

## · 实验研究 ·

## 大鼠尾芽胚视杯干细胞的分布与特征

黄小勇 阴正勤 王仕军 曾玉晓

**【摘要】** 目的 探索视杯干细胞在大鼠尾芽胚(第 12.5 天胚龄)的分布与特征。方法 采用免疫组织化学技术,检测视杯干细胞在大鼠尾芽胚(第 12.5 天胚龄)视杯组织中的分布;分离视杯细胞,体外无血清培养,应用免疫细胞化学技术分析其增生能力以及血清诱导分化前后 CHX10 和多种成熟视网膜细胞特异性标记蛋白的表达,以了解这一发育时期视杯组织的分化特点。结果 大鼠尾芽胚(第 12.5 天胚龄)的视杯干细胞主要分布在视杯的内外层和边缘层,不表达成熟视网膜细胞特异性标记蛋白。从尾芽胚视杯中分离出的细胞具有单细胞克隆能力,CHX10 表达阳性,血清诱导后表达多种成熟视网膜细胞特异性标记蛋白:Thy1.1、神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、蛋白激酶 C(PKC) $\alpha$  和 rhodopsin。结论 大鼠尾芽胚(第 12.5 天胚龄)视杯主要由未分化的细胞组成,视杯干细胞的分布集中在视杯内层和边缘层。体外培养的视杯干细胞增生能力强,经诱导分化后表达多种成熟视网膜细胞特异性标记蛋白。

**【关键词】** 视杯干细胞; 细胞培养

中图分类号:R446.9

**Distribution and features of the optic cup stem cells in embryonic rat at tailbud stage** HUANG Xiao-yong, YIN Zheng-qin, WANG Shi-jun, et al. Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: YIN Zheng-qin, Email: qinzyin@yahoo.com.cn

**【Abstract】** **Objective** To explore the distribution and features of the optic cup stem cells in embryonic rat at tailbud stage. **Methods** The distribution of optic cup stem cells in optic cup tissue in 12.5-embryonic-day-old rats was observed by immunohistochemistry. The separated cells from optic cup were cultured with serum-free media, and immunofluorescence technique was used to detect the ability of hyperplasia of stem cells and expression of CHX10 antigen and specific antigens of mature retinal cells before and after differentiation. **Results** The optic cup stem cells in embryonic rat at tailbud stage were mainly located at inner, outer, and marginal layer of optic cup. No expression of specifically marked protein of mature retinal cells was detected. The cells separated from optic cup had the ability of single-cell clone, positive expression of CHX10 and expression of several specific antigens of mature retinal cells after the inducement, including Thy1.1, glial fibrillary acidic protein (GFAP), protein kinase C (PKC)  $\alpha$ , and rhodopsin. **Conclusion** Optic cup of 12.5-embryonic-day-old rats composes of undifferentiated cells, and the stem cells are mainly located in optic cup inner and marginal. High ability of hyperplasia of the optic cup stem cells cultured in vitro is found. The cells, which are retinal stem cells, can express several specifically marked proteins of mature retinal cells after inducement and differentiation.

**【Key words】** Optic cup stem cell; Cell culture

视网膜干细胞移植是眼科研究的前沿<sup>[1]</sup>。胚胎干细胞、神经干细胞、造血干细胞、成体视网膜干细胞(RSCs)作为种子细胞都有明显的局限性<sup>[2-5]</sup>。寻找定向分化确切、易于富集、相对纯化的种子细胞有重要意义。在眼的发育过程中,前脑泡两侧向外突起形成视泡,以后逐渐向内凹陷形成视杯,不断分裂增厚,逐渐分化为各层视网膜细胞,其中神经节细胞发生最早<sup>[6]</sup>。取自出现神经节细胞分化之前的视杯细胞进行培养,

理论上可以得到分化方向确切、易于富集、相对纯化的种子细胞。我们在分析 Long Evans 大鼠尾芽胚(第 12.5 天胚龄)干细胞的分布和视杯组织的分化特点的基础上,对培养视杯细胞获得的细胞克隆进行鉴定,证明视杯干细胞是一种原始视网膜细胞,为进一步研究其生物学特性和应用价值奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

