

· 实验研究 ·

压力诱导兔视网膜干细胞向视网膜神经节细胞分化研究

戴敏¹ 亢泽峰² 胡竹林¹ 李妍¹

¹云南大学附属医院眼科 云南省眼科医院 云南省眼科研究所 云南省眼科疾病防治研究重点实验室 云南省第二人民医院白内障与眼底疾病防治省创新团队 云南省姚克专家工作站 云南省眼部疾病临床医学研究中心 云南省眼科疾病临床医学中心,昆明 650021;²中国中医科学院眼科医院,北京 100040

通信作者:亢泽峰,Email:zefeng2531@163.com

【摘要】 目的 探讨压力对兔视网膜神经节细胞(RGCs)共培养的视网膜干细胞(RSCs)分化的影响。**方法** 选取 SPF 级新西兰孕 22 d 兔,取出胚胎,获取视网膜睫状色素上皮组织,培养原代 RSCs。选取 SPF 级新生新西兰大白兔 6 只,分离视网膜神经上皮层组织,培养原代 RGCs。采用巢蛋白(Nestin)抗体免疫荧光染色法、溴脱氧核苷尿嘧啶(BrdU)流式细胞术分析、RSCs 自发分化细胞免疫荧光检测及流式细胞术分析鉴定体外培养的兔 RSCs,采用免疫荧光染色法以 Brn3b 抗体及 Thy1.1 抗体鉴定 RGCs;将 RGCs 和 RSCs 分别放在 Transwell 的上下层培养,构建共培养体系。分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测 0、20、40、60、80 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)压力条件下 RSCs 及分化所得细胞的 Nestin 和 Thy1.1 mRNA 和蛋白表达变化。**结果** 体外培养的兔 RSCs 特异性标志物 Nestin 抗体染色阳性;BrdU 流式细胞术分析结果显示,BrdU 阳性细胞占分离 RSCs 细胞的(92.26±3.28)%;免疫荧光检测结果显示,RSCs 分化细胞中,部分细胞 Brn3b 抗体表达阳性,部分细胞 GS 抗体表达阳性。流式细胞术双色分析结果显示,Brn3b 和 GS 阳性细胞率分别为(13.00±3.06)%和(31.60±3.67)%。免疫荧光染色结果显示,体外培养的兔 RGCs Brn3b 抗体及 Thy1.1 抗体染色阳性。不同压力条件下 RSCs 及分化所得细胞的 Nestin、Thy1.1 mRNA 和蛋白相对表达量比较差异均有统计学意义(mRNA: $F=127.600,137.400$,均 $P<0.01$;蛋白: $F=82.480,158.700$,均 $P<0.001$),其中与 0 mmHg 相比,20、40、60、80 mmHg 条件下,Nestin mRNA 及蛋白相对表达量降低,Thy1.1 mRNA 及蛋白相对表达量增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。40 mmHg 时,Nestin mRNA 和蛋白相对表达量最低,Thy1.1 mRNA 和蛋白相对表达量最高。**结论** 在一定范围内,压力能够促进与 RGCs 共培养的 RSCs 分化成视网膜神经节样细胞,压力过大会抑制 RSCs 的分化。

【关键词】 视网膜;干细胞;视网膜神经节细胞;压力;细胞分化;青光眼

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660160);云南省自然科学基金项目(2017FB124);云南省卫生健康委员会医学后备人才培养计划项目(H-2018023);云南省高层次人才支持计划-青年拔尖人才专项项目(YNWR-QNBJ-2020-237);云南省眼科疾病防治研究重点实验室项目(2017DG008);院士和领军人才培养项目(2017HC010);北京市石景山区亢泽峰名医传承工作室项目;中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者项目

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200519-00361

Pressure-induced differentiation of rabbit retinal stem cells into retinal ganglion cells

Dai Min¹, Kang Zefeng², Hu Zhulin¹, Li Yan¹

¹Department of Ophthalmology, Yunnan University Affiliated Hospital, Yunnan Eye Hospital, Yunnan Eye Institute, Key Laboratory of Yunnan Province for the Prevention and Treatment of Ophthalmology, Provincial Innovation Team for Cataract and Ocular Fundus Disease, The Second People's Hospital of Yunnan Province, Expert Workstation of Yao Ke, Eye Disease Clinical Medical Research Center of Yunnan Province, Eye Disease Clinical Medical Center of Yunnan Province, Kunming 650021, China; ²Eye Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100040, China

