

体外诱导猪 Müller 细胞定向分化为光感受器细胞的研究

许妮 刘永庆 Douglas C Dean 董方田

100730 北京协和医院眼科 北京协和医学院 中国医学科学院(许妮、董方田);美国 Louisville 大学, Kentucky Lions 狮子眼科中心眼科 & 视觉科学系, Louisville, KY 40202 (刘永庆、Douglas C Dean)

通信作者:董方田, Email: d_fangtian@sina.com

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2016.01.009

【摘要】背景 大鼠、小鼠 Müller 细胞在体外能诱导分化为表达视网膜光感受器细胞特异标记的细胞,但目前有关成年猪 Müller 细胞分化为视网膜光感受器细胞的研究鲜有报道。**目的** 研究成年猪 Müller 细胞于体外定向诱导后分化成视网膜第一级传导神经元光感受器细胞。**方法** 消化成年猪眼视网膜组织,分离 Müller 细胞行体外继代单层贴壁培养。使用定向分化培养基对 P2、P3 和 P4 代 Müller 单层贴壁细胞及先形成细胞球悬浮培养 2~3 d,然后再对贴壁细胞进行诱导分化,最后结合细胞形态和免疫荧光染色结果鉴定 Müller 细胞以及诱导分化效果。**结果** 免疫荧光染色结果显示,P2、P3 和 P4 Müller 细胞均能表达 Müller 细胞特异蛋白分子标记,即谷氨酸合成酶(GS),P3 Müller 细胞还同时表达另一种 Müller 细胞特异蛋白分子标记,神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)。免疫荧光染色分析并计算视网膜光感受器细胞特异标记视紫质 Rhodopsin 阳性率,P2 Müller 单层贴壁分化细胞为(27.99±6.53)%,P2 悬浮细胞球分化为(16.54±3.40)%。P2 悬浮细胞球诱导分化后形态更趋向神经元,而 P2 代 Müller 单层贴壁细胞分化后形态仍趋向于成纤维细胞。随着培养代数的增加,细胞球定向分化 Rhodopsin 阳性表达程度逐渐减弱,P2、P3 和 P4 Rhodopsin 阳性率分别为(56.23±7.32)%、(35.26±8.55)%和(12.68±3.18)%,差异无统计学意义($F=2.618, P=0.099$)。同代细胞随着诱导时间的延长,Rhodopsin 阳性表达有所减弱,差异无统计学意义($P=0.099$),但分化细胞形态更为细长。**结论** 成年猪 Müller 细胞离体培养后可定向分化为表达视网膜光感受器样细胞特异标记的细胞。细胞球悬浮培养 2~3 d,以及延长诱导分化时间都能使得分化细胞形态更为细长。

【关键词】 视网膜; Müller 细胞; 干细胞; 神经球; 细胞分化; 视网膜光感受器; 猪

基金项目: 国家自然科学基金项目(30973256)

Induce and differentiation of pig Müller cells into photoreceptors *in vitro* Xu Ni, Liu Yongqing, Douglas C Dean, Dong Fangtian

Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China (Xu N, Dong FT); Ophthalmology & Visual Sciences Department, Kentucky Lions Eye Center, University of Louisville, Louisville, KY 40206, USA (Liu YQ, Dean DC)

Corresponding author: Dong Fangtian, Email: d_fangtian@sina.com

[Abstract] **Background** Recent studies indicated that rat and mouse Müller cells can be induced and differentiated into photoreceptor-like cells *in vitro*, but it is not known whether this also happens to adult pig Müller cells nowadays. **Objective** This study was to test whether adult pig Müller cells can be differentiated to the retinal photoreceptors (the primary transmission neurons of the retina) *in vitro*. **Methods** Müller cells were isolated from the neural retina of adult pig eyes and cultured and passaged. The 3rd and 4th generation of cells were themonolayerly cultured, and the cells forced to form spheres in suspension in ultra-low adherent dishes for 2-3 days first and then reseeded in normal adherent plates, and both of them were cultured in a specifically formulated medium to induce the differentiation of retinal photoreceptor. The cells was verified by immunocytochemistry. Cell morphology and immunofluorescence staining were utilized to measure the efficacy of the differentiation. **Results** The 2nd, 3rd and 4th generation of Müller cells expressed glutamate synthetase (GS), a specific maker of Müller cells. In addition, the 3rd generation of cells also expressed glial fibrillary acidic protein (GFAP) and another specific maker of Müller

