DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.002
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2161-04

论著

小鼠视网膜干细胞的分离与鉴定

魏 勇,应大君,朱楚洪,张 伟,董世武 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 小鼠视网膜干细胞的分离与鉴定。方法 ①对胎龄17 d昆明小鼠眼睫状体部(CMZ)细胞进行分离与体外培养;②通过免疫荧光方法研究视网膜干细胞的增殖及分化特性。结果 ①在bFGF作用下,所培养细胞可形成悬浮生长的细胞团,经多次传代,细胞增殖能力未见衰减。BrdU标记结果显示悬浮细胞团主要是由分裂增殖的细胞组成。而且培养细胞可表达神经干细胞的特异性抗原Nestin及胚胎发育早期视网膜内原始细胞的特异性抗原Chx-10。②培养细胞经5%胎牛血清诱导可向成熟细胞分化,分别表达神经元与神经胶质细胞的特异性抗原NSE、GFAP。免疫荧光检测显示分化细胞可分别表达感光细胞、双极细胞以及节细胞的特异性抗原Opsin、PKC及β-tubulin。结论 小鼠睫状体部存在视网膜干细胞。

关键词:视网膜;干细胞;分离;鉴定
中图法分类号:R322.91;R329.2 文献标识码:A

Isolation and identification of retinal stem cells in mouse eye

WEI Yong, YING Da-jun, ZHU Chu-hong, ZHANG Wei, DONG Shi-wu (Department of Anatomy, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To isolate the retinal stem cells from mouse eye and identify their properties. **Methods** The cells derived from the ciliary marginal zone (CMZ) of 17 d embryonic mouse were isolated and cultured *in vitro*. The proliferating capacity and differentiating properties of the cultured cells were studied by using immunofluorescence methods. **Results** The study showed that the isolated cells derived from CMZ cultured in serum-free medium could give rise to neural spheres in the presence of bFGF. These cells could proliferate successively and generate secondary neural spheres, thus displaying potential to self-renew. These neural spheres could be expanded for up to 8 passages and could express constantly the neuroectodermal marker Nestin and Chx-10, a retinal stem cell marker, showing the undifferentiated stem cells properties *in vitro*. Analysis of the differentiation potential of the cultured cells *in vitro* showed that the cultured cells derived from CMZ were multipotential. Upon withdrawal of bFGF and addition of serum, the stem cells expressed cell-type specific markers corresponding to neurons and glia, such as NSE, GFAP, opsin, PKC, and β-tubulin. **Conclusion** The CMZ in the mouse eye harbors retinal stem cells that display properties of stem cells, and these cells have the capacity to give rise to retinal neurons and glia *in vitro*.

Key words: retina; stem cell; isolation; identification

近年来,随着哺乳动物神经干细胞研究的不断深入,部分学者开始尝试哺乳动物视网膜干细胞的分离探索工作。国外研究资料显示,哺乳动物的睫状缘区(Ciliary marginal zone, CMZ)存在视网膜干细胞[1~3]。本实验采用体外分离及培养的方法对胚胎17 d昆明小鼠CMZ区进行了视网膜干细胞的成功分离与鉴定。

1 材料和方法

1.1 实验动物

受孕昆明小鼠(孕17 d)30只,体质量30~40 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

胎牛血清,B27,bFGF,抗GFAP IgG,抗β-tubulin IgG,抗IgG-FITC,Ⅳ型胶原酶,胰蛋白酶为Sigma公司产品;DMEM/F12(1∶1)为Gibco公司产品;抗Nestin IgG,抗Chx-10 IgG,抗NSE IgG,SABC-Cy3免疫荧光试剂盒来自武汉博士德公司;BrdU及抗BrdU IgG来自北京华美公司;抗Opsin IgG为福建迈新公司产品;抗PKC为杨萍博士惠赠。