采用从美国 Taconic 公司引进的成年 Long Evans 大鼠 16 只,孕 12.5 d,体重 200~300 g。

### 1.2 主要试剂及主要仪器

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270457);国家杰出青年资助项目(30025014)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学附属西南医院眼科

通讯作者:阴正勤,Email: qinzyin@yahoo.com.cn

5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)(北京华美生物公司);抗 Thy1. 1 IgG(美国 Chemicon 公司);抗 BrdU(5-溴-2-脱氧尿苷)、抗 CHX10、抗神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和抗蛋白激酶 C(PKC) $\alpha$  IgG(武汉博士德公司);抗 rhodopsin 抗体(美国 NeoMarkers 公司);改良的基础培养基(DMEM)/F12(1:1)和 B27(美国 Gibco 公司);碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(美国 Sigma 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司)。免疫组织化学染色(SP9001、SP9002)试剂盒和异硫氰酸荧光素(FITC)、四甲基异硫磺罗丹明(TRITC)荧光二抗(北京中山公司)。

恒冷箱冰冻切片机、荧光显微镜及图像分析系统(德国 Leica 公司),体视显微镜、手术显微镜、正置式显微镜(日本 Olympus 公司),CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 NuAire 公司),超净工作台(苏净集团安泰公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 视杯的取材、固定及免疫组织化学染色** 孕鼠经 10%乌拉坦按 10 ml/kg 的剂量腹腔麻醉后,剖腹取出胚胎,经 4%多聚甲醛固定 6 h,30%蔗糖脱水,沉底后取出。作水平位连续切片,片厚 15  $\mu$ m。贴片后行二氨基联苯胺(DAB)法免疫组织化学染色。

**1.3.2 视杯细胞的分离培养和传代** 取视杯组织,吸管吹打制作单细胞悬液,去除晶状体,台盼蓝染色后计数细胞,于每培养瓶中(50 ml 培养瓶)加入  $1 \times 10^6$  个细胞,采用无血清培养基在 DMEM/F12(1:1)中加入 B27 和 bFGF(20 ng/ml),37  $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。待原代克隆形成后再次机械分离克隆制作单细胞悬液,每个培养瓶中加入  $5 \times 10^5$  个细胞。以后每 2~3 天换液,每 5~7 天机械分离克隆并传代。在传代的同时进行克隆形成实验和单细胞克隆实验,并计数每代细胞的克隆形成率。

**1.3.3 单细胞克隆** 采用有限稀释法,选取原代克隆制作的单细胞悬液,活细胞计数后逐步稀释到 40 个/ml,于 96 孔培养板中滴加稀释的细胞悬液(每孔 50  $\mu$ l 细胞悬液和 50  $\mu$ l 无血清培养液,细胞数 1~2 个/孔),2 h 后相差显微镜下观察计数,选取仅有 1 个细胞的培养孔作记号,动态观察。

**1.3.4 BrdU 标记和 CHX10 免疫荧光鉴定** 在含 5  $\mu$ mol/L BrdU 的培养体系中培养 7 d,待新的克隆形成后转移到培养板中(预置多聚赖氨酸涂布的盖玻片),贴壁 2 h 行免疫荧光双标标记。

**1.3.5 克隆诱导分化** 选取上述的细胞克隆种植于预置多聚赖氨酸涂布盖玻片的 24 孔培养板,并加入有血清培养基(5%胎牛血清+DMEM/F12),7 d 后

行免疫荧光标记。

**1.3.6 免疫荧光标记实验** 将贴壁的细胞克隆行 CHX10、Thy1. 1、GFAP、PKC $\alpha$  和 rhodopsin 的免疫荧光标记。

## 2 结果

### 2.1 大鼠尾芽胚(第 12.5 天胚龄)视杯 CHX10 阳性细胞的分布及分化情况

视杯连续水平位切片免疫组织化学染色显示:CHX10 阳性细胞主要在视杯内层、外层和边缘层,在视杯内层呈复层上皮状,多呈三角形、圆形、椭圆形,放射状排列,与视杯外层垂直,在边缘层呈簇状(图 1);Thy1. 1 免疫组织化学染色阴性,未见 GFAP、PKC $\alpha$  和 rhodopsin 的表达。

