

## · 实验研究 ·

# 人胚胎干细胞定向分化为晶状体小体过程中晶状体发育相关转录因子的动态变化

韩琛璐 王春筱 李金燕 罗莉霞

510060 广州,中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室

通信作者:罗莉霞,Email:luolixia@mail.sysu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.07.004

**【摘要】 目的** 探讨人胚胎干细胞(hESC)定向分化为晶状体小体(LB)过程中晶状体发育相关转录因子的表达特点和规律。**方法** 通过“三阶段法”体外诱导 hESC 定向分化为 LB。取 hESC(D0)和诱导分化不同时间点的细胞,应用高通量测序技术,通过生物信息学方法分析晶状体发育相关的转录因子及其亚型的表达变化特点和规律。采用 Western blot 法和免疫荧光染色技术对相关基因在蛋白水平的表达进行检测。**结果** 光学显微镜下,未分化的 hESC 呈圆形;分化后 0~6 d(D0~D6)的细胞更圆且排列更紧密;D7~D18 细胞由圆形逐渐延长变为梭形;D19~D32,形成有三维立体结构的透明结构,即 LB。荧光定量 PCR 结果显示,干细胞标记基因的表达在分化过程显著降低,而晶状体特异性基因的表达明显升高。免疫荧光染色结果显示,LB 表达晶状体特异性蛋白  $\alpha$ -crystallin 和  $\beta$ -crystallin。高通量测序聚类分析结果显示,D0 与 D32 之间的转录因子基因表达谱差异最为显著,而 D6 和 D18 之间的差异最小。前基板基因 *DLX3*、*DLX5*、*DLX6*、*HES1*、*HES4*、*OTX2* 和 *EYAI* 在分化第一阶段表达显著升高,随后下降;晶状体特异性基因中 *SOX2* 蛋白表达逐渐降低,而后升高,而 *PAX6* 蛋白的表达随分化时间延长逐渐增加;晶状体分化基因 *MAB21LI*、*CMAF*、*PROX1* 及 *PITX3* 等在分化早期变化不显著,在分化第三阶段表达明显增加。**结论** 体外定向分化的 3 个阶段依次对应体内晶状体发育的前基板外胚层(PPE)阶段、前晶状体外胚层(PLE)和晶状体外胚层(LE)阶段、晶状体泡(LV)和晶状体细胞分化阶段,提示 hESC 体外定向分化过程很好地模拟了体内晶状体的胚胎发育过程,为研究晶状体发育和先天性晶状体疾病的分子机制提供了理想的模型。

**【关键词】** 人胚胎干细胞; 晶状体小体; 转录因子; 高通量测序

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81370994、81770905)

## Expression dynamics of lens development-associated transcription factors in human embryonic stem cell-induced lentoid body

Han Chenlu, Wang Chunxiao, Li Jinyan, Luo Lixia

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Luo Lixia, Email: luolixia@mail.sysu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the expression dynamics of lens-related transcription factors in human embryonic stem cell (hESC) differentiated into lentoid body (LB). **Methods** A “three-stage” protocol was used for LB directional differentiation from hESC *in vitro*. The hESC (D0) and three differentiation stages cells were collected to analyze the expression dynamics of lens development-associated transcription factors by high throughput RNA sequencing technology in hESC-induced LB. Western blot and cell immunofluorescence were used to observe the involved genes at protein level. **Results** During D0–D6, cells became more round and compact. And during D7–D18, cells morphology gradually changed to spindle. At the end of D35, three-dimensional and transparent structure-lentoid body (LB) was obtained. RT-PCR results showed that the stem cell related genes reduced and the lens specific genes increased significantly, and the LB was characterized by the expression of crystallins. According to clustering analysis of high throughput sequencing, a distinct difference in transcription factors gene expression was observed between D0 and D32. Meanwhile, the difference between D6 and D18 was minimum. The expressions of preplacodal genes, including *DLX3*, *DLX5*, *DLX6*, *HES1*, *HES4*, *OTX2* and *EYAI* increased remarkably at the first

induction stage and then decreased. Lens-specification gene *SOX2* declined gradually and then increased. In addition, the expression of *PAX6* increased during all three induction stages. Furthermore, lens-differentiation genes including *MAB21LI*, *CMAF*, *PROX1* and *PITX3* had no significant change in the early induction stage, but increased significantly at the third induction stage. **Conclusions** The expression dynamics of lens development-associated transcription factors in the hESC induced LB corresponded to those *in vivo*, which indicate that this induction system can recapitulate early lens development well and lay the foundation of studying lens embryonic development and transcription factor associated congenital lens diseases.

[**Key words**] Human embryonic stem cell; Lentoid body; Transcription factor; High throughput RNA sequencing

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81370994, 81770905)

多种转录因子共同作用可调控晶状体的胚胎发育过程,包括神经和非神经外胚层的形成以及晶状体基板(lens placode, LP)、晶状体泡(lens vesicle, LV)以及晶状体上皮和纤维细胞的分化<sup>[1]</sup>。人晶状体发育过程中转录因子的基因突变会引起多种眼部疾病。已有研究表明,转录因子基因 *MAF*、*FOXE3* 和 *PROX1* 的突变会引起白内障、无晶状体、小眼畸形和角膜后胚胎环等先天性疾病<sup>[2-4]</sup>。晶状体发育相关转录因子分为前基板基因、晶状体特异性基因和晶状体分化基因<sup>[5]</sup>,探讨各转录因子在晶状体发育过程中的表达和功能对于了解晶状体发育和晶状体相关疾病的发生机制至关重要。近年来,人胚胎干细胞研究(human embryonic stem cells, hESCs)为组织器官的发育和机制的研究提供了良好的工具。目前已有研究成功地将 hESCs 和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)诱导为表达晶状体标志物  $\alpha$ -crystallin、 $\beta$ -crystallin 和 phakinin 的晶状体小体(lentoid body, LB)<sup>[6-8]</sup>,这为体外研究晶状体的发育提供了有用的模型。但是,体外定向分化体系中晶状体发育相关转录因子的变化特点与体内晶状体胚胎发育的过程是否符合尚不明确。本研究中拟采用高通量测序技术检测 hESCs 定向分化为 LB 过程中晶状体发育相关转录因子的表达特点和规律,并探索 hESC 体外定向分化过程是否很好地模拟了体内晶状体的胚胎发育过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** hESCs H9 细胞系由中山大学中山眼科中心陈舒怡教授惠赠。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 基质胶(Matrigel, 美国 BD 公司); hESCs 培养基 mTeSR 和消化液(加拿大 StemCell 公司);牛血清清蛋白和蛋白酶抑制剂 PMSF(美国 Sigma 公司);DMEM/F-12 培养基、非必需氨基酸、GlutaMAX 添加剂、N2 添加剂、B27 添加剂(美国

