兔荧光二抗避光冰上孵育 30 min,去除二抗,PBS 重悬,混匀后上机检测。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计数资料用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。角膜组织中 Pax6 和 Wnt7a 表达量做Pearson相关分析,求 r 值,查 t 界值表,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

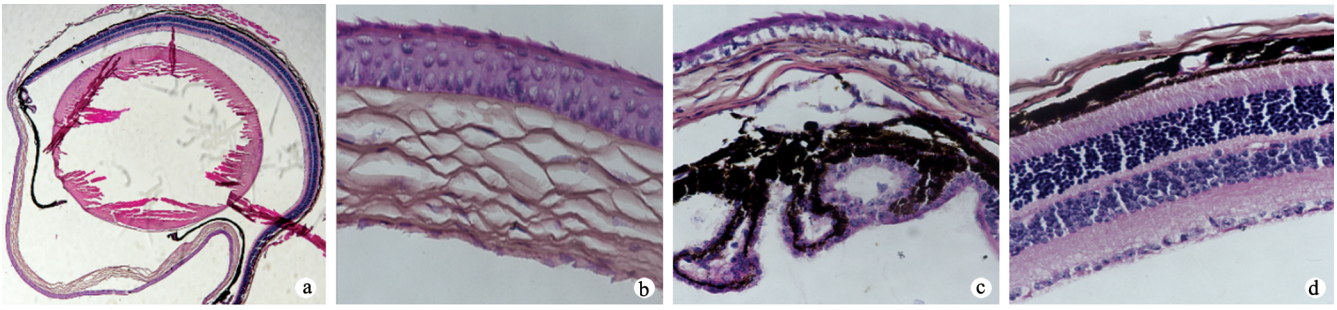
2.1 Pax6 和 Wnt7a 蛋白氨基酸序列在不同物种之间的同源性比较

Pax6 蛋白氨基酸序列中,人和小鼠的同源性最高,为 99.8%;其次为家兔和小鼠,为 99.5%;最低的是恒河猿和小鼠,为 96.8%。Wnt7a 蛋白氨基酸序列中,人和小鼠的同源性最高,为 99.4%;其次为恒河猿和小鼠,为 99.1%;同源性最低的是家兔和小鼠 98.9%。

2.2 小鼠眼球壁的形态结构

石蜡切片 HE 染色结果显示:低倍镜下正常小鼠的眼球壁结构由 3 层膜组成,从外向内依次为纤维膜、血管膜和视网膜(图 1a)。高倍镜下可观察到纤维膜中角膜的结构,依次为角膜上皮、前界膜、角膜基质、后界膜和角膜内皮;其中角膜上皮为未角化的复层扁平

上皮,细胞排列紧密而不规则,层数较多,有 6 ~ 8 层,基底细胞呈矮柱状或立方形,胞体较小,细胞核大而圆(图 1b);可观察到血管膜中虹膜和睫状体的结构,可见富含色素颗粒的色素上皮细胞(图 1c);可观察到视网膜的结构,依次为色素上皮细胞层、感光细胞层、双极细胞层及节细胞层(图 1d)。



a:正常眼球壁结构(HE ×40);b:纤维膜(HE ×400);c:血管膜(HE ×400);d:视网膜(HE ×400)

图 1 小鼠眼球壁的形态结构光镜图

2.3 免疫荧光染色结果

免疫荧光染色结果显示:DAPI 染料标记细胞核,蓝色荧光;Cy3 染料分别标记 Pax6 和 Wnt7a,红色荧光。Pax6 主要表达于角膜全层的细胞质和细胞膜上,Wnt7a 主要表达于角膜全层的细胞膜上(图 2)。

2.4 流式细胞术检测结果

流式细胞术检测结果显示:小鼠角膜组织中 Pax6 阳性表达率约为 77.84%,Wnt7a 阳性表达率约为 63.51%(图 3)。

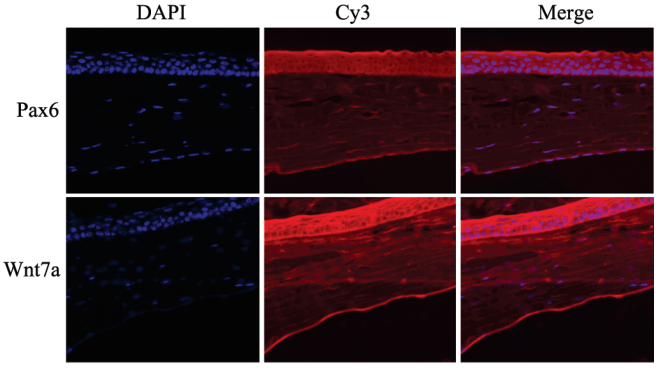


图 2 免疫荧光染色结果(×400)