cells. Three visual fields under fluorescence-microscope were randomly chosen to calculate the average positive ratio of rhodopsin, a specific marker of mature photoreceptors. The photoreceptor differentiation ratios of the 2nd generation of cells for monolayer culture only and with additional sphere suspension culture were $(27.99 \pm 6.53) \%$ and $(16.54 \pm 3.40) \%$, respectively. With passages, the number of rhodopsin positive cells gradually decreased, and the intensity of rhodopsin expression gradually weakened. The directed rhodopsin positive ratios of the 2nd, 3rd and 4th generation of cells from sphere formation were $(56.23 \pm 7.32) \%$, $(36.26 \pm 8.55) \%$ and $(12.68 \pm 3.18) \%$, respectively. Although the rhodopsin expression was weakened over passages, the differentiated cells were more slender and elongated. There was no statistically significant difference between different groups ($F = 2.618, P = 0.099$). **Conclusions** Adult pig Müller cells can be differentiated into retinal photoreceptors *in vitro*. The morphology of the differentiated cells appears more slender and elongates if the sphere-induced differentiation method is used and/or the directed differentiation time is further extended.

[Key words] Retina; Müller cells; Stem cells; Neurosphere; Cell differentiation; Photoreceptors; Pig

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30973256)

视网膜 Müller 细胞是人和哺乳动物视网膜中主要的神经胶质细胞,广泛分布于各种神经元细胞之间,参与视网膜各种生理和病理变化过程^[1]。在正常情况下, Müller 细胞无干细胞特性,主要为视网膜神经元提供营养支持,维持细胞外环境的稳定,调节血-视网膜屏障;而在病理情况下, Müller 细胞一方面可介导视网膜神经元损伤的信号传递,另一方面也可保护视网膜神经元,甚至可以去分化而具有一定的干细胞性质,从而部分地替代损伤的视网膜神经元^[2]。研究表明, Müller 细胞具有干细胞特性,可以分化为不同类型的视网膜神经细胞,提示其可以成为神经元再生的潜在来源,因而利用 Müller 细胞进行细胞移植是治疗视网膜变性相关疾病极具潜力的新策略^[3]。目前 Müller 细胞干细胞特性相关的基础研究多集中于啮齿类动物,但啮齿类动物视网膜的解剖结构与人类有区别,研究结果在灵长类动物上难以重复。猪眼解剖结构与人类十分接近,且 Ross 等^[4]于 2012 年通过转基因技术生成了模拟人原发性视网膜色素上皮变性 (retinitis pigmentosa, RP) 模型猪,因此有关猪视网膜研究结果对临床试验具有更重要的借鉴意义。本研究中拟对成年猪眼视网膜 Müller 细胞进行体外分离和培养,并研究其定向诱导分化成视网膜光感受器细胞的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源 新鲜成年猪眼取自北京屠宰厂,冰冻条件下运送至实验室。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基(美国 CORNING 公司);体积分数 10% 胎牛血清(美国 Thermo 公司);质量分数 1% 青链霉素(P/S)、50 倍 B27 Supplement、100 倍 N2 Supplement(美国 Gibco 公司);小鼠 Noggi、Dkk-1 (dickkopf homolog 1)、人胰岛素样生长因子 1 (human

insulin-like growth factor-1, hIGF-1)(美国 R&D 公司);碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(美国 PeproTech 公司);视磺酸、牛磺酸、小鼠抗猪胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)单克隆一抗(#G3893, 1:500, 美国 Sigma 公司);兔抗大鼠谷氨酰胺合成酶多克隆一抗(#ab49873, 1:500, 美国 Abcam 公司);小鼠抗大鼠 Nestin 抗体(#611658, 1:200, 美国 BD 公司);小鼠抗大鼠 β -III-tubulin 单克隆一抗(#MAB5564, 1:500)、兔抗鼠 Pax6 多克隆一抗(#AB2237, 1:400)、兔抗人 Recoverin 多克隆一抗(#AB5585, 1:500)、小鼠抗牛 Rhodopsin 单克隆一抗(#MAB5356, 1:500)(美国 Millipore 公司);抗 NRL 多克隆一抗(#5405, 1:500, 美国 PrimmBiotech 公司);山羊抗小鼠 Alexa Fluor[®] 568 IgG 二抗(H+L)(#A11004, 1:1 000)、山羊抗兔 Alexa Fluor[®] 568 IgG(H+L)(#A11011, 1:1 000)、山羊抗小鼠 Alexa Fluor[®] 488 IgG(H+L)(#A11017, 1:1 000)(美国 Invitrogen 公司);Worthington 木瓜蛋白酶分离试剂盒(美国 Worthington 生物化学公司)。