### 2.2 克隆分析结果

视杯细胞在无血清培养基中生长 2 d 后,部分细胞分裂形成 2~4 个细胞的细胞团,并随时间的推移细胞数目迅速增加,到 7 d 时生长成为数十个细胞到数百个细胞的集落,这些集落均呈悬浮球形生长,细胞形态规则,未见到明显的突起。原代克隆的次代培养及其亚克隆过程中,仍出现与原代培养相同的次代克隆。

单个细胞在培养 2~3 d 后分裂为 2~4 个细胞的小克隆,4~5 d 出现 10~40 个细胞的中等大小克隆,7~10 d 发展为上百个细胞的大克隆(图 2)。在原代培养中克隆形成率约为 0.5%~1%,而次代克隆及随后的亚克隆中克隆形成率则明显升高,波动在 10%~20%之间。经传 10 代后的细胞仍具有克隆能力。

### 2.3 CHX10 抗原的表达和 BrdU 标记

BrdU 标记表明克隆的大部分细胞为 BrdU 阳性细胞,而 BrdU 阳性的克隆也显示为 CHX10 阳性(图 3)。在传 10 代后的克隆仍显示为 BrdU 和 CHX10 阳性。而 Thy1. 1、GFAP、PKC(和 rhodopsin 免疫荧光标记均呈阴性。

### 2.4 诱导分化结果

经血清培养后,视杯细胞原代克隆及其亚克隆贴壁 2~4 h 后即发现有突起从克隆边缘长出,2 d 后即有不同形态的细胞从克隆周围出现,7 d 后出现大量不同形态的新生细胞。细胞主要呈现出 2 种形态,即具有一个或两个长突起胞体呈圆形或椭圆形的神经元样细胞,具有粗长突起和多角形胞体的 Müller 样细胞(图 4)。

免疫荧光标记显示,细胞克隆经血清培养后 7 d,出现了 Thy1. 1 阳性细胞(图 5),GFAP 阳性细胞(图 6)和 PKC $\alpha$  阳性细胞(图 7,8),而表达视杆细胞特异性