Corresponding author: Kang Zefeng, Email: zefeng2531@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of pressure on the differentiation of rabbit retinal stem cells (RSCs) co-cultured with retinal ganglion cells (RGCs). **Methods** SPF grade New Zealand rabbits on the day 22 of gestation were selected, and embryos were removed to obtain retinal ciliary margin pigment epithelial tissue and culture primary RSCs. Six SPF grade newborn New Zealand rabbits were selected, and retinal neuroepithelial layer tissues were isolated to culture primary RGCs. Rabbit RSCs cultured *in vitro* were identified by immunofluorescence staining of nestin antibody, bromodeoxyuridine (BrdU) cell proliferation assay kit, RSCs spontaneously differentiated cells immunofluorescence detection and flow cytometry. RGCs were identified through immunofluorescence staining of Brn3b antibody and Thy1.1 antibody. A co-culture system of RGCs and RSCs cultured in the upper and lower layers of a transwell plate respectively was constructed. The mRNA and protein expression levels of nestin and Thy1.1 in RSCs and differentiated cells under pressures of 0, 20, 40, 60, 80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. The feeding and use of laboratory animals were in accordance with the Regulations on the Administration of Laboratory Animals promulgated by the State Science and Technology Commission. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Yunnan University Affiliated Hospital (No. KPRC-IACUC17008). **Results** RSCs cultured *in vitro* were nestin-positive. The percentage of BrdU-positive isolated RSCs was $(92.26 \pm 3.28)\%$. Some cells differentiated from RSCs were Brn3b-positive, accounting for $(13.00 \pm 3.06)\%$, and some were GS-positive, accounting for $(31.60 \pm 3.67)\%$. RGCs cultured *in vitro* were Brn3b- and Thy1.1-positive. There were statistically significant differences in the relative mRNA and protein expressions of nestin and Thy1.1 between RSCs and differentiated cells under different pressures (mRNA: $F = 127.600, 137.400$; both at $P < 0.01$; protein: $F = 82.480, 158.700$; both at $P < 0.001$). The relative mRNA and protein expressions of nestin were significantly reduced in RSCs, and relative mRNA and protein expressions of Thy1.1 were significantly increased in differentiated cells at 20, 40, 60 and 80 mmHg in comparison with 0 mmHg (all at $P < 0.05$). When the pressure was 40 mmHg, the relative mRNA and protein expressions of nestin were lowest in RSCs, and the relative mRNA and protein expressions of Thy1.1 in differentiated cells were highest. **Conclusions** Within a certain range, pressure can promote the differentiation of RSCs co-cultured with RGCs into ganglion-like cells, and excessive pressure can inhibit the differentiation of RSCs.

[Key words] Retina; Stem cells; Retinal ganglion cells; Pressure; Cell differentiation; Glaucoma

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81660160); Natural Science Foundation Project of Yunnan Province (2017FB124); Health and Wellness Committee Medical Reserve Talents Training Program of Yunnan Province (H-2018023); Yunnan Province High-Level Talent Training Support Program-The Young Talent Project (YNWR-QNBJ-2020-237); Key Laboratory of Yunnan Province for the Prevention and Treatment of Ophthalmology (2017DG008); Academician and Leading Talent Training Program (2017HC010); Academician Expert Workstation Project (2017IC064); Construction Program for Inheritance Office of KANG Zefeng, Famous TCM Experts of Shijingshan District in Beijing; Talent Project for Heritage and Innovation of Traditional Chinese Medicine (Qihuang Project) Qihuang Scholar

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200519-00361

青光眼是世界上主要的致盲眼病,可导致视盘凹陷性萎缩和视野缺损,研究表明病理性眼压升高是其主要危险因素^[1]。青光眼可引起视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 凋亡,导致视功能不可逆损害。RGCs 的病理改变和凋亡机制在青光眼的发病过程中发挥着重要作用, RGCs 的丢失率可以更好地评估青光眼进展^[2]。如果能够找到有效的方法保护 RGCs 或促进其再生,对于青光眼的治疗具有重要意义。既往认为,成年哺乳动物视网膜损伤后无再生和修复能力。近来研究发现,成年哺乳动物眼中存在未分化的视网膜干细胞 (retinal stem cells, RSCs)。Ahmad 等^[3]首先从成年 E17 大鼠的视网膜中分离出

RSCs,其显示出许多神经干细胞的特征:(1)可以增生,并表达神经外胚层标志物巢蛋白 (Nestin) 及视网膜细胞胚胎发育阶段的特异性标志物 Chx-10;(2)具有多能性;(3)可以自我更新^[3-5]。这些干细胞可以在一定条件下被激活和分化,修复受损的视网膜神经元^[6]。然而,RSCs 的定向诱导分化机制十分复杂,主要受细胞外微环境因素和内在细胞因子的共同调控。本课题组既往研究发现,SD 大鼠 RGCs 的条件培养基增加了大鼠 RSCs 向视网膜神经节样细胞的分化,并且在一定压力范围内分化程度随着周围压力的升高而增加^[7]。为了进一步揭示压力对与 RGCs 共培养的 RSCs 分化的影响,本研究拟探讨在压力升高的情况

下, RSCs 与 RGCs 共培养是否能够促进 RSCs 分化为神经节样细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 SPF 级新生新西兰大白兔及孕 22 d 兔 6~8 只[昆明医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(滇)K2015-0002]。实验动物的饲养和使用符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。本研究经云南大学附属医院实验动物伦理委员会审核批准(批文号: KPRC-IACUC17008)。

