

人胚胎 7 个月视网膜超微结构特点

李根林 刘月月 张 湘 雷 祥 王津津

Ultrastructural characteristics of human retina aged seven months of gestation

Li Genlin, Liu Yueyue, Zhang Xiang, Lei Xiang, Wang Jinjin. Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China

Abstract Objective To study the human fetal retinal structure aged 7 months of gestation and explore the development properties of retinal cells in this period. **Methods** Four human fetal eyes with 7-month gestation were obtained during surgery for pregnancy termination due to trauma of pregnant women. The gestational age of the specimens was estimated based on both last menstrual period of pregnant women and weight/crown-heel length of fetal at delivery. Four pieces of retina at posterior pole were prepared from each eyeball and each group included 8 pieces of retinas. The structure and development of retina were examined under the scanning and transmission electron microscopy. Permissions from pregnant women and family member were guaranteed in this study. **Results** At 7-month gestation, fetal retina mainly consisted of the outer and inner layer. The outer one included photoreceptors with different shapes and a lot of mitochondria. Unmatured outer limiting membrane and cilium were found within distal end of cytoplasm of photoreceptors without outer segment. On lateral surface of photoreceptors, some structure such as spinal process-like, spherical-like and mushroom-like spherical membrane were found. Many nucleus mainly consisted of euchromatin and some nucleolus near karyotheca. In the outer plexiform, nerve fibres connected in a mesh fashion but synapses structure was untypical. The various cells with different shapes of nucleus were found in the inner nucleus layer and some nucleus contained both euchromatin and heterochromatin in equal portion. A few of intercellular electron-dense zones without typical synapse were found in the inner plexiform layer. Fewer ganglion cells with the nucleus containing heterochromatin and euchromatin and clear karyotheca were seen. In nerve fibre layer, fascic nerve plexus and nerve fibre with compacted alignment were also shown. Inner limiting membrane presented a thin layer and segment-like shape with some micropores of 2 ~ 3 μm. **Conclusion** Human retina from 7-month-old fetal shows immature structure and function.

Key words retina; fetal; ultrastructure; morphology

摘要 目的 探讨胚胎 7 个月时人视网膜组织结构和视网膜感光细胞、内核层细胞和神经节细胞的发育特征。**方法** 以胚胎 7 个月(27~28 孕周)因外伤自愿终止妊娠的流产人胚胎 2 例(4 只眼球)为研究对象,每只眼球于后极部定位取视网膜组织片 4 个,常规电镜标本处理程序后分别行扫描电镜和透射电镜观察。**结果** 人胚胎 7 个月视网膜分两层。外层为感光细胞层,内含大量线粒体,胞浆远端可见不完整外界膜,偶见纤毛结构,但未见感光细胞外节段。感光细胞层外侧面多见“棘突样”和“圆形”结构,散在“蘑菇状”形结构。部分感光细胞核呈分叶状,多数胞核以常染色质为主,核仁多偏心分布。外网状层疏松成网状,突触联系少见。内核层内可见胞核各异的多种细胞,部分胞核常/异染色质比例接近,核仁偏心分布。内网状层内可见细胞间电子致密带,但数量较少,未见典型的“突触结构”。神经节细胞数量稀少,部分核内异染色质多见,常染色质密度均匀,核膜清晰。神经纤维层内可见成束神经丝和较紧密排列的神经纤维。内界膜菲薄,部分结构呈节段样外观,其间散在直径为 2~3 μm 的微孔。**结论** 胚胎 7 个月时,人视网膜神经细胞结构幼稚于正常成熟期视网膜,神经细胞间功能联系不完善,提示此期人视网膜处于发育重塑的关键时期。

关键词 视网膜; 胚胎; 超微结构; 形态学

分类号 R 774.02 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0127-05

人和动物出生时的视觉系统并未发育成熟。对于胚胎视网膜的研究可以了解早期视网膜发育过程中其组织和功能学特点。研究发现,在人胚胎第9~12周,视网膜组织中首先出现视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)及其轴突,然后才出现感光细胞(photoreceptor cells, PRCs)^[1];在人胚胎第12~13周,后极部视网膜内出现内外网状层并开始形成神经突触,但周边部视网膜内未见类似变化^[2]。至今尚不清楚人胚胎中后期人视网膜组织结构的形态学特征,而这对于视觉系统发育和功能重塑研究至关重要。透射电镜能够平面观察胞内细微结构,扫描电镜则具有观察组织细胞三维立体形态的特性,两者结合能够有效观察视网膜组织和细胞结构,分析视网膜发育进程中的组织和细胞特征^[3]。本研究选用这两种手段对人胚胎27~28周即人胚胎7个月期间的视网膜结构进行了超微结构观察,以期对相关研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 眼球来源及固定方法