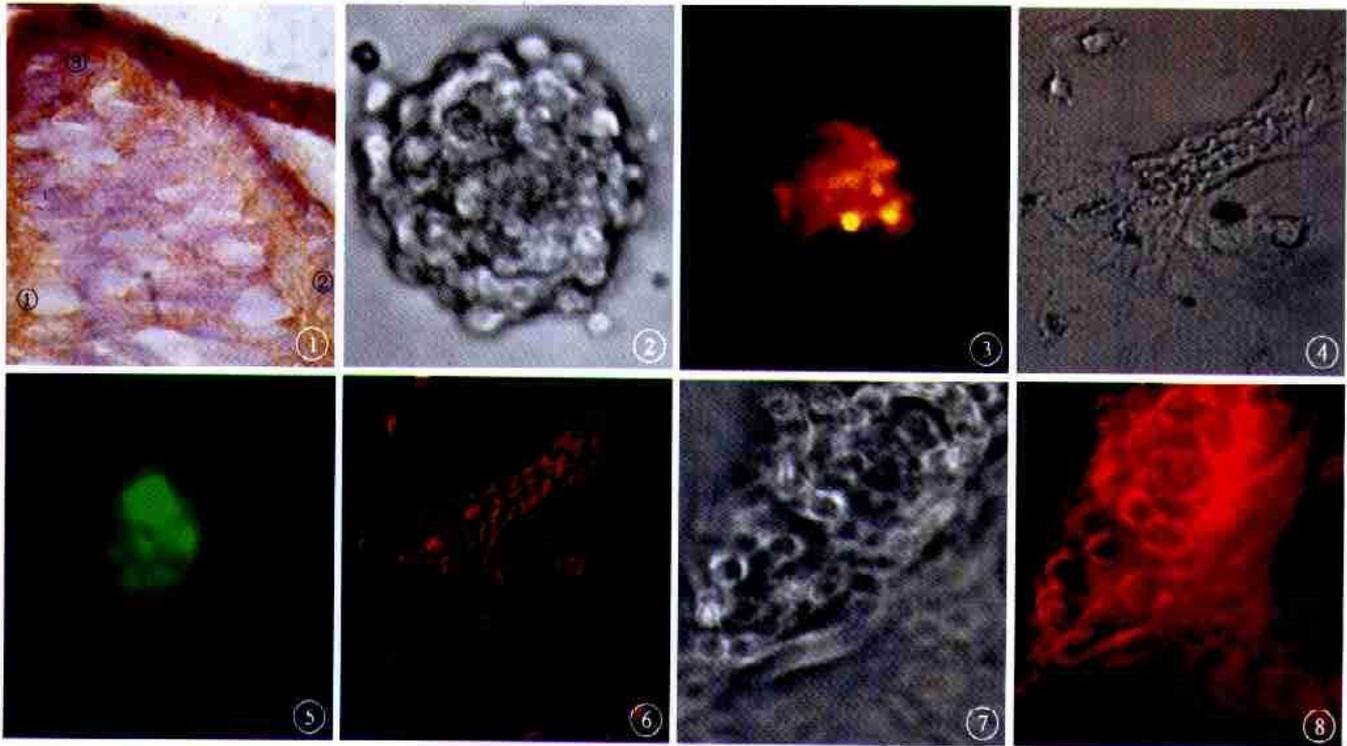


图 1 大鼠尾芽胚(第 12.5 天龄)视杯组织抗 CHX10 免疫组化染色光学显微镜像。CHX10 阳性细胞主要分布于①视杯内层,②视杯外层,③边缘层 DAB  $\times 1000$  图 2 单细胞克隆球光学显微镜像。单细胞克隆球  $\times 200$  图 3 细胞克隆 CHX10、BrdU 双标着色的荧光显微镜像。CHX10(红色)、BrdU(绿色)双标着色呈黄色  $\times 630$  图 4 5%胎牛血清诱导 7 d 后出现的 Müller 样细胞光学显微镜像。Müller 样细胞呈多角形,细胞体较大  $\times 400$  图 5 5%胎牛血清诱导 7 d 后出现的 Thy1.1 阳性细胞荧光显微镜像。Thy1.1 阳性细胞呈绿色 FITC  $\times 630$  图 6 5%胎牛血清诱导 7 d 后出现的 GFAP 阳性细胞荧光显微镜像。细胞浆着色 TRITC  $\times 400$  图 7 5%胎牛血清诱导 7 d 后出现的神经元样细胞光学显微镜像。神经元样细胞呈圆形或椭圆形  $\times 630$  图 8 5%胎牛血清诱导 7 d 后出现的 PKC $\alpha$  阳性细胞的荧光显微镜像。特异性抗原定位在细胞浆 TRITC  $\times 630$

Fig. 1 Photograph of immunohistochemical staining of CHX10 in the optic cup of 12.5-day-old rats. CHX10 positive cells are mainly located at ① inner, ② outer and ③ marginal layer of optic cup DAB  $\times 1000$  Fig. 2 Photograph of light microscope of single cell sphere clone. Single cell sphere clone  $\times 200$  Fig. 3 Photograph of fluorescent microscope of CHX10, BrdU dual positive cells of cell clone (yellow)  $\times 630$  Fig. 4 Photograph of fluorescent microscope of Müller-like cells 7 days after induction by 5% FBS. Polygonal big Müller-like cells  $\times 400$  Fig. 5 Photograph of fluorescent microscope of Thy1.1 positive cells 7 days after induction by 5% FBS. Green Thy1.1 positive cells FITC  $\times 630$  Fig. 6 Photograph of fluorescent microscope of GFAP positive cells 7 days after induction by 5% FBS. Pigmented cytoplasm TRITC  $\times 400$  Fig. 7 Photograph of fluorescent microscope of neuron like cells 7 days after induction by 5% FBS. Round or elliptic neuron-like cells  $\times 630$  Fig. 8 Photograph of fluorescent microscope of PKC $\alpha$  positive cells 7 days after induction by 5% FBS. Specific antigen in the cytoplasm TRITC  $\times 630$