1.1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM/F12(含 B27、N2、肝素、谷氨酰胺)、质量分数 0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 上皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(美国 Sigma 公司); 免疫荧光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 溴脱氧核苷尿嘧啶(bromodeoxyuridine, BrdU)细胞增生检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司); RNA 提取试剂盒、RT-qPCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司); Transwell 培养皿(美国 Corning 公司); 小鼠抗 Nestin 抗体(sc-23927)、小鼠抗 Brn3b 抗体(sc-514474)、小鼠抗 Thy1.1 抗体(sc-19614)、小鼠抗 GS 抗体(sc-74430)、小鼠抗 GAPDH 抗体(sc-47724)(美国 Santa Cruz 公司); iFluor 488 标记羊抗小鼠二抗(16735, 美国 AAT Bioquest 公司); 羊抗小鼠二抗(ab6789, 英国 Abcam 公司)。解剖显微镜(S9)、荧光显微镜(Mica, 德国 Leica 公司); 离心机(LC-LX-HLR250D, 上海力辰仪器科技有限公司); 血压计(江苏鱼跃医疗设备及用品有限公司); CO₂ 培养箱、PCR 仪(Step One Plus)(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔 RSCs 和 RGCs 的培养及鉴定

1.2.1.1 兔 RSCs 的培养 取孕龄 22 d 新西兰大白兔, 耳缘静脉注入空气处死, 取出胚胎 6~8 只。在解剖显微镜下取出视网膜睫状缘色素上皮组织, 用剪刀剪成糜状, 加入质量分数 0.1% 胰蛋白酶 37 °C 消化 10 min, 终止消化, 加入 0.01 g/L DNA 酶, 反复轻轻吹打制成单细胞悬液, 离心半径 21 cm, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用含 EGF 和 bFGF 的 DMEM/F12 培养基重悬沉淀, 过 200 μm 筛网, 接种于 25 cm² 细胞培养瓶, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 之后每 3 天半量换液, 每 5~7 天传代 1 次, 传至第 3~4 代, 进行后续实验。

1.2.1.2 免疫荧光法及流式细胞术鉴定兔 RSCs

(1) Nestin 免疫荧光染色鉴定 采用 Nestin 抗体(1:200)检测培养的 RSCs, 按免疫荧光试剂盒说明书进行免疫荧光染色鉴定, Nestin 呈绿色荧光, 细胞核均采用 DAPI 染色, 呈蓝色; (2) BrdU 流式细胞术分析 参照 BrdU 细胞增生检测试剂盒使用说明书, 在兔 RSCs 的培养体系中加入 BrdU 至终浓度为 50 μmol/L, 孵育 24 h。对细胞进行固定、通透和 DNA 变性处理后, 加入 FITC-BrdU 抗体 5 μl (0.125 μg) 进行标记, 4 °C 条件下避光孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测; (3) RSCs 自发分化细胞免疫荧光检测及流式细胞术分析 将正常培养的兔 RSCs 放入多聚赖氨酸包被的培养板中, 并换为含体积分数 1% B27 和 1% N2 的 DMEM/F12 分化培养基, 每 3 天换液 1 次。分化 10 d, 获取并重悬细胞; 按免疫荧光试剂盒说明书进行操作, 采用 Brn3b 抗体(1:200)和 GS 抗体(1:200)检测分化所得细胞, 荧光显微镜下观察。分别采用红色及绿色荧光的二抗对分化细胞进行免疫荧光染色, 采用流式细胞术双色分析检测 Brn3b 阳性细胞及 GS 阳性细胞在分化细胞中所占的比例。

1.2.1.3 兔 RGCs 的原代培养及免疫荧光染色法鉴定 取出生 1~2 d 的新西兰大白兔 6 只, 颈椎脱臼法处死。无菌条件下取出眼球, 漂洗 3 次。在显微镜下分离出视网膜神经上皮层组织。漂洗 3 次, 置于 0.5 g/L 胰蛋白酶中, 37 °C 消化 30 min, 加入含体积分数 10% FBS 的 DMEM 终止消化。40 μm 滤网过滤。离心半径 21 cm, 1 500 r/min 室温离心 5 min, 弃上清, 加入 DMEM 完全培养基。调整细胞密度后, 接种至细胞培养瓶中。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 7~10 d。获取细胞, 采用 Brn3b 抗体(1:200)及 Thy1.1 抗体(1:200)进行免疫荧光染色鉴定, Brn3b 阳性表现为细胞核内出现绿色荧光, Thy1.1 阳性表现为细胞核及细胞质内出现绿色荧光。

1.2.2 RSCs 与 RGCs 在不同压力下共培养 RSCs 与 RGCs 置于 Transwell 培养皿上下层构建共培养体系进行培养, 接种 1×10⁵ 个 RGC 至上室培养皿中, 5×10⁵ 个 RSCs 至下室培养皿中。用剪刀将装有 500 ml 生理盐水的袋子底部剪开, 倒出生理盐水。将培养皿放入空袋中, 并使用塑料信封机将底部密封。利用血压计将空气泵入袋中, 并使用该仪器测量压力。使用该方法在 37 °C、CO₂ 培养箱中以不同压力(0、20、40、60、80 mmHg)(1 mmHg=0.133 kPa)处理细胞 48 h。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测不同压力下实验兔 RSCs 及分化所得细胞 Nestin 和 Thy1.1 的表达 采用