本研究选取27~28孕周时间段,因外伤自愿终止妊娠的流产人胚胎眼球标本2例(4个眼球)(北京妇产医院提供),均经孕妇及其家属知情同意后使用。胎龄根据孕妇的末次月经及测量胚胎的坐高数据,查对《中国人胚胎发育时刻表》^[4]判定,其中孕周27周1例,胎儿坐高248 mm;孕周28周1例,胎儿坐高252 mm。眼球取出后,快速置于2.5%戊二醛中,恒温4℃,行前固定。5 min后,自睫状体部分开眼球前后杯,保持视网膜于眼杯原位,继续行前固定至2 h。

1.2 视网膜定位及取材

1.2.1 分离眼杯 将经2.5%戊二醛固定5 min后的眼球从角膜缘后2 mm处环形切开,分离前后眼杯。将带有玻璃体的后眼杯转移至培养皿中,将玻璃体与视网膜分离,露出视网膜(尽量不要使视网膜随玻璃体分离时被牵拉脱离),使眼杯口朝上,将眼杯内加入2.5%戊二醛继续前固定。

1.2.2 视网膜定位 用视网膜定位器从视盘始放射状向周边行视网膜定位,然后用直径为6 mm的环钻器,沿以视乳头为中心的4个方向,依次在每个视网膜上取4片圆形视网膜。将所取视网膜移至另一培养皿内,继续前固定。本研究共取视网膜16片,采用随机数字表法,将标本分成2组,每组8片,分别用于两种电镜观察。

1.2.3 扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)检查 按照常规SEM法,完成标本前期处理。使用电

镜型号:Hitachi S-520。

1.2.4 透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)检查 按照常规TEM法,完成标本前期处理。使用电镜型号:Philip EM 208S。

2 结果

2.1 人胚胎7个月视网膜感光细胞及其突起超微结构

人胚胎7个月时,视网膜组织主要分为内外两层。外层为PRCs层,细胞多达8~10层,胞体大小均匀(图1A)。从视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层可见,PRCs表面覆盖一层致密物质,分布着形态较规整的棘突样和圆形结构(图1B)。其间散在球形膜状结构,一些球形结构呈“蘑菇状”,其根部伸入PRCs层内(图1C,1D),且其分布呈现明显的区域性(图1E)。外侧面可见PRCs节段外侧面聚集在一起的球形膜状结构,其根部均与其下的核层相连,但未见完整的节段(图1F)。冠状面可见PRCs核层与节段层间出现沟状分界线即外界膜所在部位(图1G)。

靠近RPE面,PRCs胞浆内富集大量线粒体,胞浆远端可见小的胞浆突起,偶见不完整的纤毛结构,但未见盘膜样的PRCs外节段(图2A,2B)。部分PRCs核呈分叶状,胞体间隙较大,细胞排列松散。胞核形态差异明显,核间分布欠整齐。多数胞核以常染色质为主,异染色质松散分布,部分核仁偏心分布(图2C)。外网状层间隙疏松成网状,神经纤维以一级分支为主,二级以下分支稀少,细胞间突触联系少见。PRCs与内核层细胞间可见联系建立,但联系类型欠清(图2D)。

2.2 人胚胎7个月视网膜内核层细胞及其突起的超微结构

SEM观察所见,与PRCs相比,此期内层视网膜分层不清(图1H),多处可见分叶核等形态各异的细胞,胞体间隙较大,细胞排列稀疏。部分胞核常染色质和异染色质比例接近,核仁偏心分布,但部分胞核以常染色质为主(图2E)。

TEM观察所见,视网膜内网状层内神经纤维交织成网,细胞间联系建立,虽可见电子致密带,但未见典型的突触结构。部分神经纤维之间留有网状间隙,神经纤维数量较少和分布密度较小,可见神经束样结构(图2F)。