抗原 rhodopsin 的阳性细胞数较少,表达在细胞浆内。

### 3 讨论

Long Evans 大鼠是 Wistar 大鼠和野生鼠的杂交鼠,眼部含有色素,与人眼视网膜更为接近,适合眼科学研究。

尾芽胚视杯的干细胞定位特点:在视网膜的发育过程中,神经胚期视泡内陷形成视杯,在尾芽胚期继续分裂增厚,直到变态期才出现神经节细胞的分化<sup>[7]</sup>。视杯干细胞是视杯发育成胚眼之前的原始视网膜细胞,存在于视杯的各层中,CHX10 是视网膜原始细胞表达的特异性标记。本研究中,视杯的 CHX10 免疫组织化学染色的结果表明视杯中富集干细胞。因此,从大鼠尾芽胚(第 12.5 天胚龄)的视杯中取材、培养有可能获得较原始、未分化、更易富集的干细胞,因此,尾芽胚视杯干细胞理论上是研究视网膜源干细胞分化调控研究的较好的细胞模型。

研究显示,视杯细胞群由克隆形成细胞和散在的单个细胞组成,在连续培养后,散在细胞逐渐死亡消失,细胞分裂增生形成细胞球<sup>[4]</sup>。经连续传代培养,我们发现,视杯细胞即使是传代 10 代( $>2$  个月)后仍能增生形成克隆,显示克隆形成细胞较强的增生能力。为了排除多细胞聚集产生类似集落的可能性,我们通过单细胞克隆技术证明单个细胞能够分裂增生形成克隆,且克隆的大部分细胞呈 BrdU 阳性,是分裂增生产生的新生细胞。

细胞球 CHX10 表达阳性,而 Thy1.1、GFAP、PKC $\alpha$  和 rhodopsin 阴性表达,表明细胞球是原始视网膜细胞形成的集落。血清诱导分化是鉴定干细胞和分析干细胞分化潜能的重要手段,我们用 5%胎牛血清培养细胞球 7 d 后,细胞球贴壁,并向外伸出突起,部分细胞从细胞球中爬出,表现出明显的神经细胞形态。用视网膜细胞如神经节细胞、Müller 细胞、双极细胞和感光细胞的标志性抗原对分化细胞进行免疫鉴定,

我们发现分化细胞群主要是 Thy1.1、GFAP、PKC $\alpha$  和 rhodopsin 阳性细胞,说明我们分离培养的视杯细胞球在血清条件下能向多种成熟视网膜细胞分化。

因此,从尾芽胚(第 12.5 天胚龄)视杯中分离的克隆形成细胞具有较强的自我更新和增生能力,能向多种成熟视网膜细胞分化,是胚时期的视网膜干细胞。由于我们在本研究中分离的视网膜干细胞在来源上与目前研究的成体及胎时期视网膜干细胞截然不同,因此,我们特称之为“视杯干细胞”,一方面,可以与其它来源的视网膜干细胞区分,以便进一步深入研究;另一方面,作为胚时期分离得到的视网膜干细胞,可能具有一些独特的生物学特性,需要在今后的研究中加深认识。

我们的研究表明:①大鼠尾芽胚(第 12.5 天胚龄)中视杯干细胞主要分布于视杯各层,已经大量分裂增生,还未出现向神经节细胞的分化,12.5 天胚龄是获得易于富集纯化的视杯干细胞的理想时期;②培养获得的视杯干细胞克隆,不混有成熟的视网膜细胞,增殖能力强,具有向多种视网膜细胞分化的潜能。

国内外学者从较晚时期的大鼠胚胎(第 15、17 天胚龄)甚至新生大鼠视网膜中取材培养神经节细胞<sup>[8,9]</sup>,但这时视网膜中已出现成熟视网膜细胞如神经节细胞甚至 Müller 细胞的分化,Müller 细胞在无血清培养基中能存活和繁殖,这使分离得到的神经节细胞很难纯化,研究显示视杯干细胞培养过程中未见明显的成熟细胞污染,向视网膜成熟细胞分化确切,对探索视网膜干细胞定向分化机制有重要的应用价值,可以