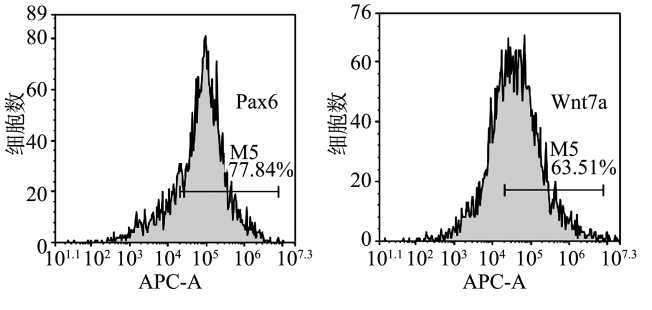


图 3 流式细胞术检测小鼠角膜中 Pax6 和 Wnt7a 阳性表达率

2.5 Pearson 相关分析

横向比较角膜组织中 Pax6 和 Wnt7a 表达量:r = 0.830 6,tr = 17.45,查 t 界值表(P < 0.05)。Pax6 和 Wnt7a 在角膜组织中的表达呈正相关。

3 讨论

由于眼球结构的特殊性,各部分组织类型及硬度不一,角膜各层连接处也不是特别紧密,因此,眼球组织切片制作是组织切片技术上的难题[11-15]。为了获取较为正常的小鼠眼球壁结构,本研究根据课题组成员前期在固定液、脱水剂及透明剂等方面的改良进行实验:调整固定液各成分浓度比例(20% 甲醛 40 mL、95% 乙醇 60 mL、冰醋酸 5 mL)及固定时长;脱水剂采用乙醇,从低浓度至无水乙醇进行梯度脱水并尽量缩小梯度差;使用氯仿代替二甲苯进行透明[13]。但在制作过程中依然遇到很多问题,主要包括:①眼球组织不同于其他组织,对眼球进行固定时,固定液中的冰醋酸和甲醛容易挥发,需要现用现配;②为保持眼球良好的形态,剔除多余组织后需直接完成眼球固定,然后再在眼球壁后方使用注射器开小孔使房水流出、固定液缓慢流入,使眼球壁得到充分固定;③在酒精上行脱水和石蜡包埋的过程中要严格把控时间和蜡温,否则会出现组织标本易脆等问题。本研究的免疫荧光染色是建立在同批次较好的 HE 染色切片基础上进行连片染色的,因此包埋切片至关重要。本研究采用的组织切片技术取得了较好的结果,眼球壁架构完整且角膜形态正常,为检测 Pax6 和 Wnt7a 在角膜组织中的表达及分布情况奠定了良好的技术基础。

本研究分别通过对小鼠和人、家兔、恒河猴的 Pax6 和 Wnt7a 蛋白氨基酸序列进行分析,结果显示小鼠和人、家兔、恒河猴的 Pax6 和 Wnt7a 蛋白的氨基酸序列同源性都超过 90%,其中小鼠和人的序列同源性最高,表明 Pax6 和 Wnt7a 在进化过程中都高度保守。因此,本研究采用小鼠作为研究对象,分析 Pax6 和 Wnt7a 在角膜损伤修复中的作用,研究结果显示,角膜

位于眼球壁的最外层,石蜡组织切片结果显示了正常小鼠的角膜结构,小鼠的角膜由前向后可见5层结构,依次为角膜上皮、前界膜、角膜基质、后界膜和角膜内皮,为下一步的基因定位表达做好了准备。通过对小鼠角膜组织进行免疫荧光染色发现,Pax6和Wnt7a均定位表达于角膜全层。同时对表达量进行相关性分析发现,Pax6和Wnt7a的表达呈正相关。因此,本研究认为在角膜的组织中Pax6和Wnt7a表达密切相关。

Wnt信号转导通路是调控细胞生长、发育和分化的关键途径之一[16-17]。Wnt7a是Wnt家族中的一员,可通过多种途径作用于下游靶分子而发挥生物学效应[18-19]。Pax6对维持角膜上皮正常分化有重要作用,Wnt信号转导通路调控Pax6的表达对维持LSCs特性有重要意义[20]。有研究表明,角膜缘"龛"环境异常,Wnt7a-Pax6轴受到抑制,致使LSCs不能正常分化,逐渐被耗竭导致角膜缘干细胞缺乏(limbal stem cells deficiency,LSCD)发生[21]。而在皮肤表皮干细胞中高表达Pax6可使其转分化为角膜上皮细胞,是干细胞移植治疗LSCD的潜在种子细胞资源[10]。因此,LSCs更新和分化与Pax6和Wnt7a密切相关,具体调控机制有待进一步明确。

综上所述,本研究证实了Pax6和Wnt7a在小鼠角膜中高表达,并通过免疫荧光染色确定了其表达部位,可为进一步研究Pax6和Wnt7a对LSCs增殖与分化的影响提供实验数据,同时也为转基因干细胞移植治疗人类眼部疾病奠定了一定的理论依据。

[参考文献]

[1] 严会文,陈剑英,高 杰,等. 大鼠角膜缘干细胞分离培养及其横向分化能力初探[J]. 局解手术学杂志,2016,25(4):248-251. doi:10.11659/jjssx.12E015112.