1.2 方法

1.2.1 猪 Müller 细胞分离及培养 去除猪眼眼球周围结缔组织,置于含有青链霉素及质量分数 0.1% 庆大霉素的 PBS 中浸泡 10 min。在无菌操作台内沿睫状体平坦部切开,去除角膜和晶状体等前节部分,分离神经视网膜组织至视神经处,将其剪断。将神经视网膜组织置于青链霉素及 0.1% 庆大霉素的 PBS 中漂洗 2 遍,然后切碎并用 Worthington 木瓜蛋白酶分离试剂盒进行消化,收集细胞悬液及少量组织碎片,置于含胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基中培养 12~14 d,培养皿用 0.1% gelatin 包被。每 2~3 天换液 1 次,每 5~7 天传代 1 次,传代比例为 1:5~1:7,取 2~4 代细胞重新接种于 0.1% gelatin 包被的 8 孔板中,待细胞

融合约 80% 时进行固定,用免疫荧光染色法对培养的细胞进行鉴定。

1.2.2 成年猪 Müller 细胞的成球悬浮培养 2~4 代 Müller 细胞在 100 mm 培养皿中培养,细胞单层生长汇合至 95% 及以上时进行成球悬浮培养。去除含胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基, PBS 漂洗 2 次,加入 1 ml 悬浮培养基(含胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基)。准备 60 mm×15 mm 的低贴敷培养皿,加入 1 ml 相同的悬浮培养基。将单层生长的细胞刮下后反复吹打 10~20 次,加入贴敷培养皿中,置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 2~3 d。

1.2.3 成年猪 Müller 细胞的诱导分化过程 用多聚-D-赖氨酸(15 μl 溶于 1.6 ml PBS 中,37 °C,30 min 后去除多聚-D-赖氨酸和 PBS 的混合液, PBS 漂洗 3 次)及 Matrigel(1:160 溶于 PBS 中,37 °C,30 min 后去除)。将第 2~4 代的成年猪 Müller 单层细胞及经过成球悬浮 2~3 d 后的细胞球重新接种于包被完毕的 8 孔板中,加入诱导分化培养基(含 50 倍的 B27 Supplement、100 倍的 N2 Supplement、100 μg/ml 的小鼠 Noggin、100 μg/ml 的 Dkk-1、100 μg/ml 的 IGF-1、10 μg/ml 的 bFGF、10 mmol/L 的视磺酸、50 mmol/L 的牛磺酸和 1% 青链霉素的 DMEM-F12 培养基)置入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,分别进行定向诱导分化培养 18、(18+6)和 42 d,用质量分数 4% 多聚甲醛固定并行免疫荧光染色法鉴定。定向诱导分化期间,每 2~3 天半量换液 1 次,其中 18 d 和 42 d 诱导分化方案为连续使用诱导分化培养基,而 24 d 诱导分化方案为前 18 d 连续使用诱导分化培养基,后 6 d 使用在诱导分化培养基的基础上添加 1% 胎牛血清。

1.2.4 免疫荧光染色法鉴定细胞 将成年猪 Müller 单层贴壁细胞以及单层贴壁和成球悬浮培养 2~3 d 后的细胞球行定向诱导分化后,用免疫荧光染色法行细胞鉴定。吸出培养板内培养基,加入质量分数 4% 多聚甲醛,常温下静置 15 min; PBS 漂洗 3 次,加入含质量分数 4% 山羊或兔血清、质量分数 5% 牛血清白蛋白的 0.1% Tween-20 封闭液,常温下封闭 1 h;用此封闭液稀释一抗后滴加相应一抗,于 4 °C 冰箱孵育过夜;0.05% Tween-20 PBS 漂洗 1 次, PBS 溶液漂洗 2 次; PBS 稀释二抗并滴加相应二抗,常温下孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, ddH₂O 漂洗 1 次,用 AQUA-MOUNT 封闭液封片。激光扫描共焦显微镜下观察细胞中 Müller 细胞特异蛋白分子标志物谷氨酸合成酶(GS)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达,并计算任意 3 个视野中阳性细胞数与总细胞数

比例。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件对测量指标的数据资料进行分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表达。采用均衡分组单因素干预多水平实验设计,组间培养细胞中表达阳性率的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养的猪眼视网膜 Müller 细胞的形态学表现

成年猪原代 Müller 细胞呈多角形、星形或梭形,细胞质丰富,细胞膜清晰,细胞核呈椭圆形,多位于细胞中央;培养 7~10 d 后,贴壁单层细胞长满培养皿,成镶嵌样紧密排列。传代培养的 Müller 细胞分裂增生速度减慢,直至完全停止, Müller 细胞形态明显平坦,细胞扩张变大,细胞间连接减少,细胞核大而暗,呈现细胞衰老特征(图 1)。免疫荧光染色显示,第 2~4 代 Müller 细胞均能表达 GS,且第 3 代 Müller 细胞还同时表达 GFAP(图 2)。