1.3 方法

1.3.1 分离及培养 孕龄17 d的昆明小鼠,脱颈处死,取出胚胎,剖出胎鼠的眼球。在解剖显微镜下,取睫状体部(含色素层)组织,剪碎,胶原酶(100 U/ml)消化1h后,0.25%胰酶消化15 min。80目及200目不锈钢滤网先后过滤,制成单细胞悬液。台盼蓝染色计数后接种于25 ml培养瓶,接种密度为5×10^4/ml。完全培养基为:DMEM/F12(1∶1)、1% B27、bFGF(20 ng/ml),37 ℃ 5% CO_2 细胞培养箱中培养。培养7~9 d后,原代悬浮细胞团传代,以后每隔5~7 d传代1次。传代方法:首先胶原酶消化1 h,然后用无菌注射器(带5号针头)吹打,以1∶2或1∶3的比例传代。

1.3.2 BrdU标记 将BrdU溶于DMEM/F12,过滤除菌后备

作者简介:魏 勇(1970-),男,山东省泰安市人,硕士,讲师,主要从事视网膜干细胞方面的研究。电话:(023)68752225
收稿日期:2003-06-02;修回日期:2003-09-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用。第4、7代细胞传代完成后，培养瓶内加入BrdU，其终浓度为5 μmol/L。培养5 d第5、8代细胞团行Cy3免疫荧光检测。方法：无水丙酮固定20 min，PBS冲洗。0.4%Triton-X-100处理30 min，冲洗，细胞涂片，冷风吹干。滴加兔抗BrdU IgG(1∶80)，按照博士德公司SABC-Cy3染色系统染色，荧光显微镜观察。

1.3.3 Nestin免疫荧光鉴定 方法同抗BrdU的荧光染色及观察步骤。

1.3.4 Chx-10免疫荧光鉴定 滴加兔抗Chx-10，过夜。PBS冲洗，吹干。滴加即用型羊抗兔IgG-FITC，60 min。冲洗，50%缓冲甘油封片，荧光显微镜观察。

1.3.5 胎牛血清诱导细胞分化及鉴定 选取第6代细胞，离心、冲洗，重新接种于培养瓶，培养条件：DMEM/F12 + 5%胎牛血清。7 d后，大部分细胞集落经血清诱导形成放射状贴壁生长的分化细胞。选取1瓶细胞用0.25%的胰酶消化、冲洗，均匀接种于几只35 mm培养皿中(预置有多聚赖氨酸处理过的盖玻片)，接种密度5× 10^4/ml，培养条件不变。2 d后，收集长有细胞的盖玻片，分别进行下列鉴定：抗NSE、抗GFAP、抗Opsin、抗β-tubulin、抗PKC免疫荧光染色(方法同抗BrdU荧光染色)。