2.3 人胚胎7个月RGCs及其突起超微结构

SEM观察所见,因内界膜较薄,可见其下神经纤维呈沿一定方向走行的束状结构,其间可见内界膜表面散在分布着孔径为2~3 μm的微孔(图1H)。TEM

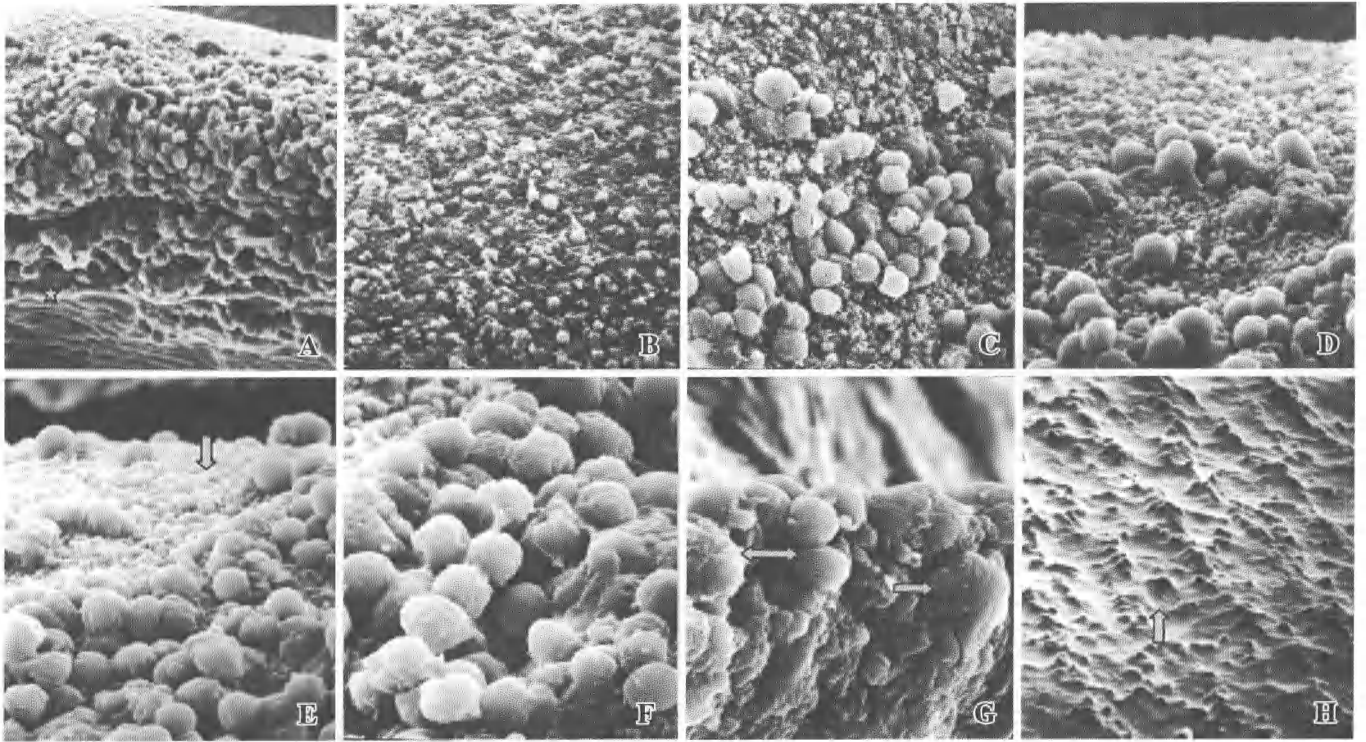


图 1 人胚胎 7 个月视网膜扫描电镜观察 A: 视网膜外层为 PRCs 层(细箭头), 内层为内核层和神经节细胞层(粗箭头), 神经纤维层和内界膜可见(☆)(×1 000) B: PRCs 胞体上覆盖一层致密物质, 表面分布着棘突样和圆形结构(×3 000) C: 部分 PRCs 胞体外侧散在球形膜状结构, 未见完整的 PRCs 外节段(×2 000) D: 视网膜 PRCs 外侧面观察可见棘突样结构和球形膜状结构, 一些“蘑菇状”结构根部伸入 PRCs 层内(细箭头)(×3 000) E: 视网膜 PRCs 外侧面观察可见球形膜状结构较多的部位未见棘突样结构(细箭头), 无球形膜状结构的区域则分布细小的棘突样结构(粗箭头)(×3 000) F: 视网膜 PRCs 外侧面观察, 局部可见 PRCs 节段外侧面聚集的球形膜状结构, 其根部均与其下的 PRCs 相连(细箭头)(×4 000) G: 从视网膜 PRCs 冠状面观察可见 PRCs 胞浆突起形成的球形结构(细箭头), PRCs 核层(粗箭头)与节段层间可见沟状分界线即外界膜所在部位(双向箭头)(×4 000) H: 视网膜内界膜下可见神经纤维层内的棘样突起(细箭头)和内界膜表面散在分布的微孔, 孔径为 2~3 μm(粗箭头)(×3 000)

Fig. 1 Human fetal retina aged 7 months of gestation under the scanning electron microscopy A: Retina consist of the outer layer and inner layer, Photoreceptors in the outer layer (thin arrow), inner nucleus and ganglion cell in the inner layer (thick arrow) are seen, and nerve fibre layer and inner limiting membrane can be seen (☆) (×1 000) B: The pykno-substance, spinal process-like and spherical-like structures are seen in the segment of photoreceptors from side of retinal pigment epithelium (×3 000) C: Spherical membrane structure without outer segment on the outer side of some photoreceptors is observed in the photofrom side of retinal pigment epithelium (×2 000) D: Spinal process-like and spherical-like structures locate on the outer side of