Trizol 提取液提取各组细胞总 RNA,按逆转录试剂盒说明将 0.5 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA,反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min。将获得的 cDNA 模板与实时荧光定量 PCR 引物进行扩增。引物设计见表 1,引物由上海生工生物有限公司提供。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,以上 3 步循环 42 次。PCR 在 CFX96 Touch™ real-time PCR 检测系统中完成。以 GAPDH 为内参,检测各基因的相对表达量。实验重复 3 次,结果取平均值。

表 1 引物序列
Figure 1 Primer sequences

引物	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
Nestin	正向:AAGATGGAGAAACGGTGACG	208
	反向:TCCTGGTCTCCTTTTGTGG	
Thy1.1	正向:CATGAGAACCACGAGCGT	156
	反向:GTACCTGCTGGTGAAGTTGGT	
GAPDH	正向:TGGTGAAGGTCGGAGTGAAC	135
	反向:TGCCGTGGGTGGAATCATAC	

注:Nestin:巢蛋白;Thy:胸腺嘧啶;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶
Note:Thy:thymine;GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.2.4 Western blot 法检测不同压力下实验兔 RSCs 及分化所得细胞 Nestin 及 Thy1.1 的表达 加入蛋白抽提裂解液充分裂解各组细胞,进行物理超声后,采用 BCA 法蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。并采用 1 倍磷酸盐缓冲液将蛋白浓缩至 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。以 40 μg 总蛋白/孔上样,用 10%SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜。室温封闭 2 h,一抗 1:500 稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。内参 GAPDH 抗体 1:1 000 稀释。HRP 标记的二抗 1:2 000 稀释,室温下孵育 2 h。清洗膜后,将其暴露在暗室中并显影。采用 ImageJ 软件分析各条带灰度值,目的蛋白相对蛋白表达量=目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0 统计学软件(美国 GraphPad Software 公司)进行统计分析。计量资料数据经 Kolmogorov-Smirnov 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。不同压力条件下各目的基因 mRNA 和蛋白相对表达量总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔 RSCs 的培养及鉴定

2.1.1 Nestin 免疫荧光染色鉴定 分离的兔 RSCs 聚集成细胞球形态,细胞球内大部分细胞均显示 RSCs 特异性标志物 Nestin 阳性(图 1)。

2.1.2 兔 RSCs 增生细胞数 流式细胞术分析结果显示,BrdU 阳性细胞占分离的 RSCs 细胞的(92.26 $\pm$ 3.28)%(图 2)。

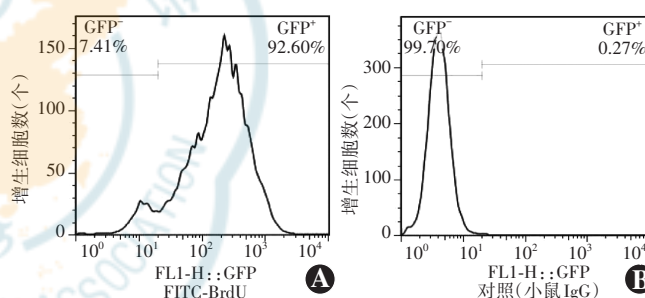


图 2 BrdU 流式细胞术分析检测实验兔 RSCs 增生细胞数 BrdU 阳性细胞率为(92.26 $\pm$ 3.28)% A:培养体系中加入 BrdU B:培养体系未加入 BrdU FITC:异硫氰酸荧光素;BrdU:溴脱氧核苷尿嘧啶

Figure 2 Proliferation of cultured rabbit RSCs detected by BrdU cell proliferation assay kit The percentage of BrdU-positive RSCs was (92.26 $\pm$ 3.28)% A: Rabbit RSCs cultured with BrdU B: Rabbit RSCs cultured without BrdU FITC: fluorescein isothiocyanate; BrdU: bromodeoxyuridine