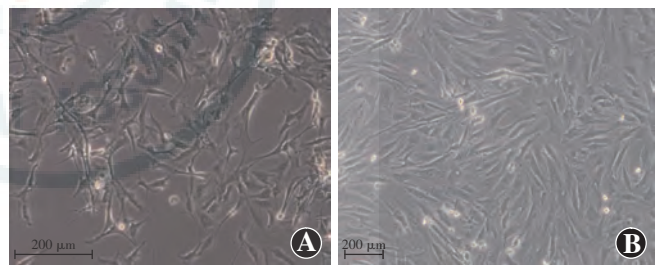


图 1 光学显微镜下观察体外培养的猪眼视网膜 Müller 细胞(标尺=200 μm) A: 原代培养 7~10 d 的猪视网膜 Müller 细胞呈多角形或梭形,细胞质丰富,细胞中央的细胞核呈椭圆形 B: 传至第 1 代的细胞形态与原代细胞基本一致 C: 第 11 代细胞体积变大,形态平坦,细胞间连接减少

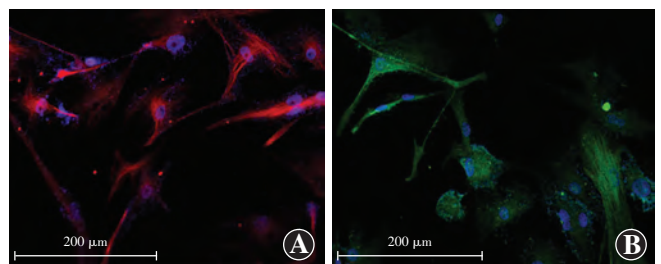


图 2 体外培养的猪 Müller 细胞免疫荧光染色鉴定(标尺=200 μm) A: 培养的细胞 GS 标记阳性,细胞质内显示红色荧光 B: 培养的细胞 GFAP 标记阳性,细胞质内显示绿色荧光

2.2 成年猪 Müller 细胞单层贴壁培养定向分化

培养的细胞中对神经祖细胞特异蛋白分子标志物 Pax6, 神经细胞特异蛋白分子标记 β -III-tubulin 及视网膜光感受器特异蛋白分子标记 Rhodopsin 阳性(图 3)。第 2 代单层贴壁细胞定向诱导分化的阳性率平均为 $(27.99 \pm 6.53)\%$, 而其成球悬浮培养 2~3 d 后的定向诱导分化阳性率平均为 $(16.54 \pm 3.40)\%$, 2 种培养细胞对 Rhodopsin 的阳性均表达均较强, 第 2 代细胞球悬浮培养 2~3 d 诱导分化后形态更趋向于神经元, 而第 2 代单层贴壁细胞诱导分化后形态仍趋向于成纤维细胞。