Gibco 公司);重组生长因子 Noggin、BMP4、BMP7、WNT3A、FGF2(美国 PEPROTECH 公司);逆转录试剂盒 Prime Script RT Master Mix、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq、DNase I(日本 Takara 公司);驴血清(美国 Jackson Immune Research 公司);测序试剂盒 VAHTS mRNA-seq v2 Library Prep Kit(美国 Illumina 公司);小鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体(ab8224, 1:1 000);兔抗人 SOX2 多克隆抗体(ab92494, 1:1 000)(美国 Abcam 公司);山羊抗人  $\alpha$ A-crystallin 多克隆抗体(sc-22389, 1:1 000)、小鼠抗人  $\beta$ -crystallin 单克隆抗体(sc-48335, 1:500)、小鼠抗人 OTX2 单克隆抗体(sc-514195, 1:200)、兔抗人 OCT4 多克隆抗体(sc-9081, 1:250)(美国 Santa Cruz 公司);兔抗人 Pax6 多克隆抗体(PRB-278P, 1:200, 美国 Covance 公司);Alexa Fluor 488 标记的驴抗山羊二抗(A-11055, 1:500)、Alexa Fluor 488 标记的驴抗兔二抗(A-21206, 1:500)、Alexa Fluor 568 标记的驴抗小鼠二抗(A-10037, 1:500)、Alexa Fluor 568 标记的驴抗兔二抗(A-10042, 1:500)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(G-21234, 1:5 000)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(31430, 1:5 000)、TRIzol Reagent(美国 Thermo fisher 公司)。7000 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 hESCs 体外培养和 LB 的诱导分化** 采用 mTeSR 培养基培在 Matrigel 包被的 12 孔板中培养 hESCs,细胞放置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中。细胞生长至 70% ~ 80% 融合时将细胞消化 5 min 后,然后以 1:4 的比例传代至 12 孔板中,每天换液。参照文献[6]的三阶段法将 hESCs 诱导分化为 LB,待细胞生长至 80% ~ 90% 时更换为基础培养基(DMEM/F-12+质量分数 0.05% 牛血清清蛋白+质量分数 1% 非必需氨基酸+2 mmol/L GlutaMax 添加剂+1 倍 N2 添加剂+1 倍 B27 添加剂),并按如下顺序

依次在基础培养基中加入生长因子:在第 0~6 天(D0~D6, 第一阶段)加入 100 ng/ml Noggin, 在第 7~18 天(D7~D18, 第二阶段)加入 20 ng/ml BMP4、20 ng/ml BMP7 和 100 ng/ml FGF2, 在第 19~32 天(D19~D32, 第三阶段)加入 20 ng/ml Wnt3A 和 100 ng/ml FGF2。隔天更换培养液 1 次, 倒置显微镜下观察细胞形态变化。实验分为未分化的 hESCs (D0) 组以及分化第 6 天(D6)组、第 18 天(D18)组和第 32 天(D32)组。

**1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测 hESCs 定向分化为 LB 过程中干性基因和晶状体特异性基因的表达** 取定向分化 D0、D6、D18 和 D32 共 4 个时间点的 12 孔板细胞, 加入 1 ml TRIzol 充分裂解细胞后使用 200 μl/ml 酚氯仿剧烈振荡两相分离, 取上层溶解 RNA 的水相加入 0.5 ml 异丙醇中沉淀, 离心半径 8.5 cm, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 向沉淀中加入 1 ml 体积分数 75% 乙醇, 振荡洗涤 RNA, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后空气中干燥 10 min, 加入无 RNA 酶水溶解沉淀。按照试剂盒提供的步骤将 RNA 逆转录成 cDNA, 配制 20 μl 反应体系, 37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 s, 4 °C 终止反应。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μl, 引物序列见表 1, 循环条件为 95 °C 预变性 20 s; 95 °C 变性 3 s, 60 °C 退火并延伸 30 s, 扩增 40 个循环。以 GAPDH 作为内参照, 按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各基因的相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 目的基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F:TCGTGAAGGACTCATGACC R:AGGCAGGGATGATGTTCTGG
OCT4	F:CCCGAAAAGAGAAAGCGAACC R:TACAGAACCACACTCGGACC
NANOG	F:TGTCTTCTGCTGAGATGCCT R:AGTGGTGTGTTTGCCTTTGG
CRYAA	F:AAGGTGCAGGACGACTTTGT R:GTGGAATCACCAGGAAATGT
CRYAB	F:GTTCTTCGGAGAGCACCTGTT R:GAGAGTCCAGTGTCAAACCCAG
CRYBB2	F:CCATCAAAGTGGACAGCC R:CGCACAGATGACACCTTC
CRYGC	F:TGAGCGTCCCAACTACCAAG R:GTGGAGGAACGGATCTCG
BFSP1	F:GCAAAGGACAGGCACAAGAA R:CGTCACAATGGATGCTGGAG
BFSP2	F:CAGTCTTGGAAAATGCCCGG R:ATTTCTCTTCTGCCGCCTT