photoreceptors, and the roots of “mushroom-like” structures within photoreceptors layer can be also seen (thin arrow) from the outer side of photoreceptors (×3 000) E: Spherical membrane structures in the area without spinal process-like structures (thin arrow) and tiny spinal process-like structures in the area without spherical membrane structures are seen from the outer side of photoreceptors (thick arrow) (×3 000) F: Spherical membrane structures on the outer side of photoreceptors segment with the end connecting with photoreceptors below (thin arrow) from outer side of photoreceptors (×4 000) G: Spherical membrane structures derive from kytoplasm (thin arrow). Outer limiting membrane between nucleus of photoreceptors and segments (two-way arrow) from coronal plane of photoreceptors (×4 000) H: Spinal process-like structures locate within nerve fibre layer (thin arrow) and micropore with diameter of 2~3 μm distribute scattered on the inner limiting membrane (thick arrow) (×3 000)

观察所见, 此期视网膜内可见数量稀少的 RGCs, 核膜形态清晰, 部分核内异染色质多见, 常染色质密度均匀。胞浆内可见粗面内质网(图 2G)。神经纤维层内可见成束神经微丝, 神经纤维排列较紧密。内界膜结构欠完整, 呈现致密程度不一的节段样结构, 局部可见微孔的凹陷结构(图 2H)。

3 讨论

组织学研究发现, 人胚胎 8~9 周时, 视网膜原始神经上皮首先分化为外神经母细胞层和内神经母细胞

层^[5-6]。在整个胚胎发育过程中, 视网膜组织内各种神经细胞发育经历了不同的时空过程。

3.1 人胚胎 7 个月视网膜感光细胞节段发育特征

迄今为止, 胚胎发育过程中感光细胞节段形成和塑形的研究报道较少, 人胚胎中后期感光细胞节段发育的文献报道更为少见。Saga 等^[7]研究发现, 鸡胚 5~8 d 时, 视网膜内可见 PRCs, 其胞浆内可见视色素颗粒、大分子蛋白质和一些细胞器; PRCs 具有对光弱反应性, 但在此期, PRCs 外节段尚未形成; 在鸡胚 15~17 d 即后期时, 视网膜内 PRCs 外节段才会形成,