以上实验均用0.01 mol/L PBS替代一抗设阴性对照。

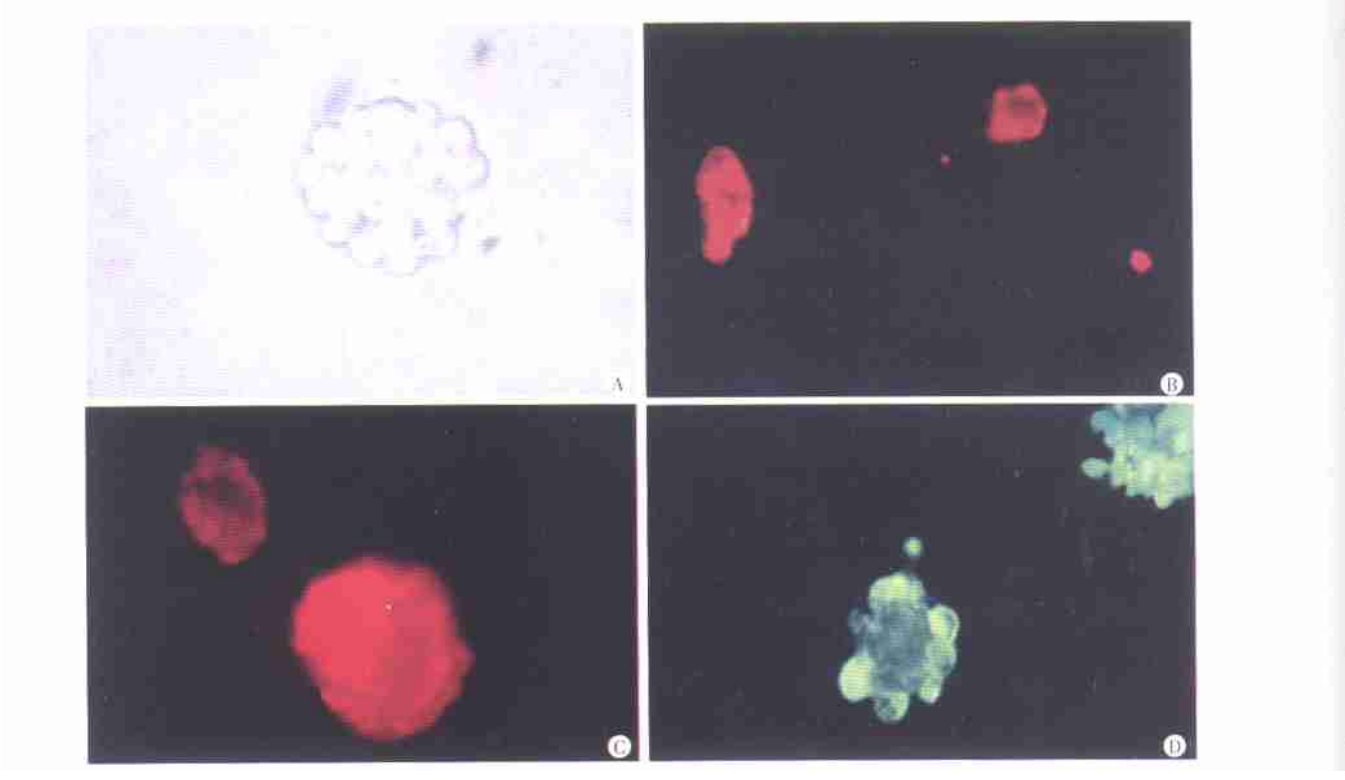
2 结果

2.1 体外培养细胞团的形态观察

原代细胞培养48 h后，未见明显的细胞团形成，仍为折光性强的单细胞。培养3 d后，可见悬浮的细胞出现分裂现象，并可见到数量较少的细胞团(2~8个细胞)形成。第5天，仍可见到单个细胞的分裂象，悬浮生长的细胞团形态增大、数量增多。随着不断的适时传代，新生的细胞团不断增多。到第8代，形成的细胞生长活力良好，细胞折光性强，细胞团边缘的细胞界限清楚，见图1A。随传代次数增加，某些细胞团内可发现黑色或棕黄色色素细胞。

2.2 细胞团的荧光检测

分别对BrdU、Nestin、Chx-10抗原荧光染色，镜下可见不同培养阶段细胞团形态不一，均为"++"级明亮荧光。阴性对照组无荧光显示。BrdU、Nestin抗原SABC-Cy3染色显示红色荧光，见图1B、C。Chx-10抗原IgG-FITC染色显示黄绿色荧光，见图1D。并且3种抗原表达经多次分离传代后无明显衰减。



A: The eighth passage cell sphere(IPM× 100); B: BrdU-positive cell spheres(SABC× 100); C: Nestin-positive cell spheres(SABC× 100); D: Chx-10-positive cell spheres(IgG-FITC× 100)

图1 第8代培养细胞团的形态及免疫荧光观察

Fig 1 The immunofluorescence-positive cell spheres of the 8th passage

2.3 视网膜干细胞的血清诱导分化

用5%的胎牛血清诱导第6代细胞分化，48 h可见少数细胞从贴壁细胞团边缘迁移出来。随分化时间变长，细胞团周围有突起的细胞明显增多，从集落中央向周围呈放射状生长。分化15 d后，大部分细胞突起明显，可看到细胞彼此间产生突触联系，折光性强，见图2 A。分化45 d后，培养细胞成片生长，胞体较大，不规则，突起变短，折光性稍差，较多细胞体内出现黑色颗粒样物质及空泡，见图2 B。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3.1　NSE 抗原 Cy3 免疫荧光观测　　NSE 是神经元特异性烯醇化酶, 常作为鉴定神经元的特异性标记。镜下可见较多细胞表达 NSE, 为明亮的红色荧光, 见图 2 C。