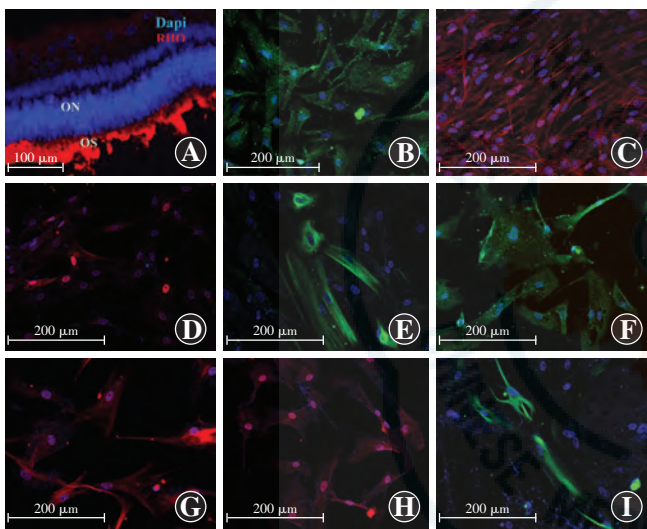


图 3 荧光相差显微镜下观察体外培养的成年猪 Müller 细胞诱导分化 DAPI 显示蓝染的细胞核, RHO 显示红色的细胞质, 绿色荧光显示相应抗体阳性表达的细胞蛋白标志物 A: Rhodopsin 标记阳性的野生型猪视网膜切片 ON(蓝色)代表视网膜外核层, OS(红色)代表视网膜外节层, DAPI 显示外核层细胞核的蓝色荧光, RHO 显示外节的 Rhodopsin 标记阳性(标尺=100 μ m) B: 猪 Müller 细胞单层诱导分化培养(18+6)d β -III-tubulin 标记阳性, 细胞质内显示绿色荧光(标尺=200 μ m) C: 猪 Müller 细胞单层诱导分化培养(18+6)d(标尺=200 μ m) GS 标记阳性, 细胞质内显示红色荧光 D: 猪 Müller 细胞单层诱导分化培养(18+6)d Pax6 标记阳性, 细胞核内显示红色荧光(标尺=200 μ m) E: 猪 Müller 细胞单层诱导分化培养(18+6)d Rhodopsin 标记阳性, 细胞质内显示红色荧光(标尺=200 μ m) F: 猪 Müller 细胞成球悬浮培养 2~3 d 后诱导分化培养(18+6)d β -III-tubulin 标记阳性, 细胞质内显示绿色荧光(标尺=200 μ m) G: 猪 Müller 细胞成球悬浮培养 2~3 d 后诱导分化培养(18+6)d(标尺=200 μ m) GS 标记阳性, 细胞质内显示红色荧光 H: 猪 Müller 细胞成球悬浮培养 2~3 d 后诱导分化培养(18+6)d, Pax6 标记阳性, 细胞核内显示红色荧光(标尺=200 μ m) I: 猪 Müller 细胞成球悬浮培养 2~3 d 后诱导分化培养(18+6)d, Rhodopsin 标记阳性, 细胞质内显示红色荧光(标尺=200 μ m)

2.3 猪 Müller 细胞成球悬浮培养定向分化后的形态及鉴定

2.3.1 定向分化 18 d 的细胞形态及鉴定 性质稳定且活力良好的第 2~4 代猪 Müller 细胞经过 2~3 d 悬浮培养的细胞球进行 18 d 和 42 d 的定向诱导分化培

养。培养 18 d 后, 细胞形态似成纤维细胞; 培养 42 d 后, 细胞形态似神经元细胞(图 4)。免疫荧光技术检测表明, 仅在第 2 代细胞中可见神经细胞特异蛋白分子标志物 β -III-tubulin 以及 Nestin 的阳性表达, 而神经祖细胞特异蛋白分子标志物 Pax6 仅在第 2 代细胞中表达, Müller 细胞特异蛋白分子标志物 GS、视网膜光感受器特异蛋白分子标志物 NRL、Recoverin 和 Rhodopsin 在第 2~4 代细胞中均有阳性表达。但随着传代代数的增加, GS、NRL 和 Rhodopsin 的表达强度逐渐减弱。免疫荧光观察结果显示 Rhodopsin 在定向诱导分化 18 d 时(18+6)d 时减弱(图 5)。