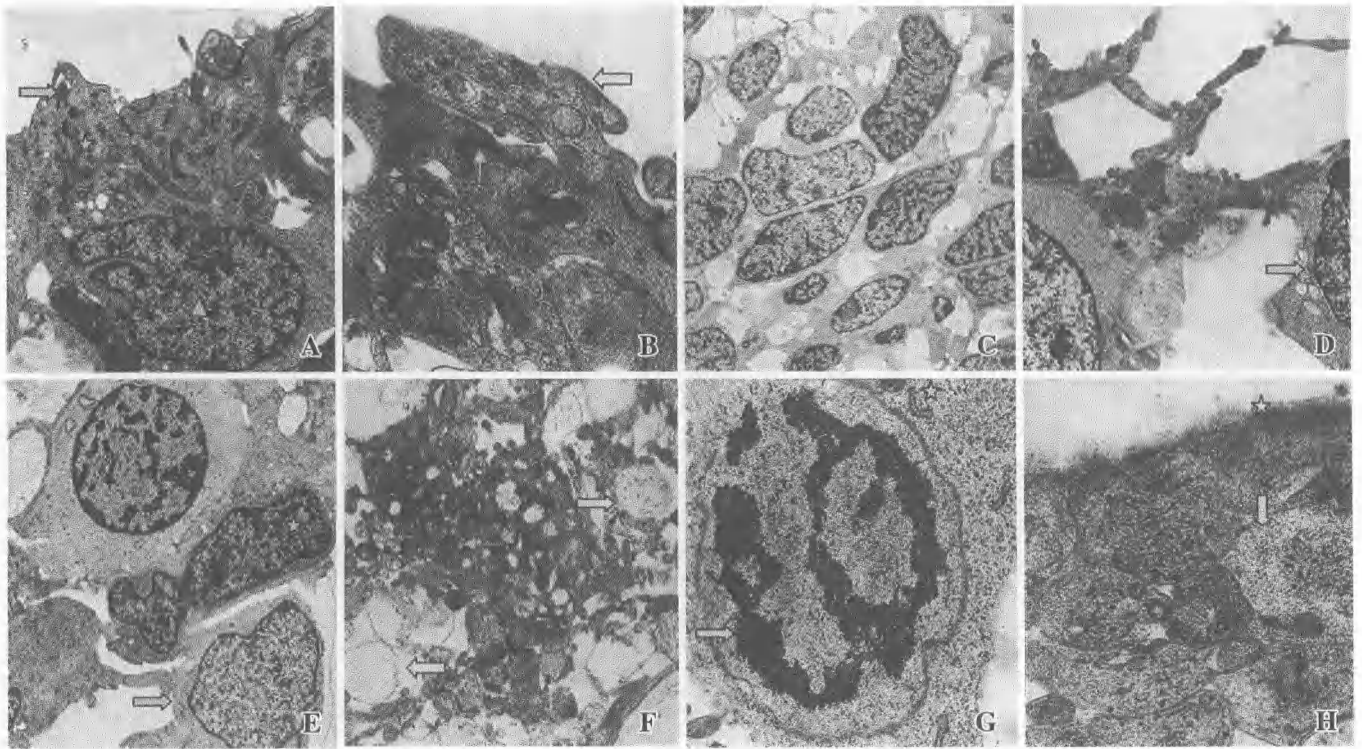


图 2 人胚胎 7 个月视网膜组织结构透射电镜观察 A: 视网膜 PRCs 胞浆内富集线粒体 (☆), 胞浆远端早期外界膜 (细箭头) 的外侧可见不完整纤毛结构 (粗箭头), 部分 PRCs 核呈分叶状 (△) (×8 000) B: 视网膜 PRCs 节段层可见致密带形成的外界膜 (细箭头), 其上方为内节段外伸的部分 PRCs 胞体 (粗箭头) (×20 000) C: PRCs 胞核形态差异明显, 多数胞核以常染色质为主, 异染色质松散分布, 可见部分胞核内核仁偏心分布 (细箭头) (×4 000) D: 视网膜外网状层间隙疏松成网状, 偶见 PRCs (细箭头) 与内核层细胞 (粗箭头) 间的联系 (×8 000) E: 视网膜内核层可见胞核形态不一的多种细胞, 核仁多偏心分布 (细箭头), 部分胞核以常染色质为主 (粗箭头)。可见呈分叶状的神经胶质细胞核 (☆) (×5 000) F: 视网膜内网状层的神经纤维交织成网, 可见胞间联系的致密区域, 未见典型的突触结构 (细箭头)。神经纤维数量较少, 可见神经束样结构 (粗箭头) (×10 000) G: RGCs 层可见数量稀少的神经节细胞核, 部分核内异染色质多见 (粗箭头)。核膜形态清晰 (细箭头)。胞浆内可见粗面内质网 (☆) (×12 500) H: 视网膜神经纤维层和内核膜神经纤维层内可见神经纤维横断面, 其内可见成束的神经丝 (粗箭头)。内核膜呈节断样外观 (☆), 可见内核膜凹陷的微孔结构 (细箭头) (×16 000)