**1.2.3 细胞免疫荧光染色法检测 hESCs 定向分化为 LB 过程中各目的蛋白的表达和定位** 细胞在室温下

用 4 °C 预冷的质量分数 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBST 洗涤 3 次, 0.5% Triton X-100 室温孵育 10 min, PBST 洗涤 3 次。用质量分数 5% 驴血清封闭 30 min, 加入相应一抗, 4 °C 孵育过夜。次日用 PBST 洗涤 3 次, 避光加入对应种属的二抗, 室温孵育 1 h, DAPI 复染细胞核 5 min, PBST 洗 3 次, 荧光显微镜下观察并拍照。

**1.2.4 Western blot 法检测 hESCs 定向分化为 LB 过程中各目的蛋白的表达** 取定向分化 D0、D6、D12、D18、D24 和 D32 的细胞, 用含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 缓冲液在冰上裂解 30 min, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液中的蛋白。用质量分数 10% 和 5% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 并转印到 PVDF 膜。用 TBST 配制的 5% 脱脂牛奶室温封闭膜 1 h, 加入相应一抗 4 °C 孵育过夜。TBST 洗 3 次, 室温下孵育相应种属的二抗 1 h, 以  $\beta$ -actin 作为内参照。采用 Photoshop 图像分析软件对条带进行灰度分析, 以目的条带灰度与  $\beta$ -actin 条带灰度的比值代表蛋白的相对表达量。

**1.2.5 高通量测序技术检测 hESCs 定向分化为 LB 过程中晶状体发育相关转录因子的表达变化** 取定向分化 D0、D6、D18 和 D32 的细胞, 各组给予 2 次独立重复。按照上述 RNA 抽提步骤提取细胞 RNA 并使用 DNase I 纯化。取获得的 RNA 5 μg 使用 VAHTS 试剂盒建立测序文库: polyA 标记的磁珠分离 mRNA, 而后打断为 200~300 bp 的片段, 经逆转录、末端修复以及末端加 A 碱基, 片段化的 cDNA 会结合在测序接头上。所建的文库在中山眼科中心国家重点实验室使用 Illumina HiSeq 2500 进行双端测序, 所得的原始 FASTQ 数据已上传至 SRA (Sequence Read Archive) 数据库, 检索号是 SRP091605。用 Tophat v2.0.12 匹配测序结果到人类参考基因组 (ENSEMBL database), 并通过 HTSeq v0.6.0 计算基因转录表达量, 以每 1 百万个拼接上的短序列中拼接到外显子上的每 1 000 个碱基上的短序列数 (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped, FPKM) 来标准化基因表达量, 定义 FPKM  $\geq 2$  为表达基因。采用 IGV 对晶状体发育相关转录因子进行层次聚类分析。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用均衡分组多水平研究设计, 体外定向分化不同时间点各基因在 mRNA 水平相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hESCs 定向分化为 LB 过程中细胞的形态变化

光学显微镜下未分化的 hESCs 呈圆形(图 1A); D0 ~ D6 的细胞形态未发生明显改变,但形状更圆且排列更紧密(图 1B); D7 ~ D18 的细胞形态由圆形逐渐延长,逐渐变为梭形(图 1C); D19 ~ D32 的细胞从培养板表面脱离,其他细胞缓慢聚集,形成有三维立体结构的透明结构,即 LB(图 1D)。

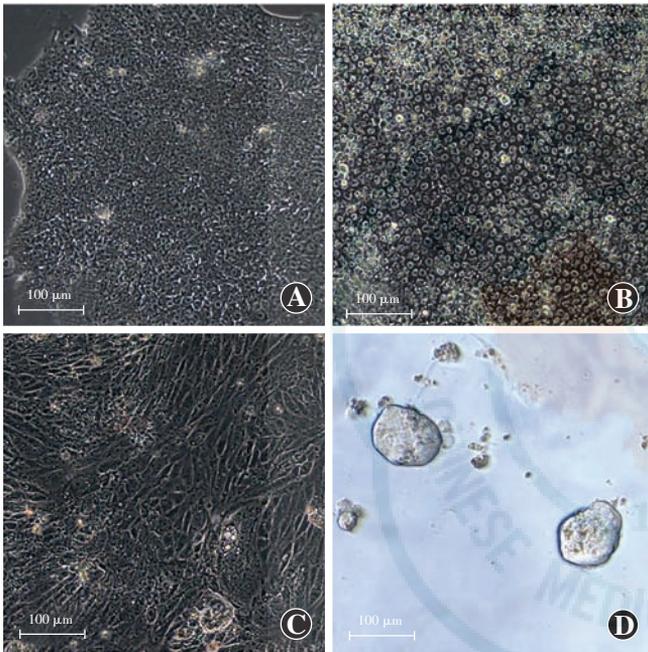


图 1 光学显微镜下观察 hESCs 定向分化为 LB 过程中细胞的形态变化(标尺=100 μm) A:未分化的 hESCs(D0)细胞呈圆形 B:D6 细胞形态未发生明显变化 C:D18 细胞变为长短不一的梭形 D:D32 细胞聚集成透明球形

### 2.2 hESCs 定向分化形成 LB 的鉴定

2.2.1 LB 中各基因相对表达量变化 干性基因 *OCT4* mRNA 和 *NANOG* mRNA 相对表达量在 D32 时显著降低, *CRYAA* mRNA、*CRYAB* mRNA、*CRYBB2* mRNA、*CRYGC* mRNA 和 *BFSP1*、*BFSP2* 相对表达量在 D32 时逐渐升高(表 2)。

表 2 不同时间各个目的基因相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

基因	D0	D6	D18	D32
<i>OCT4</i>	1.00±0.22	0.75±0.17	0.72±0.12	0.12±0.01
<i>NANOG</i>	1.00±0.15	0.69±0.14	0.88±0.18	0.12±0.02
<i>CRYAA</i>	1.00±0.18	12.01±1.70	106.87±18.03	207 028.96±45 949.19
<i>CRYAB</i>	1.00±0.18	1.49±0.39	9.97±1.80	341.04±79.14
<i>CRYBB2</i>	1.00±0.18	2.60±0.67	2.38±0.64	136.5±30.05
<i>CRYGC</i>	1.00±0.13	0.24±0.05	16.41±1.95	13 286.65±1 475.33
<i>BFSP1</i>	1.00±0.05	1.27±0.15	1.51±0.37	2.33±0.57
<i>BFSP2</i>	1.00±0.25	0.71±0.17	1.31±0.19	9.94±2.93