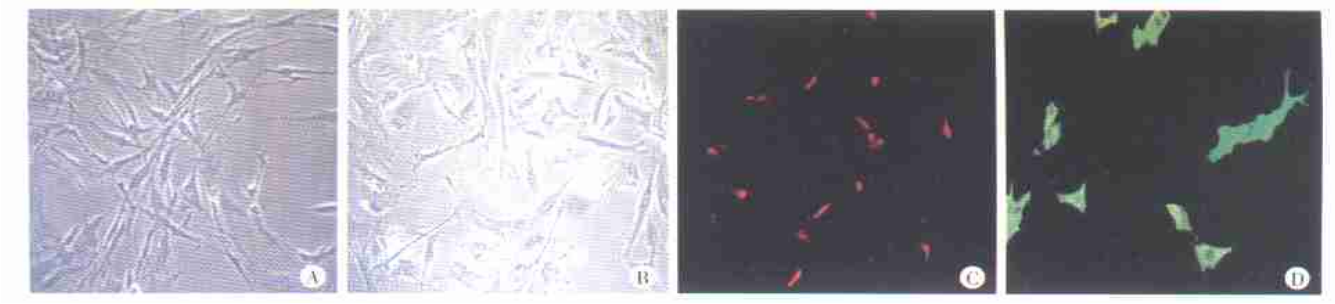
2.3.2　GFAP 抗原 FITC 免疫荧光观测　　GFAP 为胶质细胞纤维酸性蛋白, 特异表达在胶质细胞内。镜下为明亮的黄绿色荧光, 见图 2 D。诱导 4 周后的荧光染色可见胶质细胞相互间连成片状, 胞体较大, 细胞核明显。

2.3.3　Opsin 抗原 Cy3 免疫荧光观测　　Opsin 为感光细胞中表达的视蛋白, 可作为鉴定感光细胞的特异性抗原。镜下阳性细胞数极少, 发红色荧光, 见图 3 A。

2.3.4　PKC 抗原 Cy3 免疫荧光观测　　PKC(蛋白激酶 C)在视网膜研究中常作为双极细胞的特异性抗原。荧光显微镜下发现 PKC 阳性细胞形态清晰, 发红色荧光, 见图 3 B。

2.3.5　β-tubulin FITC 免疫荧光观测　　在视网膜中β-tubulin 可在节细胞的胞体和轴突内特异表达。镜下可见β-tubulin 阳性细胞数量比 Opsin 阳性细胞多, 发黄绿色荧光, 见图 3 C。

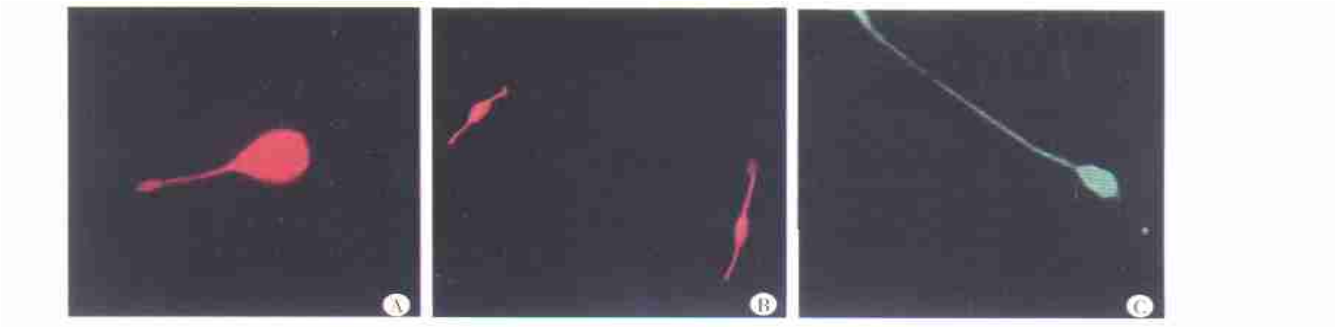
以上荧光检测的阴性对照均为阴性结果。



A: Retinal stem cells after 15-day differentiation (IPM× 100); B: Retinal stem cells after 45-day differentiation (IPM× 100); C: NSE-positive cells (SABC× 40); D: GFAP immuno-positive cells (IgG-FITC× 100)