2.1.3 RSCs 自发分化所得细胞免疫荧光检测及流式细胞术分析 免疫荧光检测结果显示,RSCs 分化细胞

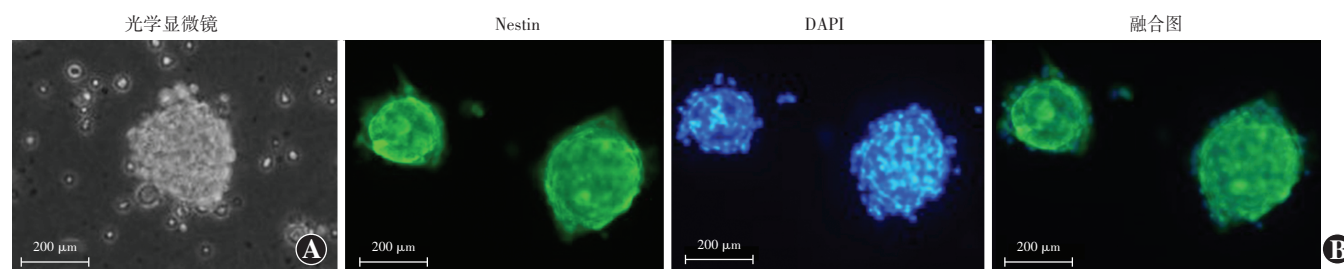


图 1 Nestin 抗体免疫荧光染色鉴定兔 RSCs A:光学显微镜下可见分离的兔 RSCs 聚集成细胞球形态,悬浮于培养基中($\times 200$,标尺=200 μm) B:免疫荧光染色鉴定显示,细胞球内大部分细胞均显示 Nestin 阳性,呈绿色荧光,细胞核均呈 DAPI 蓝染(FITC $\times 200$,标尺=200 μm) Nestin:巢蛋白;DAPI:二胺基苯基吡啶

Figure 1 Immunofluorescence staining of nestin antibody to identify rabbit RSCs A:The isolated rabbit RSCs aggregated into cell spheres and suspended in the medium ($\times 200$,bar=200 μm) B:Most cells in the cell spheres were nestin-positive and presented green. The nuclei stained with DAPI showed blue (FITC $\times 200$,bar=200 μm) DAPI:diamidine phenylindole

中,部分细胞 Brn3b 抗体表达阳性,部分细胞 GS 抗体表达阳性,均呈绿色荧光。流式细胞术双色分析结果显示,Brn3b 阳性细胞率为 $(13.00 \pm 3.06)\%$,GS 阳性细胞率为 $(31.60 \pm 3.67)\%$ (图 3)。

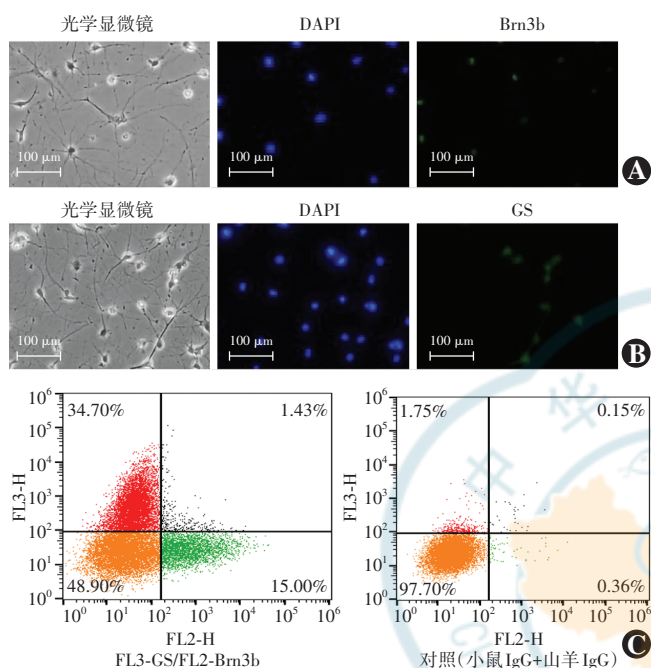


图 3 RSCs 自发分化细胞免疫荧光检测及流式细胞术分析 A: 部分细胞 Brn3b 抗体表达阳性,呈绿色荧光 (FITC $\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) B: 部分细胞 GS 抗体表达阳性,呈绿色荧光 (FITC $\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) C: 流式细胞术双色分析显示,Brn3b 阳性细胞率为 $(13.00 \pm 3.06)\%$,GS 阳性细胞率为 $(31.60 \pm 3.67)\%$ DAPI:二脒基苯基吡啶

Figure 3 Immunofluorescence staining and flow cytometry of spontaneously differentiated rabbit RSCs A: Some cells were Brn3b-positive and showed green fluorescence (FITC $\times 200$, bar = $200 \mu\text{m}$) B: Some cells were GS-positive and presented green fluorescence (FITC $\times 200$, bar = $200 \mu\text{m}$) C: Two-color flow cytometry analysis showed that the proportion of Brn3b-positive cells was $(13.00 \pm 3.06)\%$, and the proportion of GS-positive cells was $(31.60 \pm 3.67)\%$ in the differentiated cells DAPI: diamidine phenylindole

2.2 RGCs 的培养及鉴定

原代分离的兔 RGCs 可见多个树突状突起。大部分培养的细胞 Brn-3b 及 Thy1.1 抗体染色阳性 (图 4)。

2.3 不同压力条件 RSCs 及分化所得细胞 Nestin 和 Thy1.1 mRNA 相对表达量比较

不同压力条件下 RSCs 及分化所得细胞的 Nestin 和 Thy1.1 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 127.600$, $P = 0.005$; $F = 137.400$, $P < 0.001$), 其中与 0 mmHg 组相比, 20、40、60、80 mmHg 条件下 Nestin mRNA 相对表达量降低, Thy1.1 mRNA 相对表达量升高, 差异均有统计学意义