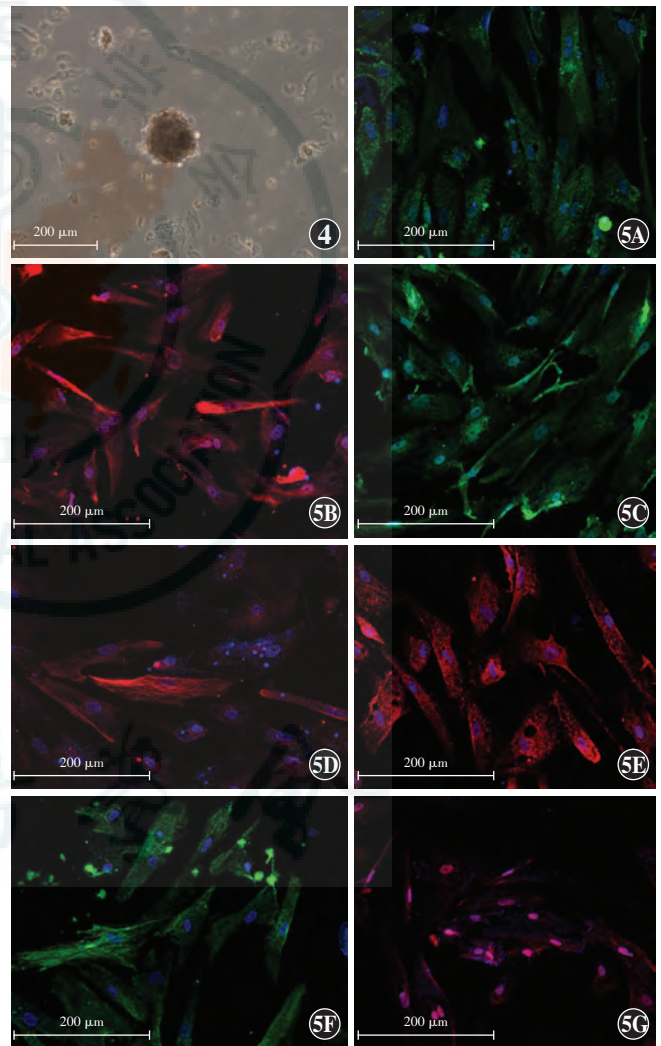


图 4 光学显微镜下猪视网膜 Müller 细胞成球悬浮培养形态(标尺=200 μ m) 第 2 代悬浮 2~3 d 成球培养后细胞呈细胞团簇状
图 5 细胞球诱导分化 18 d 荧光相差显微镜下体外培养的成年猪 Müller 细胞的鉴定(标尺=200 μ m) A: 多数细胞 β -III-tubulin 反应阳性, 细胞质内呈绿色荧光 B: 细胞 GS 反应阳性, 细胞质内呈红色荧光 C: Nestin 在细胞中呈阳性表达, 细胞质内显示绿色荧光 D: 细胞中 NRL 表达阳性, 细胞质内显示红色荧光 E: 细胞中 Recoverin 表达阳性, 细胞质内显示红色荧光 F: 细胞中 Rhodopsin 表达阳性, 细胞质内显示绿色荧光 G: 细胞中 Pax6 表达阳性, 细胞核内显示红色荧光

2.3.2 定向分化 42 d 的细胞形态及鉴定 定向诱导分化 42 d 时, β -III-tubulin 仅在第 2 和 3 代细胞中表达, GS、Recoverin 和 Rhodopsin 在第 2~4 代细胞中均呈阳性表达, 但 Rhodopsin 的表达阳性率明显低于诱导分化 18 d。与诱导分化 18 d 的细胞比较, 诱导分化 42 d 后细胞体更显得细长(图 6)。

2.3.3 定向分化不同时间细胞中 Rhodopsin 表达阳性率的比较 不同传代代数细胞悬浮培养 2~3 d 形成细胞球后定向诱导分化不同时间细胞的 Rhodopsin 阳性率明显不同, 差异无统计学意义 ($F = 2.618, P = 0.099$), 其中第 2~3 代细胞定向诱导分化 18 d 的 Rhodopsin 阳性率明显高于单层细胞定向分化 24 d、第 2 代悬浮球细胞定向分化 24 d 和及第 4 代悬浮球

细胞定向分化 18 d, 但差异无统计学意义(均 $P = 0.099$)(表 1)。

表 1 不同代数 Müller 细胞在不同分化方式及分化时间的 Rhodopsin 阳性率($\bar{x} \pm s$)

细胞初代代数	分化方式	分化时间(d)	Rhodopsin 阳性率(%)
2	单层细胞	24	27.99±6.53 ^{ab}
2	悬浮细胞球	24	16.54±3.40 ^{ab}
2	悬浮细胞球	18	56.23±7.32
3	悬浮细胞球	18	35.26±8.55
4	悬浮细胞球	18	12.68±3.18 ^{ab}
F			2.618
P			0.099

注:与第 2 代悬浮细胞球定向分化 18 d 比较, ^a $P > 0.05$;与第 3 代悬浮细胞球定向分化 18 d 比较, ^b $P > 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

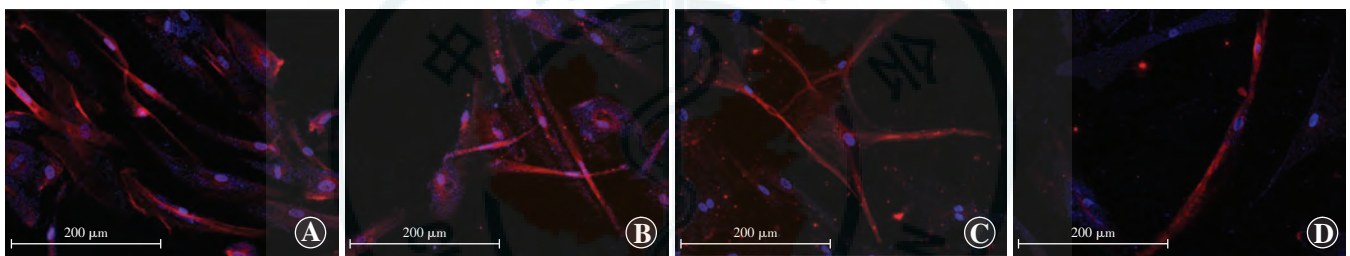


图 6 荧光相差显微镜下观察体外培养的猪视网膜 Müller 细胞(标尺=200 μ m) 悬浮成球培养 2~3 d 后, 诱导分化 42 d 图像免疫荧光染色, 红色为 GS、Recoverin、 β -III-tubulin 和 Rhodopsin 染色 A: 细胞成球后诱导分化培养 42 d 细胞 GS 标记阳性, 细胞质内显示红色荧光 B: 细胞 Recoverin 标记阳性, 细胞质内显示红色荧光 C: 细胞 β -III-tubulin 标记阳性, 细胞质内显示红色荧光 D: 细胞 Rhodopsin 标记阳性, 细胞质内显示红色荧光