Fig.2 Human fetal retina aged 7 months of gestation under the transmission electron microscopy A: Mitochondrias (☆), unmaturred outer limiting membrane (thin arrow) and cilium (thick arrow) within distal end of cytoplasm of photoreceptors and lobulated nucleus are seen in photoreceptors (△) (×8 000) B: Outer limiting membrane with dense zone (thin arrow) is seen in the layer of photoreceptors. Cell bodies of photoreceptors form inner segment (thick arrow) (×20 000) C: Morphology of nucleus of photoreceptors is obvious different in layer of photoreceptors. Nucleus contain euchromatin and locate near karyotheca (thin arrow) (×4 000) D: Mesh-like outer limiting membrane is exhibited, and the intercellular connections of photoreceptors (thin arrow) and cells from inner nucleus layer are seldome (thick arrow) (×8 000) E: Several cells have varied and near karyotheca nucleus (thin arrow). The nucleus mainly consisted of euchromatin (thick arrow) and lobulated nucleus of glia cell (☆) in the layer of inner nucleus layer (×5 000) F: Mesh-like interspace of nerve fibre, and electron-dense zone without intercellular synapse are found (thin arrow). Nerve fibre form fassel nerve plexus in layer of inner plexiform layer (thick arrow) (×10 000) G: Few nucleus of ganglion cells with heterochromatin (thick arrow) and clear karyotheca (thin arrow) are displayed. Rough endoplasmic reticulum in intracytoplasm can be seen (☆) (×12 500) H: Fassel nerve plexus in nerve fibre layer are displayed (thick arrow), and the inner limiting membrane shows segment-like (☆) and micropores (thin arrow) (×16 000)

提示节段形成始于 PRCs 发育的后期阶段。除了胚胎时程特性外, Hollyfield 等^[8] 研究发现, PRCs 外节段盘膜的形成依赖于光线刺激。有光持续刺激时, 盘膜合成速率最高; 无光持续刺激时, 盘膜合成速率则最低。提示环境因素对感光细胞内外节段形成具有一定的影响。

本研究发现, 人胚胎 7 个月时, PRCs 外节段尚未出现。虽然 PRCs 近 RPE 面可见富含线粒体的内节段胞浆结构, 也可见散在的位于内外节段之间的早期纤毛结构, 但始终未见呈盘膜样排列的 PRCs 外节段。

本研究提示人胚胎 7 个月时, PRCs 发育处于节段形成的前期阶段。从球状和棘突样内节段形态的不同, 反映了视网膜不同部位的感光细胞内节段形成存在着时程和区域上的发育差异性。Olney^[9] 的早期研究发现, 小鼠 PRCs 外节段的形成是在出生后第 5 ~ 6 d, 而不是在胚胎期。此与人类 PRCs 节段形成和发育相似。

3.2 人胚胎 7 个月视网膜 PRCs 发育特征

Mandell 等^[10] 报道, 视锥和视杆细胞突起具有一定的再生能力。他们通过细胞培养发现, 体外培养 3 d 后, 视锥和视杆细胞能够形成含有肌动蛋白的丝状伪

足,以及含有微管蛋白和突触小泡的神经突起,且视锥细胞形成的含有突触小泡的神经突起主要靠近胞体,而视杆细胞形成的神经突起远离胞体;还发现,视锥和视杆细胞神经突起的形成不依赖于细胞间的相互作用,提示感光细胞具有内源性的神经突起再生作用,但这种内源性调控机制尚不清楚。人胚胎 11~14 周时,视网膜组织中可见视锥细胞的前体细胞,其主要排列在外神经母细胞层的外侧;人胚胎 15~20 周时,视网膜组织中可见双极细胞从外向内移行,视杆细胞和外网状层开始形成^[5-6]。

本研究发现,人胚胎 7 个月时,视网膜外界膜上出现粘连小带,提示 PRCs 之间以及 PRCs 与 Müller 细胞间的联系已经建立。但此期视网膜神经上皮层发育尚未成熟,PRCs 核形态变异较大,染色质密度和分布存在明显的核间差异。在原位条件下,难以根据形态学特征区别视锥细胞和视杆细胞。在人胚胎 7 个月时,外网状层结构疏松,神经突起分支稀少,提示在此期 PRCs 神经突起的再生过程尚不完善,其轴突发育处于早期阶段。