2.2.2 LB 中  $\alpha$ -crystallin 和  $\beta$ -crystallin 蛋白的表达 定向分化第三阶段结束时(D32)形成的三维立体透明结构中晶状体蛋白  $\alpha$ -crystallin 和  $\beta$ -crystallin 呈阳性表达,分别呈绿色荧光和蓝色荧光(图 2)。

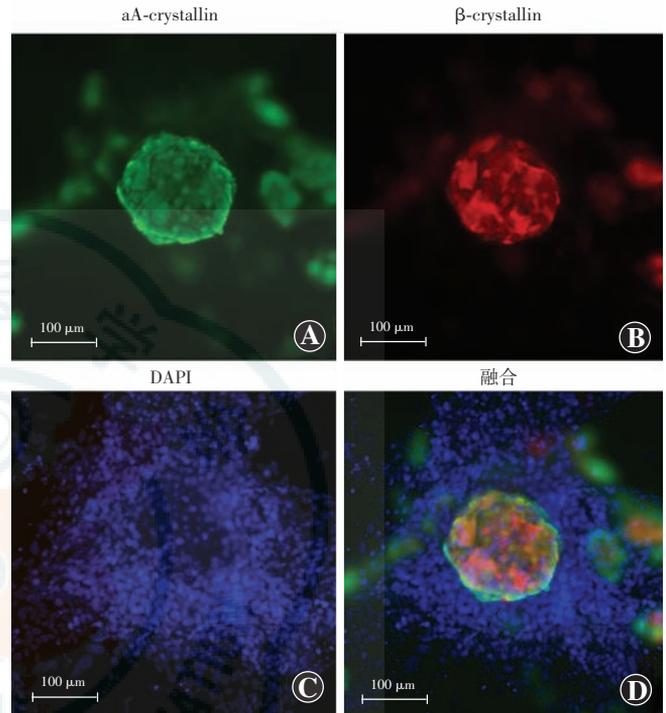


图 2 细胞免疫荧光染色鉴定 LB(标尺=100 μm) D32 的细胞免疫荧光染色可见  $\alpha$ A-crystallin 表达阳性,呈绿色荧光(Alexa Fluor 488),  $\beta$ -crystallin 表达阳性(Alexa Fluor 568),呈荧光,细胞核呈蓝色荧光(DAPI)

### 2.3 高通量测序的基因表达谱分析

高通量测序对 D0、D6、D18 和 D32 时间点分别获得 33.8、58.4、44.1 和 62.8×10<sup>6</sup> 基因读段数,每组中至少有 13 405 个表达基因。4 个时间点细胞基因表达谱的层次聚类分析显示,D6 和 D18 转录因子基因表达谱聚为一类,与 D32 转录因子基因表达谱接近,D0 与 D32 的细胞转录因子基因表达谱之间的差异最为显著(图 3)。

### 2.4 晶状体发育相关转录因子相对表达量的动态变化

2.4.1 前基板基因的动态变化 D0 ~ D6 阶段显著升高并达到峰值的基因包括 *DLX3*、*DLX5*、*DLX6*、*HES1*、*HES4*、*OTX2* 和 *EYA1*, *SIX1* 基因表达无明显变化, *SIX4* 和 *EYA2* 基因在 D0 ~ D6 阶段稍有降低,D6 ~ D18 阶段升高(图 4)。

2.4.2 晶状体特异基因和干细胞标志物表达动态变化 免疫荧光染色结果显示,D0 ~ D6 阶段 SOX2 蛋白表达增强,D18 时不表达 SOX2 蛋白的细胞可检测到 *OTX2* 蛋白表达,D32 形成的 LB 中可检测到 *OTX2* 和

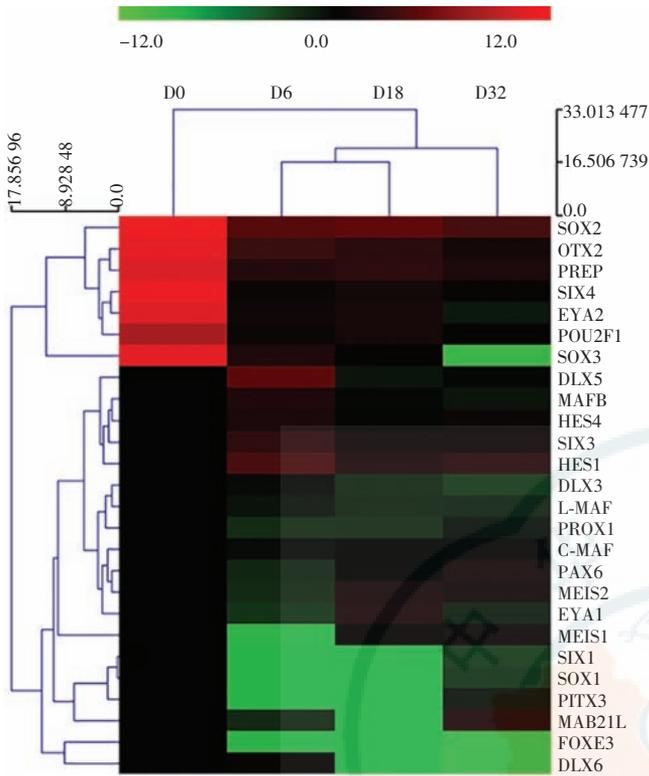


图 3 晶状体发育相关转录因子 mRNA 表达谱聚类分析图 将转录因子在每个组中的表达量进行层次聚类分析。表达量的变化用颜色的变化表示,绿色表示表达量较低,红色表示表达量较高。聚类分析结果提示 D6 和 D18 聚为一类,D0 和 D32 之间差异最为显著