3 讨论

遗传性视网膜变性相关疾病可导致不可逆性盲, 尽管其病因不同, 但病理过程和结局相同, 即光感受器细胞逐渐丢失, 导致视功能障碍, 甚至致盲。细胞替代治疗可以为视网膜提供种子细胞, 是目前较有前景的研究方向。光感受器细胞丢失引起的视觉缺损是永久性的, 置换变性退化的光感受器细胞并与受体视网膜进行整合后有望重获视力。近年来相继发表了关于视网膜光感受器细胞的细胞替代治疗研究报告, 虽然尚未涉及临床治疗领域, 但是相关的动物实验研究已经证实种子细胞可部分整合进入宿主视网膜, 且表现出一定的感光功能^[5-12]。干细胞具有多方向分化潜能, 能够终生自我更新及在特定条件下定向分化成各种细胞, 因而成为近年来的热点。关于胚胎干细胞、诱导多潜能干细胞、部分成体干细胞及类似干细胞的前体细胞等向视网膜光感受器细胞定向分化以及移植已有相继报道^[8-19], 如果能利用视网膜来源的干细胞定向诱导分化形成视网膜光感受器细胞, 既能避免干细胞的成瘤性及伦理争议问题, 也能避免免疫排斥问题。已有研究表明来源于鼠类视网膜的 Müller 细胞具有干

细胞特性, 有分化为不同的视网膜神经细胞的潜能^[3,5-7]。

我们前期的研究中对成年猪 Müller 细胞进行分离和培养, 发现培养的细胞在形态上具有 Müller 细胞的特征, 且绝大多数细胞可以表达 Müller 细胞的特异蛋白分子 GS 和 GFAP, 本研究中我们使用成球悬浮培养 2~3 d 的方法^[20]进一步培养成年猪视网膜 Müller 细胞并进一步对细胞球进行定向诱导分化。

关于 Müller 细胞与视网膜光感受器定向诱导分化的研究表明, Müller 细胞在与视网膜神经祖细胞共培养时, 视网膜神经祖细胞在连续传代后仍能保持分裂增生的潜能, 维持干细胞特性, 并能够诱导 Müller 细胞向视网膜光感受器细胞定向分化^[5], 关于小鼠以及人类 Müller 细胞定向诱导分化成视网膜光感受器细胞的研究也表明其有视网膜光感受器细胞特异性标志物 Recoverin 的阳性表达^[6-7], 与本研究结果一致。此外, 我们对成年猪 Müller 细胞的定向诱导分化过程中还出现了另一种更为成熟的视网膜光感受器细胞特异性标志物 Rhodopsin 的阳性表达, 且 Müller 细胞本身也发生了近似神经元形态上的改变。

我们在实验中发现成年猪 Müller 细胞能向视网

膜光感受器细胞定向分化,因此进一步以不同代数的成年猪 Müller 细胞分化前状态以及定向诱导分化的时间来评估视网膜光感受器的定向诱导分化效率,其中以 Rhodopsin 阳性表达强度以及百分率来评估不同的分化前状态以及定向诱导分化时间对视网膜光感受器细胞形成的影响。本研究中对第 2 代猪眼视网膜 Müller 细胞单层以及成球悬浮培养 2~3 d 后再进行定向诱导分化培养 24 d,发现 Rhodopsin 均于细胞质内均表达较强,但阳性的百分率并不高。随后对第 2~4 代悬浮培养 2~3 d 的细胞球分别行 18 d 和 42 d 的定向诱导分化,发现随着培养代数的增加,悬浮培养 2~3 d 的细胞球定向诱导分化后 Rhodopsin 在细胞质内的表达强度逐渐减弱,但是阳性百分率较高,并且 Rhodopsin 阳性表达强度以及分布百分率并未随着定向诱导分化培养时间的延长而增加,而是相对减弱的,此外随着定向诱导分化时间延长,细胞体的形态更为细长。