图 2　血清诱导的分化细胞的形态及免疫荧光观察

Fig 2　Differentiated retinal stem cells under inverted phase microscope (IPM) and the immunofluorescence-positive cells



A: Opsin-positive cells (SABC× 400); B: PKC-positive cells (SABC× 100); C: β-tubulin-positive cells (IgG-FITC× 400)

图 3　不同神经元抗体免疫反应阳性细胞

Fig 3　Immuno-positive cells responsive to different neural antibodies

3　讨论

20 世纪 70 年代以来, 生物学家就发现鱼类及两栖类等冷血脊椎动物眼中的 CMZ 存在视网膜干细胞, 在视网膜损伤时, 这些细胞可快速增殖、分化以修复更新受损细胞[4]。本实验显示, 来自小鼠 CMZ 区的分离细胞体外培养可维持强烈的增殖潜能并表达神经干细胞特异性抗原 Nestin。经过多次传代, 这种增殖潜能及 Nestin 的表达无明显衰减。从神经发育上来看, 来源于视杯内部的神经上皮层被认为是哺乳动物眼发育中神经发生的位置。CMZ 由神经上皮衍生而来, 与所有视网膜细胞有着同样的起源。所以, 从组织学起源来讲, CMZ 存在有增殖潜能的视网膜干细胞是完全有可能的。通过对睫状体区视网膜干细胞的成功分离, 显示了眼源性组织与脑的某些部位的相似性, 后者存在静止的神经干细胞群, 在特定生长因子作用下可增殖及自我更新。另外, 显示了哺乳动物睫状体与两栖类、鱼类 CMZ 同源性。

研究显示, 神经干细胞体外培养必须依赖有丝分裂原的持续刺激作用。有丝分裂原可模拟干细胞的体内环境, 在一定程度上维持干细胞的增殖及自我更新潜能。资料显示, bFGF 是啮齿类动物神经干细胞的有丝分裂原, 这些细胞可来自胚胎视网膜、皮质、海马、纹状体、脊髓以及室下区[5,6]。Connollly 等[7] 报道, bFGF 在视网膜中的含量较为丰富, 对视网膜的神经元起支持营养作用。McFarlane 等[8] 通过转基因技术阻滞 FG-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

FR的作用,结果显示感光细胞及无长突细胞的数量减少了50%,而Muller细胞增加了3.5倍。由此我们可以设想,视网膜干细胞的体内维持或许与bFGF的刺激作用有关。本实验显示在bFGF作用下来自CMZ的细胞培养8代后,Nestin及Chx-10仍有较高表达,表达培养细胞仍然维持较原始的未分化状态,另外可以看出培养细胞传代后增殖及自我更新能力没有衰减。Tropepe等[3]在对小鼠视网膜干细胞的体外克隆形成实验中也发现,添加bFGF组的克隆形成率是对照组的3~4倍,并且至少可传6代以上。我们分离培养的干细胞经检测,具有以下3个特征:①保持未分化状态:Nestin是神经系统发育早期神经上皮干细胞表达的一种神经丝蛋白,起始于神经板的形成阶段,在神经迁移及分化开始后逐渐消失,研究中通常把它作为神经干细胞的特异性标记[9,10]。本实验中不同阶段的培养细胞均呈Nestin阳性,说明我们分离的细胞具有神经干细胞属性。另外,我们发现增殖细胞Chx-10的表达均为阳性,且经多次传代荧光无明显衰减。Chx-10是视网膜胚胎发育阶段原始细胞表达的特异性标记[11]。在视觉上皮的发育过程中,Chx-10严格地表达在视泡或视杯可生成视网膜神经感觉区的部位,而在视网膜色素上皮(Retinal pigmented epithelium, RPE)中则不表达,因此,Chx-10的表达说明从CMZ区分离的培养细胞具有视网膜细胞的特性,可分化成视网膜各类神经元。②具有不断增殖分裂的能力:我们利用细胞在分裂增殖过程中可以吸收BrdU而合成自身核苷酸的原理验证视网膜干细胞的增殖能力,结果显示大部分细胞BrdU染色阳性,为分裂增殖而产生的新生细胞,且在不断分裂增殖过程中依旧维持了这种能力。Tropepe等[3]报道在无外源性生长因子作用时,原代视网膜干细胞可形成次代神经球,并能维持细胞传代。我们发现无外源性生长因子时细胞自我更新能力很差,往往不能多次传代,并伴随大量细胞的自主分化,很难完成细胞增殖及自我更新。③具有多向分化的潜能:体外培养的视网膜干细胞在无外源性有丝分裂原并添加血清时,可诱导细胞改变细胞周期增殖循环,进入自主分化状态[12]。我们对第6代细胞采取血清诱导的方法使其贴壁分化生长,观察了Chx-10、NSE、GFAP、Opsin、β-tubulin、PKC等抗原的表达。这些具有增殖潜能及保持未分化的细胞可沿着神经元及胶质细胞途径分化,并分别表达感光细胞、节细胞及双极细胞的特异性抗原。说明我们分离培养的细胞具有多向分化潜能。