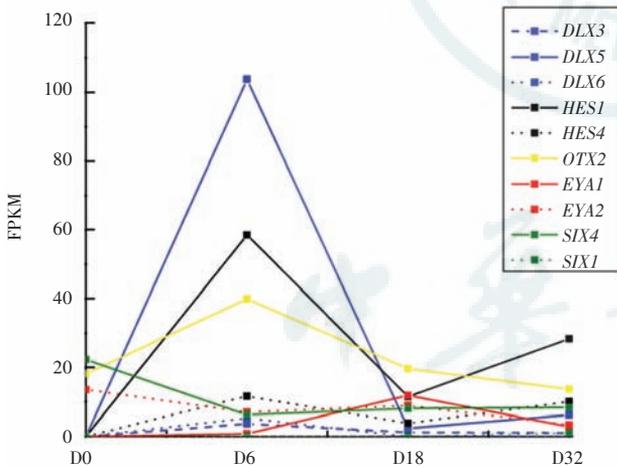


图 4 高通量测序分析前基板基因在分化过程中的动态变化 测序分析了 D0、D6、D18 和 D32 共 4 个时间点前基板基因 *DLX3*、*DLX5*、*DLX6*、*HES1*、*HES4*、*OTX2*、*EYA1*、*EYA2*、*SIX4* 和 *SIX1* 在 mRNA 水平的表达变化,结果显示大部分前基板基因在 D0 到 D6 时间段明显升高

SOX2 共同表达(图 5)。Western blot 法检测结果显示,分化过程中 SOX2 的表达逐渐减少,D32 时重新被检测到(图 6A)。量化分析结果也显示,SOX2 蛋白的表达先降低且在 D32 时升高(图 6B)。OTX2 蛋白在 D6、D12 和 D18 时有微弱的表达(图 6A)。另外,免疫荧光染色结果显示 hESCs 在分化的 D6 开始表达

PAX6 蛋白且逐渐增强,OTX4 蛋白的表达水平随分化的时间的延长而逐渐减弱,在分化结束时,几乎所有的细胞都表达 PAX6 蛋白,而很少有细胞表达 OCT4 蛋白(图 5)。同时,高通量测序和 Western blot 法检测均发现 PAX6 在 mRNA 和蛋白水平的表达在分化过程中逐渐升高(图 6)。

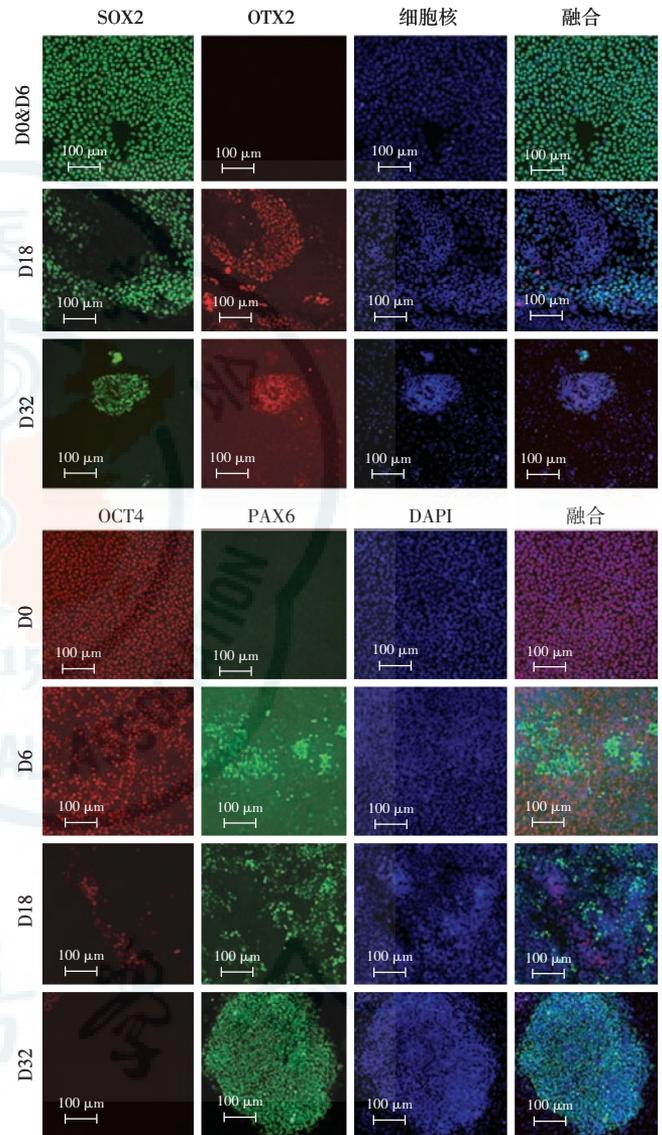


图 5 免疫荧光染色检测晶状体特异基因 *SOX2*、*OTX2*、*PAX6* 和干细胞标志物 *OCT4* 在定向分化过程中的定位和表达强度变化 基因 *SOX2* 和 *PAX6* 呈绿色荧光(Alexa Fluor 488),基因 *OTX2* 和 *OCT4* 呈红色荧光(Alexa Fluor 568),细胞核呈蓝色荧光(DAPI)(标尺 = 100 μm)

2.4.3 晶状体分化基因的动态变化 高通量测序结果显示,D18 ~ D32 阶段显著升高并达峰值的基因有 *MAB21L1*、*CMAF*、*PITX3* 和 *PROX1*, *FOXE3*、*LMAF* 和 *MAFB* 在此阶段无明显变化(图 7)。