综上所述,体外分离和培养的成年猪 Müller 细胞传第 2 代后进行定向诱导分化可获得一定数量的 Rhodopsin 阳性细胞,表明成年猪 Müller 细胞在一定培养条件下可向视网膜光感受器方向分化。使用悬浮成球培养 2~3 d 后继续定向诱导分化,表达 Rhodopsin 的分化细胞数量稍有减少,但形态更趋向于神经元,延长定向诱导分化时间,分化细胞形态更为细长,故 Müller 细胞向视网膜光感受器的定向分化过程分为 2 个阶段,即分化的细胞首先表达 Rhodopsin,随后虽 Rhodopsin 阳性表达的百分率逐渐减弱,但组间差异无统计学意义,但分化细胞胞体更为细长,我们进一步的研究方向是探讨如何提高成年猪 Müller 细胞的去分化能力。

参考文献

- [1] Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25(4): 397-424. DOI:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.
- [2] Fischer AJ, Reh TA. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina[J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(3): 247-252. DOI:10.1038/85090.
- [3] 曾琦, 夏晓波. 体外诱导大鼠视网膜 Müller 细胞向神经节细胞定向分化的研究[J]. *中华眼科杂志*, 2010, 46(7): 615-620. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.07.008.
Zeng Q, Xia XB. Study on the differentiation of retinal ganglion cells from rat Müller cells in vitro[J]. *Chin J Ophthalmology*, 2010, 46(7): 615-620. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.07.008.
- [4] Ross JW, Fernandez de Castro JP, Zhao J, et al. Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(1): 501-517. DOI:10.1167/iovs.11-8784.
- [5] Simon MV, De Genaro P, Abraham CE, et al. Müller glial cells induce stem cell properties in retinal progenitors in vitro and promote their further differentiation into photoreceptors[J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90(2): 407-421. DOI:10.1002/jnr.22747.
- [6] Giannelli SG, Demontis GC, Pertile G, et al. Adult human Müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(2): 344-356. DOI:10.1002/stem.579.
- [7] Jayaram H, Jones MF, Eastlake K, et al. Transplantation of photoreceptors derived from human Müller glia restore rod function in the P23H rat[J]. *Stem Cell Trans Med*, 2014, 3(3): 323-333. DOI:10.5966/sctm.2013-0112.
- [8] Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 73-79. DOI:10.1016/j.stem.2008.10.015.
- [9] West EL, Gonzalez-Cordero A, Hippert C, et al. Defining the integration capacity of embryonic stem cell-derived photoreceptor precursors[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(7): 1424-1435. DOI:10.1002/stem.1123.
- [10] Zhou L, Wang W, Liu Y, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(6): 972-980. DOI:10.1002/stem.637.
- [11] Lamba DA, McUsic A, Hirata RK, et al. Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells[J/OL]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8763 [2015-11-04]. <http://journals.plos.org/plosone/article?doi=10.1371/journal.pone.0008763>. DOI:10.1371/journal.pone.0008763.
- [12] Tucker BA, Park IH, Qi SD, et al. Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptors precursors restore retinal structure and function in degenerative mice[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(4): E18992 [2015-11-04]. <http://journals.plos.org/plosone/article?doi=10.1371/journal.pone.0018992>. DOI:10.1371/journal.pone.0018992.
- [13] Osakada F, Ikeada H, Mandai M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(2): 215-224. DOI:10.1038/nbt1384.
- [14] Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 771-785. DOI:10.1016/j.stem.2012.05.009.
- [15] Banin E, Obolensky A, Idelson M, et al. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells[J]. *Stem Cell*, 2006, 24(2): 246-257. DOI:10.1634/stemcells.2005-0009.
- [16] Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, et al. Photoreceptor precursors derived from three-dimension embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 741-747. DOI:10.1038/nbt.2643.
- [17] Mellough CB, Sernagor E, Moreno-Gimeno I, et al. Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(4): 673-686. DOI:10.1002/stem.1037.
- [18] Zhou S, Flamier A, Abdouh M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into cone photoreceptors through simultaneous inhibition of BMP, TGF β and Wnt signaling[J]. *Development*, 2015, 142(19): 3294-306. DOI:10.1242/dev.125385.
- [19] Angbohang A, Wu N, Charalambous T, et al. Downregulation of the canonical WNT signaling pathway by TGF β 1 inhibits photoreceptor differentiation of adult human Müller glia with stem cell characteristics[J/OL]. *Stem Cells Dev*, 2015, 12 [2015-09-12]. <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2015.0262>. DOI:10.1089/scd.2015.0262.
- [20] Liu Y, Mukhopadhyay P, Pisano MM, et al. Repression of Zeb1 and hypoxia cause sequential mesenchymal-to-epithelial and induction of aid, Oct4, and Dnmt1, leading to immortalization and multipotential reprogramming of fibroblasts in spheres[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(7): 1350-1362. DOI:10.1002/stem.1382.

(收稿日期:2015-11-05)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)