(均 $P < 0.05$)。40 mmHg 时, Nestin mRNA 相对表达量最低, Thy1.1 mRNA 相对表达量最高 (表 2)。

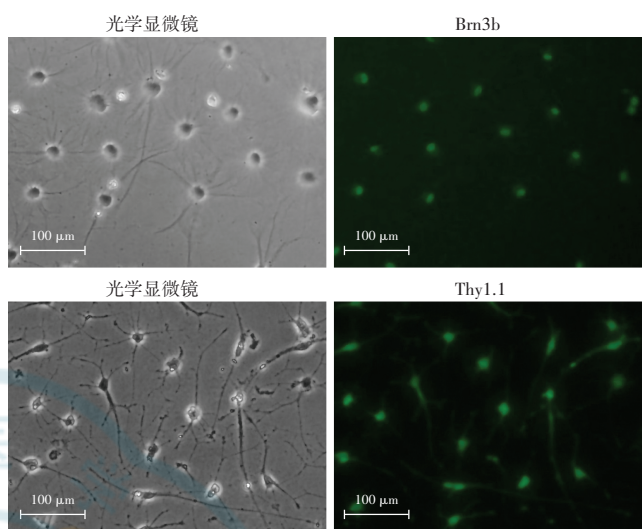


图 4 RGCs 的培养及鉴定 (FITC $\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) 体外培养的兔 RGCs 可见多个树突状突起, 大部分培养的细胞 Brn3b 抗体 (细胞核内出现绿色荧光) 和 Thy1.1 抗体 (细胞核及细胞质内出现绿色荧光) 染色阳性 Thy: 胸腺嘧啶

Figure 4 Culture and identification of RGCs (FITC $\times 200$, bar = $200 \mu\text{m}$) Multiple dendritic protrusions could be seen in rabbit RGCs cultured *in vitro*, and most cells were Brn3b-positive showing green fluorescence in the nucleus, and the Thy1.1-positive showing green fluorescence in the nucleus and cytoplasm Thy: thymine

表 2 不同压力条件 RSCs 及分化所得细胞 Nestin 和 Thy1.1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of relative expressions of nestin and Thy1.1 mRNA in RSCs and differentiated cells among different pressures ($\bar{x} \pm s$)

压力 (mmHg)	样本量	Nestin mRNA 相对表达量	Thy1.1 mRNA 相对表达量
0	3	1.003 $\pm$ 0.055	1.003 $\pm$ 0.085
20	3	0.490 $\pm$ 0.035 ^a	3.833 $\pm$ 0.280 ^a
40	3	0.257 $\pm$ 0.015 ^a	5.330 $\pm$ 0.455 ^a
60	3	0.550 $\pm$ 0.026 ^a	2.277 $\pm$ 0.211 ^a
80	3	0.650 $\pm$ 0.066 ^a	1.360 $\pm$ 0.135 ^a
F 值		127.600	137.400
P 值		0.005	<0.001

注: 与 0 mmHg 相比, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验) RSCs: 视网膜干细胞; Nestin: 巢蛋白; Thy: 胸腺嘧啶 1 mmHg = 0.133 kPa

Note: Compared with 0 mmHg, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-t test) RSCs: retinal stem cells; Thy: thymine 1 mmHg = 0.133 kPa

2.4 不同压力条件 RSCs 及分化所得细胞 Nestin 和 Thy1.1 蛋白相对表达量比较

随压力升高, Nestin 蛋白表达条带减弱, 40 mmHg 时最弱, Thy1.1 蛋白表达条带增强, 40 mmHg 时最强 (图 5)。不同压力条件下 RSCs 及分化所得细胞 Nestin 和 Thy1.1 蛋白相对表达量总体比较差异均有

统计学意义 ($F = 82.480, 158.700$, 均 $P < 0.001$), 其中与 0 mmHg 相比, 20、40、60、80 mmHg 条件下 Nestin 蛋白相对表达量降低, Thy1.1 蛋白相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。40 mmHg 时, Nestin 蛋白相对表达量最低, Thy1.1 蛋白相对表达量最高 (表 3)。

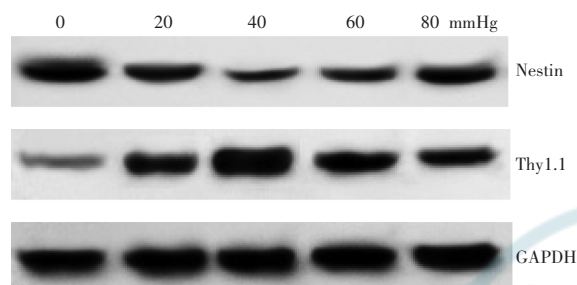


图 5 不同压力条件 RSCs 及分化所得细胞 Nestin 和 Thy1.1 蛋白表达电泳图 随压力升高, Nestin 蛋白表达条带减弱, 40 mmHg 时最弱, Thy1.1 蛋白表达条带增强, 40 mmHg 时最强 Nestin: 巢蛋白; Thy: 胸腺嘧啶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 1 mmHg = 0.133 kPa
Figure 5 Expression of nestin and Thy1.1 proteins in RSCs and differentiated cells under different pressures detected by Western blot As the pressure increased, the nestin protein bands were weakened, and the Thy1.1 protein bands were strengthened. When the pressure was 40 mmHg, the nestin protein band was the weakest, and the Thy1.1 protein band was the strongest Thy: thymine; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 mmHg = 0.133 kPa