### 3 讨论

脊椎动物的晶状体来源于头部表面外胚层,其首

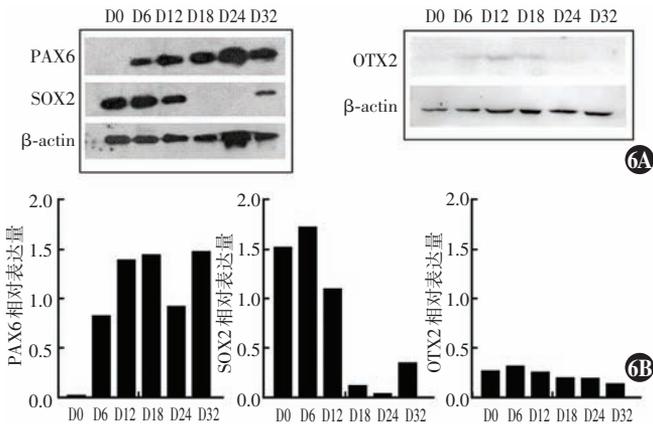


图 6 Western blot 法检测 PAX6、SOX2 和 OTX2 蛋白在定向分化过程中的表达变化 A: Western blot 法检测 PAX6、SOX2 和 OTX2 的蛋白表达电泳图,  $\beta$ -actin 为内参 B: 不同时间点 PAX6、SOX2 和 OTX2 的蛋白表达的量化比较

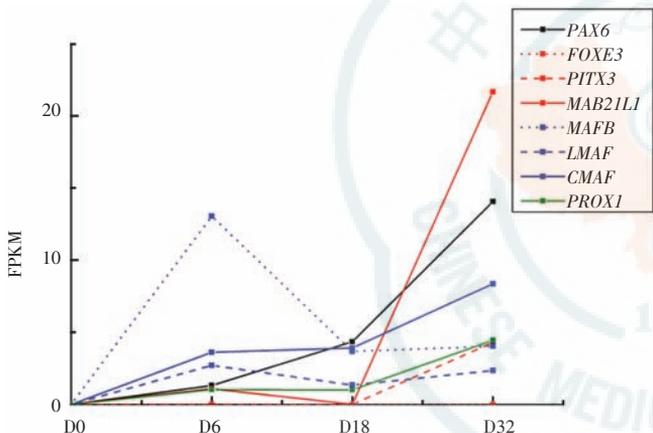


图 7 高通量测序分析晶状体分化基因在分化过程中的动态变化 测序分析了 D0、D6、D18 和 D32 共 4 个时间点前基板基因 *FOXE3*、*PITX3*、*MAB21LI*、*MAFB*、*LMAF*、*CMAF* 和 *PROX1* 在 mRNA 水平的表达变化, 大部分晶状体分化基因在 D18 ~ D32 阶段明显升高

先发育为 LP, 接着基板通过增厚和内陷形成 LV, 随后与外胚层分离。LV 的前极和后极细胞分别分化为晶状体上皮细胞和初级纤维细胞, 从而形成三维立体结构的晶状体<sup>[1]</sup>。已有研究发现晶状体的透明度和折射率等光学特性依赖于晶状体纤维细胞中晶体蛋白的积累<sup>[9]</sup>。本研究发现, 随着生长因子的依次加入, 细胞晶状体蛋白的表达水平逐渐升高, 并最终形成透明立体结构的 LB。

研究表明, 在原肠胚形成时 PPE 可表达包括 *DLX3*、*DLX5*、*DLX6*、*HES1*、*HES4* 和 *OTX2* 等的前基板基因调控未来的晶状体外胚层 (prospective lens ectoderm, PLE) 的形成<sup>[5]</sup>, 随后由 *PAX6*、*SIX3* 和 *SOX2* 组成的基因调控网络 (gene regulatory network, GRN) 在 LP 的形成中起重要作用<sup>[1-5]</sup>。此外, 晶状体细胞分化过程中还需要不同的转录因子来决定细胞命运。例

如, *PITX3* 及其下游的效应分子 *FOXE3* 对于维持晶状体上皮表型至关重要<sup>[10]</sup>。本研究中参照文献<sup>[6]</sup>的三阶段法进行体外诱导, 使 hESCs 分化为 LB, 并使用高通量测序技术对定向分化过程中晶状体发育相关转录因子的动态变化进行测定, 结果提示该诱导体系在体外高度模拟了体内晶状体的发育过程, 这为研究人类晶状体发育、再生以及转录因子相关的先天性晶状体疾病内在机制的研究提供了理论基础和理想模型。

*DLX3*、*DLX5* 和 *DLX6* 是一组与神经和非神经外胚层相关的转录因子。研究表明, 小鼠晶状体的发育需要 *DLX5* 和 *DLX6* 的共同作用<sup>[11]</sup>。另外, Ogino 等<sup>[5]</sup>发现 *DLX* 基因在斑马鱼和爪蟾的 PPE 中首先表达。本研究结果显示, 在 hESCs 诱导后的第 6 天, *DLX5* 的表达量明显升高, *DLX3* 和 *DLX6* 表达变化相对较弱, 这表明 *DLX5* 在 hESCs 定向分化为 LB 的第一阶段中起重要作用。在诱导第一阶段加入的 Noggin 是骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号通路抑制剂, 这与之之前关于低水平的 BMP 信号可促进 *DLX5* 表达的研究结果一致<sup>[12]</sup>。研究表明, *OTX2* 的表达模式对 PPE 前后部结构的进一步分化发育有重要作用<sup>[13]</sup>, 且其他前基板基因如 *HES1*、*HES4* 和 *EYA1* 都在分化第一阶段显著升高, 这些前基板基因在 PPE 上高度表达, 动物模型中已证实其与晶状体分化区域的形成密切相关<sup>[5]</sup>。因此, hESCs 中加入 Noggin 后 hESCs 的分化可以被认为是 PPE 的发育阶段。