视网膜的发育是一高度协调的过程,其增殖、分化的调节需要各种因素的联合作用。在发育早期,外源性因子通过刺激膜受体上调或下调某些基因的表达,从而促进细胞进入细胞周期。发育晚期,重点转向促进细胞周期结束或减少有丝分裂刺激因子的产生,以抑制细胞分裂,促使细胞进入分化的途径[13,14]。这些刺激因子有可能是不断通过血液循环运输到视网膜内,也有可能来自相邻细胞的影响,如通过旁分泌或缝隙连接对附近细胞的转归产生影响[15],或是两种作用方式兼而有之。Chacko等[9]把分离的视网膜干细胞接种于成年动物的视网膜下腔中,可看到细胞正常分化及有效整合,并且无"玫瑰花结"形成。说明视网膜内环境及细胞间的相互作用对视网膜干细胞分化起着重要的作用。

参考文献:

[1] Reh T A, Levine E M. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina[J]. J Neurobiol, 1998, 36(2): 206-220.

[2] Reh T A, Fischer A J. Stem cells in the vertebrate retina[J]. Brain Behav Evol, 2001, 58(5): 296-305.

[3] Tropepe V, Coles B L, Chiasson B J. Retinal stem cells in the adult mammalian eye[J]. Science, 2000, 287(5460): 2032-2036.

[4] Otteson D C, Hitchcock P F. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration[J]. Vision Res, 2003, 43(8): 927-936.

[5] 周德山, 蔡文琴. 干细胞基础与应用研究的一些进展[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(1): 1-3.

[6] Johe K K, Hazel T G, Muller T, *et al*. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system[J]. Genes Dev, 1996, 10(24): 3129-3140.

[7] Connolly S E, Hjelmeland L M, LaVail M M. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in mature and developing retinas of normal and RCS rats[J]. Curr Eye Res, 1992, 11(10): 1005-1017.

[8] McFarlane S, Zuber M E, Holt C E. A role for the fibroblast growth factor receptor in cell fate decisions in the developing vertebrate retina[J]. Development, 1998, 125(20): 3967-3975.

[9] Chacko D M, Rogers J A, Turner J E. Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268(3): 842-846.

[10] 李红丽, 蔡文琴, 杨 忠, 等. 维甲酸诱导神经管畸形发生过程中神经干细胞的变化研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(1): 11-14.

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

[12] Perron M, Kanekar S, Vetter M L. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the Xenopus eye[J]. Dev Biol, 1998, 199(2): 185-200.

[13] Dyer M A, Cepko C L. p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations[J]. J Neurosci, 2001, 21(12): 4259-7421.

[14] Levine E M, Close J, Fero M. p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina[J]. Dev Biol, 2000, 219(2): 299-314.

[15] Tamalu F, Chiba C, Saito T. Gap junctional coupling between progenitor cells at the retinal margin of adult goldfish[J]. J Neurobiol, 2001, 48(3): 204-214.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net