表 3 不同压力条件 RSCs 及分化所得细胞 Nestin 和 Thy1.1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative expression of nestin and Thy1.1 proteins in RSCs and differentiated cells among different pressures ($\bar{x} \pm s$)

压力 (mmHg)	样本量	Nestin 蛋白 相对表达量	Thy1.1 蛋白 相对表达量
0	3	1.020 ± 0.085	0.420 ± 0.050
20	3	0.580 ± 0.030 ^a	0.807 ± 0.038 ^a
40	3	0.293 ± 0.052 ^a	1.303 ± 0.087 ^a
60	3	0.450 ± 0.035 ^a	0.828 ± 0.074 ^a
80	3	0.653 ± 0.099 ^a	0.672 ± 0.111 ^a
<i>F</i> 值		82.480	158.700
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: 与 0 mmHg 相比, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) RSCs: 视网膜干细胞; Nestin: 巢蛋白; Thy: 胸腺嘧啶 1 mmHg = 0.133 kPa

Note: Compared with 0 mmHg, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) RSCs: retinal stem cells; Thy: thymine 1 mmHg = 0.133 kPa

3 讨论

近年来, 干细胞成为神经节细胞再生研究的一种新趋势^[8-10]。根据移植细胞的来源不同分为 2 种: (1) 眼组织干细胞, 包括视网膜神经干细胞、视网膜 Müller 细胞去分化的前体细胞; (2) 非眼组织干细胞,

包括胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、脑源性神经干细胞, 及近年展开研究的脂肪干细胞^[11-13]。1998 年, Reh 等^[14]提出哺乳动物睫状体色素上皮中可能存在 RSCs, 多年来, RSCs 已成为细胞移植治疗视网膜病变的研究重点。RSCs 是具有自我更新能力和多方向分化潜能的神干细胞, 其可分化为多种视网膜细胞, 表达神经细胞和神经胶质细胞特异性标志物^[15]。本研究从孕龄 22 d 的孕兔胚胎中分离了 RSCs 进行原代培养, 分离的兔 RSCs 聚集成细胞球形态, 可以传代多次, 传代后对新细胞球进行鉴定, 仍然表达 Nestin, 表明这些细胞具有神经干细胞特性。采用 BrdU 流式细胞术分析检测发现, 培养的兔 RSCs 在体外具有良好的增生能力, 同时进行自发分化鉴定, 发现部分兔 RSCs 分化为神经节样细胞和神经胶质细胞, 表明本研究成功分离得到兔 RSCs。

既往研究表明, 视网膜损伤可能会刺激 RSCs 自我修复的潜力^[16-17]。有研究发现, 干细胞抗原可在人胚胎的视网膜部分表达 10~13 周, 并且可以在体外分化为视网膜细胞^[18]。Aoki 等^[19]已将 RSCs 应用于视网膜损伤的治疗。Huang 等^[20]从胚胎大鼠分离出 RSCs, 移植到视神经损伤大鼠左眼视网膜下腔后, 植入的细胞可以迁移并整合到视网膜中, 甚至可以分化为视网膜细胞。本研究在体外构建了 RSCs 和 RGCs 的共培养体系, 使用一种简单的方式施加外周压力, 通过压力计保证量化和压力的重复性, 模拟眼压升高时压力对与 RGCs 共培养的 RSCs 分化的影响, 结果发现随着压力的升高, RSCs 中 Nestin 表达水平下降, 说明 RSCs 分化增多。分化所得细胞中 RGCs 的标志物 Thy1.1 表达逐渐增多, 40 mmHg 时 RSCs 分化程度最大, Nestin mRNA 及蛋白表达量最低, 分化所得细胞中 Thy1.1 mRNA 及蛋白表达量最高。但当压力超过 40 mmHg 时, 分化细胞 Thy1.1 mRNA 及蛋白表达逐渐减少。这表明压力升高会诱导 RSCs 分化为神经节样细胞。然而, 长期或过高的压力不仅会对 RGCs 造成不可逆转的损害, 还会损害 RSCs, 使其分化能力下降。说明在一定范围内, 压力能够促进与 RGCs 共培养的 RSCs 分化, 压力过大会损害 RSCs 并抑制其分化。然而, 分化所得的视网膜神经节样细胞虽然能够表达 RGCs 的特异基因, 但是否具备 RGCs 的功能以及在青光眼模型中 RSCs 移植中具体将会发生何种作用, 都值得我们进一步研究。

综上所述, 本研究表明, 在一定压力范围内, 压力能够促进与 RGCs 共培养的 RSCs 分化为神经节样细胞, 压力过大会损害 RSCs 并抑制其分化。如果能够