*PAX6* 是哺乳动物晶状体诱导过程中形成 GRN 的关键调节因素<sup>[14-15]</sup>。在晶状体发育的起始阶段, *PAX6* 表达于晶状体、嗅神经和腺垂体的大多数前基板中, 后来表达于 PLE<sup>[16-17]</sup>。本研究结果显示, 第一阶段加入 Noggin 后 *PAX6* 在 mRNA 及其蛋白表达量显著增加。已有研究表明, BMP 与胚胎发育早期 LP 的形成和晶状体纤维细胞分化有关<sup>[18-19]</sup>, *BMP4* 和 *BMP7* 基因的表达异常都会阻碍晶状体的正常发育<sup>[20-21]</sup>。在第二阶段加入 BMP 和 FGF 后, 本研究中检测到 *PAX6* 表达继续增加并贯穿于整个诱导过程中, 同时干细胞标志物 *OCT4* 的表达逐渐降低, 证实了干细胞向晶状体的定向分化, 也与之之前关于 BMP 和 FGF 可协同调节晶状体发育的研究一致<sup>[22]</sup>。*SOX2* 在晶状体胚胎发育过程中有多重作用, 不仅是干细胞自我更新的重要调节因子, 也是晶状体分化过程中 *PAX6* 的转录激活剂<sup>[23-24]</sup>, 还可以调控晶状体蛋白的表达<sup>[25]</sup>。本研究结果显示, *SOX2* 在未分化的 hESCs 中高表达, D6 时继续升高, 随后开始下降, 这与之之前的关于定向分化结束时 *SOX2* mRNA 相对表达量较低的

研究结果一致<sup>[6]</sup>。但本研究中检测到在 hESCs 分化为 LB 时 SOX2 蛋白重新表达,这一现象可能是分化的 LB 像成人眼内的晶状体上皮细胞一样存在干细胞样细胞所致。

成熟晶状体包括上皮细胞和纤维细胞 2 种细胞类型,多种转录因子共同参与这 2 种细胞从晶状体泡前后极分化并形成三维立体结构的过程。分化第三阶段加入的 Wnt 可以促进晶状体的发育和成熟<sup>[26]</sup>。以往关于晶状体分化相关基因的研究发现,敲除 *MAB21L1* 会导致 LP 无法内陷形成 LV<sup>[27]</sup>; *MAF* 基因突变引起白内障的发生<sup>[28]</sup>; *PROX1* 可与 FGF 受体形成环路调控晶状体纤维细胞的分化,其突变会导致晶状体纤维无法形成<sup>[29-30]</sup>, *PITX3* 是维持晶状体上皮细胞特征的关键转录因子<sup>[3]</sup>。本研究发现,在定向分化第三阶段 *MAB21L1*、*PITX3*、*PROX1* 和 *CMAF* 表达显著增加,表明第三阶段的分化过程可能与在体内 LV 的形成和晶状体细胞分化相对应。高通量测序的聚类分析结果也提示,在 hESCs 定向分化第三阶段,晶状体发育相关转录因子表达谱有显著改变,说明第三阶段细胞类型发生了明显转变。另外,有研究表明在白内障、小角膜和虹膜缺损的家族中发现有 *MAF* 基因的突变<sup>[2]</sup>。不同亚型的 *MAF* 基因功能可能由于物种不同而异,如鸡的 *LMAF* 可诱导晶状体纤维分化,小鼠的这个功能是由 *CMAF* 调控的<sup>[31]</sup>。本研究显示培养过程中 *CMAF* 表达量明显升高,提示 *CMAF* 可能是人晶状体发育过程中发挥功能的亚型。

综上所述,本研究揭示了 hESCs 体外定向分化为 LB 过程中晶状体发育相关转录因子表达的动态变化。高通量测序结果表明,体外 3 个分化阶段可能依次对应体内晶状体发育的 PPE、PLE 和 LE 阶段、LV 和晶状体细胞分化阶段,这提示 hESCs 体外定向分化过程很好地模拟了晶状体的体内发育过程,为研究早期人类晶状体发育和转录因子异常相关的先天性晶状体疾病的发病机制研究奠定了基础。然而,如何在体外精确调控转录因子的激活从而获得更加成熟、接近生理状态下的晶状体仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Cvekl A, Ashery-padan R. The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development [J]. *Development*, 2014, 141 (23) : 4432. DOI:10.1242/dev.107953.
- [2] Jamieson RV, Perveen R, Kerr B, et al. Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11 (1) : 33-42.
- [3] Semina EV, Ferrell RE, Mintz-Hittner HA, et al. A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD [J]. *Nat Genet*, 1998, 19 (2) : 167-170. DOI:10.1038/527.
- [4] Reis LM, Tyler RC, Schneider A, et al. FOXE3 plays a significant role in autosomal recessive microphthalmia [J]. *Am J Med Genet A*, 2010, 152 (3) : 582-590. DOI:10.1002/ajmg.a.33257.
- [5] Ogino H, Ochi H, Reza HM, et al. Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm [J]. *Dev Biol*, 2012, 363 (2) : 333-347. DOI:10.1016/j.ydbio.2012.01.006.
- [6] Yang C, Yang Y, Brennan L, et al. Efficient generation of lens progenitor cells and lentoid bodies from human embryonic stem cells in chemically defined conditions [J]. *FASEB J*, 2010, 24 (9) : 3274-3283. DOI:10.1096/fj.10-157255.
- [7] Qiu X, Yang J, Liu T, et al. Efficient generation of lens progenitor cells from cataract patient-specific induced pluripotent stem cells [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7 (3) : e32612 [2018-01-03]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032612>. DOI:10.1371/journal.pone.0032612.
- [8] Fu Q, Qin Z, Jin X, et al. Generation of functional lentoid bodies from human induced pluripotent stem cells derived from urinary cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (1) : 517-527. DOI:10.1167/iovs.16-20504.
- [9] Bassnett S, Costello MJ. The cause and consequence of fiber cell compaction in the vertebrate lens [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 156 : 50-57. DOI:10.1016/j.exer.2016.03.009.
- [10] Ahmad N, Aslam M, Muenster D, et al. Pitx3 directly regulates Foxe3 during early lens development [J]. *Int J Dev Biol*, 2013, 57 (9-10) : 741-751. DOI:10.1387/ijdb.130193jg.
- [11] Robledo RF, Rajan L, Li X, et al. The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development [J]. *Genes Dev*, 2002, 16 (9) : 1089-1101. DOI:10.1101/gad.988402.
- [12] Luo T, Matsuo-Takasaka M, Lim JH, et al. Differential regulation of Dlx gene expression by a BMP morphogenetic gradient [J]. *Int J Dev Biol*, 2001, 45 (4) : 681-684.
- [13] Steventon B, Mayor R, Streit A. Directional cell movements downstream of Gbx2 and Otx2 control the assembly of sensory placodes [J]. *Biol Open*, 2016, 5 (11) : 1620-1624. DOI:10.1242/bio.020966.
- [14] Antosova B, Smolikova J, Klimova L, et al. The gene regulatory network of lens induction is wired through meis-dependent shadow enhancers of Pax6 [J/OL]. *PLoS Genet*, 2016, 12 (12) : e1006441 [2018-01-15]. <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1006441>. DOI:10.1371/journal.pgen.1006441.
- [15] Sun J, Rockowitz S, Xie Q, et al. Identification of *in vivo* DNA-binding mechanisms of Pax6 and reconstruction of Pax6-dependent gene regulatory networks during forebrain and lens development [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (14) : 6827-6846. DOI:10.1093/nar/gkv589.
- [16] Bailey AP, Bhattacharyya S, Bronner-Fraser M, et al. Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity [J]. *Dev Cell*, 2006, 11 (4) : 505-517. DOI:10.1016/j.devcel.2006.08.009.
- [17] Crocett T, Tambalo M, Streit A. The peripheral sensory nervous system in the vertebrate head; a gene regulatory perspective [J]. *Dev Biol*, 2012, 370 (1) : 3-23. DOI:10.1016/j.ydbio.2012.06.028.
- [18] de Jongh RU, Lovicu FJ, Overbeek PA, et al. Requirement for TGFbeta receptor signaling during terminal lens fiber differentiation [J]. *Development*, 2001, 128 (20) : 3995-4010.
- [19] Boswell BA, Overbeek PA, Musil LS. Essential role of BMPs in FGF-induced secondary lens fiber differentiation [J]. *Dev Biol*, 2008, 324 (2) : 202-212. DOI:10.1016/j.ydbio.2008.09.003.
- [20] Huang J, Liu Y, Oltean A, et al. Bmp4 from the optic vesicle specifies murine retina formation [J]. *Dev Biol*, 2015, 402 (1) : 119-126. DOI:10.1016/j.ydbio.2015.03.006.
- [21] Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, et al. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning [J]. *Genes Dev*, 1995, 9 (22) : 2808-2820.
- [22] Boswell BA, Musil LS. Synergistic interaction between the fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein signaling pathways in lens cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26 (13) : 2561-2572. DOI:10.1091/mbc.E15-02-0117.