设想的是,在适当的诱导分化条件下,有可能使视杯干细胞分化为特定视网膜细胞的能力增强,甚至以向某种细胞分化为主,这是一项很有意义的工作。

志谢:感谢第三军医大学基础部蔡文琴教授、周德山教授、李泽桂教授的无私指导和帮助、感谢病理生理学教研室谭小玲博士在研究工作和论文撰写中的积极参与和大力支持。

#### 4 参考文献

- 1 Tropepe V, Coles BLK, Chiasson BJ, et al. Retinal Stem Cells in the Adult Mammalian Eye. *Science*, 2000, 287:2032-2036.
- 2 Schraermeyer U, Thumann G, Luther T, et al. Subretinally transplanted embryonic stem cells rescue photoreceptor cells from degeneration in the RCS rats. *Cell Transplant*, 2001, 10:673-680.
- 3 Van Hoffelen SJ, Young MJ, Shatos MA, et al. Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44:426-434.
- 4 Smith LEH. Bone marrow-derived stem cells preserve cone vision in retinitis pigmentosa. *J Clin Invest*, 2004, 114:755-757.
- 5 Chacko DM, Rogers JA, Turner JE, et al. Survival and Differentiation of Cultured Retinal Progenitors Transplanted in the Subretinal Space of the Rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268:842-846.
- 6 Gilbert SF. Cell-cell communication in development. In: Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th Edition. Massachusetts: AD Sinauer, 2000. 143-148.
- 7 Fischer AJ, McGuire CR, Dierks BD. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *J Neurosci*, 2002, 22:9387-9398.
- 8 Yourey PA, Gohari S, Su JL, et al. Vascular endothelial cell growth factors promote the in vitro development of rat photoreceptor cells. *J Neurosci*, 2000, 20: 6781-6788.
- 9 Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB, et al. In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. *Brain Res*, 1999, 831: 1-10.

(收稿日期:2004-11-19)

(本文编辑:朱敏)

## · 消息 ·

### 2005 年国际中西医结合眼科学术会议征文通知

为加强中西医眼科的学术交流,促进眼科学的发展和人类光明事业,世界中医药学会联合会眼科专业委员会、中国中西医结合学会眼科专业委员会、中华中医药学会眼科分会定于 2005 年 9 月下旬在北京联合召开国际中西医结合眼科学术会议。会议期间将举行论文宣读、专题新技术及新进展讲座等学术活动,并将邀请国内外中西医眼科界知名专家作专题演讲,届时将举行眼科药品和设备展览会。现将论文及有关事项通知如下:

一、征文内容:1. 中医、西医眼科基础及临床研究;2. 中医、西医临床新诊疗技术在眼科的应用;3. 眼科名老中医经验总结及师承经验交流;4. 介绍眼科专科经验及建设成果、特色病种综合治疗方案及疗效评价标准;5. 中医、西医眼科发展战略的探讨。

二、有关事项:1. 凡未在全国性杂志或全国学术会议交流的论文均可投寄;2. 论文不超过 3 000 字/篇,文前附 400 字以内中英文摘要(包括目的、方法、结果、结论);3. 要求字迹清楚、文责自负。请自留底稿,恕不退稿;4. 来稿注明作者姓名、职称、单位、邮编、通讯地址和电子邮箱,信封左下方注明“会议征文”字样;5. 论文经评选后另发会议通知(开会前 30 天),未入选者不予退稿,也不另发通知;6. 参加会议交流者发给论文证书,届时也欢迎未提交论文者参加本次学术大会,参加会议者可获得国家级继续教育学分。

三、截稿日期:2005 年 8 月 15 日。来稿请寄:北京市石景山区鲁谷路 9 号中国中医研究院眼科医院胡悦收,邮政编码:100040。联系电话:010-68656185;010-68688877-6615、6625。请各学会委员积极组织稿件,以确保会议的论文质量和学术水平。

世界中医药学会联合会眼科专业委员会  
中国中西医结合学会眼科专业委员会  
中华中医药学会眼科学分会