[2] 杨怡田,李 梅,郭银霞,等. 自体角膜缘干细胞移植术联合丝裂霉素C治疗翼状胬肉的疗效观察[J]. 局解手术学杂志,2019,28(5):75-78. doi:10.11659/jjssx.11E018054.

[3] Menzel-Severing J, Kruse FE, Schlötzer-Schrehardt U. Stem cell-based therapy for corneal epithelial reconstruction: present and future[J]. Can J Ophthalmol,2013,48(1):13-21. doi:10.1016/j.jcjo.2012.11.009.

[4] Tananuvat N, Bumroongkit K, Tocharusa C, et al. Limbal stem cell and oral mucosal epithelial transplantation from ex vivo cultivation in LSCD-induced rabbits: histology and immunologic study of the transplant epithelial sheet[J]. Int Ophthalmol,2017,37(6):1289-1298. doi:10.1007/s10792-016-0402-5.

[5] 李 杰,栗占荣,邢亚斯,等. 先天性无虹膜患者的基因型-表型分析[J]. 中华实验眼科杂志,2019,37(11):896-900. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.009.

[6] 李志清,黄 悦,孙慧敏. PAX6基因在眼发育中的调控作用[J]. 国际眼科杂志,2013,13(4):685-687. doi:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.04.12.

[7] Chen X, Liu J, Li N, et al. Mesenchymal Wnt/β-catenin signaling induces Wnt and BMP antagonists in dental epithelium[J]. Organogenesis,2019,15(2):55-67. doi:10.1080/15476278.2019.1633871.

[8] 张 遥,任秀智,韩金祥,等. Wnt信号通路与人类疾病相关性的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志,2018,31(1):86-91. doi:10.13200/j.cnki.cjb.002060.

[9] 张嘉蓉. Wnt/β-catenin信号通路在发育和疾病研究进展[J]. 中国科技纵横,2018(1):187-189. doi:10.3969/j.issn.1671-2064.2018.01.111.

[10] Ouyang H, Xue YC, Lin Y, et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis[J]. Nature,2014,511(7509):358-361. doi:10.1038/nature13465.

[11] 王翠菊,孙晓冬,李 静. 石蜡包埋眼球大切片的制作方法与改进[J]. 诊断病理学杂志2007,14(4):313. doi:10.3969/j.issn.1007-8096.2007.04.023.

[12] 张 睿,谢若衷,周翔天,等. 七种动物正常角膜组织结构的比较性研究[J]. 眼科,2015,24(5):61-67. doi:10.13281/j.cnki.issn.1004-4469.2015.05.014.

[13] 张祥令,苏 敏,黄 悦,等. 石蜡包埋制作猫眼球切片方法的改良[J]. 第三军医大学学报,2011,33(15):1649-1650. doi:10.16016/j.1000-5404.2011.15.005.

[14] 兰 淼,张 伟,朱少君,等. 大鼠眼部晶状体标本石蜡切片的改良制作方法[J]. 陕西医学杂志,2008,37(12):1592. doi:10.3969/j.issn.1000-7377.2008.12.009.

[15] 郭 岩,孔佑华,王凤琴,等. 用于免疫荧光染色的大鼠视网膜冰冻切片的制作体会[J]. 沈阳医学院学报,2014,16(3):162-163. doi:10.3969/j.issn.1008-2344.2014.03.012.

[16] Clevers H, Nusse R, Hans C, et al. Wnt/b-Catenin signaling and disease[J]. Cell, 2012, 149(6):1192-1205. doi:10.1016/j.cell.2012.05.012.

[17] 李霁云,兰长骏,廖 萱. Wnt及BMP信号通路在眼球发育中的作用[J]. 眼科新进展,2018,38(7):101-105. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0164.

[18] Lee PN, Pang K, Matus DQ, et al. A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians[J]. Semin Cell Dev Biol, 2006,17(2):157-167. doi:10.1016/j.semcdb.2006.05.002.

[19] Lan L, Wang W, Huang Y, et al. Roles of Wnt7a in embryo development, tissue homeostasis, and human diseases[J]. J Cell Biochem, 2019,120(11):1-11. doi:10.1002/jcb.29217.

[20] 赵淞皎,乐琦骅. Wnt信号通路调控角膜缘干细胞的研究进展[J]. 国际眼科纵览,2018,42(5):348-353. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2018.05.011.

[21] Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, et al. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells[J]. Cell, 2001, 105(1):43-55. doi:10.1016/s0092-8674(01)00295-1.

(编辑:左艳芳)