- [23] Pardo M, Lang B, Yu L, et al. An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease [J]. Cell Stem Cell, 2010, 6 (4) : 382-395. DOI: 10.1016/j.stem.2010.03.004.
- [24] Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, et al. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development [J]. Genes Dev, 2001, 15 (10) : 1272-1286. DOI: 10.1101/gad.887101.
- [25] Inoue M, Kamachi Y, Matsunami H, et al. PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development [J]. Genes Cells, 2007, 12 (9) : 1049-1061. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2007.01114.x.
- [26] Rothe M, Kanwal N, Dietmann P, et al. An Epha4/Sipa1b/Wnt pathway regulates eye development and lens maturation [J]. Development, 2017, 144 (2) : 321-333. DOI: 10.1242/dev.147462.
- [27] Yamada R, Mizutani-Koseki Y, Hasegawa T, et al. Cell-autonomous involvement of Mab21l1 is essential for lens placode development [J]. Development, 2003, 130 (9) : 1759-1770.
- [28] Niceta M, Stellacci E, Gripp KW, et al. Mutations impairing GSK3-mediated MAF phosphorylation cause cataract, deafness, intellectual disability, seizures, and a down syndrome-like facies [J]. Am J Hum Genet, 2015, 96 (5) : 816-825. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.03.001.
- [29] Audette DS, Anand D, So T, et al. Prox1 and fibroblast growth factor receptors form a novel regulatory loop controlling lens fiber differentiation and gene expression [J]. Development, 2016, 143 (2) : 318-328. DOI: 10.1242/dev.127860.
- [30] Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, et al. Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation [J]. Nat Genet, 1999, 21 (3) : 318-322. DOI: 10.1038/6844.
- [31] Kawauchi S, Takahashi S, Nakajima O, et al. Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf [J/OL]. J Biol Chem, 1999, 274 (27) : 19254 [2018-01-01]. <http://citeseerx.ist.psu.edu/showciting?cid=16362900>. DOI: 10.1074/jbc.274.27.19254.

(收稿日期:2018-01-03 修回日期:2018-05-04)

(本文编辑:杜娟)

读者·作者·编者

## 本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿:登陆中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)→点击页面右上角的“注册”→选项注册账号→返回首页→点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中著录的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

## 欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊,月刊,80 面,每月 10 日出版,每期定价 16 元,邮发代号:36-13,国内外公开发行,欢迎到各地邮局或直接与本刊编辑部联系订阅。联系电话:0371-87160872。

(本刊编辑部)

消息

## 《眼内肿瘤:图谱与教程》(第三版)译著出版

由李芸副教授主译、唐罗生教授和魏文斌教授主审的《眼内肿瘤:图谱与教程》(第三版)由人民卫生出版社出版。全书由国际眼肿瘤协会主席、美国 Wills 眼科医院眼肿瘤中心主任 Jerry A Shields 和 Carol L Shields 教授编著,集两位作者 40 年来在眼内肿瘤诊疗领域临床经验之大成,收集和呈现了各种眼内肿瘤详实的病理图片、丰富的经验总结和最新的研究资料,适用于临床医生、研究工作者和医学生阅读,既可作为图文并茂、观点权威的教科书加以精读,又可作为内容全面、编排明晰的工具书进行查阅,对眼内肿瘤的临床诊断和治疗决策有很大的参考价值。全书 25 章,共 572 页,全铜版纸彩印,设计精致,装帧美观。全书定价 398 元。

购书方式:联系人:李芸,电话:0731-85295138。或直接联系人民卫生出版社 人卫智慧服务商城:<http://www.pmphmall.com/>; 人卫社天猫旗舰店:<https://rmws.tmall.com/>。购书电话:010-59787226。

(李芸)