通过移植 RSCs, 促进其向有功能的 RGCs 分化, 补充缺失的 RGCs, 同时修复视网膜功能, 这将给青光眼未来的治疗带来希望。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 戴敏: 实验操作、论文撰写、数据整理、统计分析; 亢泽峰: 实验设计、论文修改及定稿; 胡竹林: 论文修改; 李妍: 部分实验操作

参考文献

- [1] Adewara BA, Adegbehingbe BO, Onakpoya OH, et al. Relationship between intraocular pressure, anterior chamber depth and lens thickness in primary open-angle glaucoma patients [J]. *Int Ophthalmol*, 2018, 38(2): 541-547. DOI: 10. 1007/s10792-017-0488-4.
- [2] Hirooka K, Izumibata S, Uekawa K, et al. Estimating the rate of retinal ganglion cell loss to detect glaucoma progression: an observational cohort study [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(30): e4209 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27472691/>. DOI: 10. 1097/MD. 0000000000004209.
- [3] Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270(2): 517-521. DOI: 10. 1006/bbrc. 2000. 2473.
- [4] Akagi T, Haruta M, Akita J, et al. Different characteristics of rat retinal progenitor cells from different culture periods [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 341(3): 213-216. DOI: 10. 1016/s0304-3940(03)00177-0.
- [5] Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye [J]. *Science*, 2000, 287(5460): 2032-2036. DOI: 10. 1126/science. 287. 5460. 2032.
- [6] Xu S, Sunderland ME, Coles BL, et al. The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6 [J]. *Dev Biol*, 2007, 304(2): 713-721. DOI: 10. 1016/j. ydbio. 2007. 01. 021.
- [7] Dai M, Zhang Q, Zheng Z, et al. Retinal ganglion cell-conditioned medium and surrounding pressure alters gene expression and differentiation of rat retinal progenitor cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 7177-7183. DOI: 10. 3892/mmr. 2018. 8738.
- [8] Siqueira RC. Stem cell therapy for retinal diseases: update [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2011, 2(6): 50 [2022-04-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22206617/>. DOI: 10. 1186/s12911-011-0088-8.
- [9] Medina RJ, Archer DB, Stitt AW. Eyes open to stem cells: safety trial may pave the way for cell therapy to treat retinal disease in patients [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2011, 2(6): 47 [2022-04-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22152341/>. DOI: 10. 1186/s12911-011-0088-8.
- [10] Zhou X, Xia XB, Xiong SQ. Neuro-protection of retinal stem cells transplantation combined with copolymer-I immunization in a rat model of glaucoma [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2013, 54: 1-8. DOI: 10. 1016/j. men. 2012. 12. 001.
- [11] Lin TC, Hsu CC, Chien KH, et al. Retinal stem cells and potential cell transplantation treatments [J]. *J Chin Med Assoc*, 2014, 77(11): 556-561. DOI: 10. 1016/j. jama. 2014. 08. 001.
- [12] 朱瑞琳, 杨柳. 视网膜内源性干细胞研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(9): 855-859. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 09. 017.
- [13] Zhu RL, Yang L. Advances of research on endogenous retina stem cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(9): 855-859. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 09. 017.
- [14] Yip HK. Retinal stem cells and regeneration of vision system [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014, 297(1): 137-160. DOI: 10. 1002/ar. 22800.
- [15] Reh TA, Levine EM. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina [J]. *J Neurobiol*, 1998, 36(2): 206-220.
- [16] Wohl SG, Schmeer CW, Isenmann S. Neurogenic potential of stem/progenitor-like cells in the adult mammalian eye [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(3): 213-242. DOI: 10. 1016/j. preteyeres. 2012. 02. 001.
- [17] 张敬学, 王宁利, 马建民. 干细胞在视神经损伤修复中的应用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2009, 27(11): 1044-1047. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2009. 11. 023.
- [18] Zhang JX, Wang NL, Ma JM. Research advance in application of stem cells in optic nerve regeneration [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2009, 27(11): 1044-1047. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2009. 11. 023.
- [19] Fischer AJ, Bosse JL, El-Hodiri HM. The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 116: 199-204. DOI: 10. 1016/j. exer. 2013. 08. 018.
- [20] Yang P, Seiler MJ, Aramant RB, et al. *In vitro* isolation and expansion of human retinal progenitor cells [J]. *Exp Neurol*, 2002, 177(1): 326-331. DOI: 10. 1006/exnr. 2002. 7955.
- [21] Aoki H, Hara A, Niwa M, et al. Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo* regeneration of retinal ganglion-like cells [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008, 246(2): 255-265. DOI: 10. 1007/s00417-007-0710-6.
- [22] Huang XY, Yin ZQ, Tan XL. Characteristics of retinal stem cells from rat optic cup at embryonic day 12. 5 (tailbud stage) [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 333(3): 381-393. DOI: 10. 1007/s00441-008-0653-1.

(收稿日期: 2022-05-10 修回日期: 2022-11-06)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

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: 登录中华医学会网站 (<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, 加盖第一作者单位公章后寄 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署录的相一致, 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再次在本刊投稿须征得首次发表期刊和本刊编辑部的同意。(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等利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)



中华医学会杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究