3.3 人胚胎 7 个月神经节细胞发育特征

早在 1968 年,Olney^[9]研究发现,胚胎小鼠视网膜各层结构的发育按照从内向外的空间顺序进行:最先出现 RGCs 层,其次是中间神经元,最后是 PRCs 节段层。对于人视网膜,研究发现人胚胎 10~11 周时,RGCs 始从内神经母细胞层往内迁移;人胚胎 12~13 周时,可分辨出 RGCs 层、内网层及神经纤维层^[5-6]。Provis 等^[1]报道,人胚胎 14 周时,可见稀疏的 RGCs;人胚胎 20 周时,可见与正常成人 RGCs 相似的幼稚节细胞;人胚胎 24 周时,可见发育较成熟的 RGCs 及其前体细胞;人胚胎 30 周时,可见视网膜中与血管伴行的,形态一致的 RGCs 层。梁平等^[11]报道,人胚胎 8 个月时,RGCs 核浆比例为 1:2,核缩小并偏向一极,细胞器丰富,其结构与成人相同,提示此期 RGCs 已经发育成熟。

本研究发现,人胚胎 7 个月 RGCs 内,胞核染色质分布均匀,核膜完整,胞浆内细胞器多见,其轴突内可见清晰的神经微丝等结构,提示人胚胎 7 个月时,RGCs 发育良好,此与 Provis 等^[1]和梁平等^[11]的研究相似。本研究还发现人胚胎 7 个月视网膜内,内网状层内神经突触较少,神经突起分支稀疏,提示此期内层视网膜组织内神经细胞功能联系与外层视网膜相似,均处于尚未发育成熟阶段。同时也验证了胚胎视网膜组织中功能构建迟于细胞发育的论点,此与 Olney^[9]的发现相似,进一步提示胚胎视网膜神经细胞发育具有种系相似性。

参考文献

- 1 Provis JM, Billson FA, Russell P. Ganglion cell topography in human fetal retinae [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983, 24(9): 1316-1320
- 2 Hollenberg MJ, Spira AW. Human retinal development; ultrastructure of the outer retina [J]. *Am J Anat*, 1973, 137(4): 357-385
- 3 刘哲峰, 刘英奇, 张希兰, 等. 正常人视网膜内层扫描电镜观察 [J]. *眼科新进展*, 1993, 13(1): 1-3
- 4 谷华运. 中国人胚胎发育时序和畸形预防 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 232-251
- 5 何素云. 人胎视网膜的组织发生 [J]. *解剖学报*, 1988, 19(3): 323-326
- 6 蔡兆明, 陈瑞华, 陈小铭. 人视网膜发生的光镜和电镜观察 [J]. *解剖学杂志*, 1991, 14(3): 212-215
- 7 Saga T, Scheure D, Adler R. Development and maintenance of outer segments by isolated chick embryo photoreceptor cells in culture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(4): 561-573
- 8 Hollyfield JG, Rayborn ME. Photoreceptor outer segment development: light and dark regulate the rate of membrane addition and loss [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1979, 18(2): 117-132
- 9 Olney JW. An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina [J]. *Invest Ophthalmol*, 1968, 7(3): 250-268
- 10 Mandell JW, MacLeish PR, Townes-Anderson E. Process outgrowth and synaptic varicosity formation by adult photoreceptors in vitro [J]. *J Neurosci*, 1993, 13(8): 3533-3548
- 11 梁平, 陈小铭, 钟秀容. 人胎 RGCs 发育的光电镜观察及其临床意义 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 1992, 10(4): 248-251

(收稿:2008-09-16 修回:2008-12-25)

(本文编辑:高红)

本刊对统计学符号的要求

统计学符号参照 GB3358-82《统计学名词及符号》的有关规定书写,例如:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} 表示,不用 X 及 Mean 或 M(中位数仍用 M);(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 $s\bar{x}$,不用 SE 及 SEM;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 ν (纽);(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P (P 值前应给出统计量值,如 t 值, χ^2 值, q 值等)。以上符号均用斜体。

(本刊编辑部)