

新生小牛视杆细胞体外发育过程中细胞形态及视色素分子分布的极性特征

金燕 李根林 王津津 范尔钟 张晓光

【摘要】 目的 明确新生小牛视网膜视杆细胞体外发育过程中细胞形态及视色素分子分布的变化规律。方法 分离培养新生小牛视网膜神经细胞,培养 10、20、30 和 40 d 的神经元用于免疫细胞化学染色,采用 rho4D2 抗体标记视网膜视杆细胞,观察不同培养时期的阳性细胞的形态特征及视色素分子分布的特点。用图像分析系统定量测量阳性细胞的免疫反应强度。结果 rho4D2 阳性细胞呈现两种形态,一种为无突起的小圆形细胞,另一种为带有顶端突起的细胞。体外培养 10 d 时,视色素弥漫地分布于整个细胞膜及顶端突起;培养 20 d 时视色素逐渐向顶端突起或细胞的一端集中;到培养 30、40 d 时,视色素聚集于顶端突起或细胞的一端,呈现极性分布特征。定量分析显示,体外培养 20 d 的阳性细胞,免疫反应强度较培养 10 d 时明显增强,培养 20、30、40 d 的阳性细胞的免疫反应强度没有明显差异。结论 体外培养 30、40 d 的视杆细胞具备细胞结构及视色素分子分布的极性特征,并有高水平的蛋白质表达能力,是发育成熟的神经元。

【关键词】 视杆(视网膜)/生长和发育; 细胞培养; 色素上皮,眼

中图分类号:R446.39 R77

Cellular configuration and polarized characteristic of visual pigment during the development of rod cells of neonatal calf in vitro JIN Yan*, LI Gen-lin, WANG Jin-jin, et al. *Department of Ophthalmology, 2nd Medical College, Jilin University, Changchun 130041, China
Corresponding author: JIN Yan, Email: jinyan0403@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the changes of cellular configuration and polarized characteristic of visual pigment during the development of rod cells of neonatal calf in vitro. **Methods** Retinal cells of neonatal calf were dissociated and cultivated for 10, 20, 30 and 40 days in vitro were used for immunocytochemical analysis. Retinal rod cells were identified by rho4D2 antibody. The configuration of positive cells and rhodopsin molecular distribution were analysed at different cultivated time. The immuno-reactivity of positive cells was measured by image analysis system. **Results** The rho4D2 immuno-reactive cells included small round cells without protuberance and the cells with protuberance at the peak. At the 10th day after cultivation, the visual pigment immunoreaction was suffusive in the whole cell membrane and apical process; while at the 30th and 40th day, it gathered at the membrane of apical process or one pole of the cells. The results of quantitative analysis showed that the immunoreactive intensity of positive cells at the 20th day after cultivation was stronger than that at the 10th day; while there was no significant difference among the immunoreactive intensity at the 20th, 30th, and 40th day. **Conclusions** Rod cells at the 30th and 40th day after cultivation have the polarized characterization and visual pigment molecular distribution with high level of expressive ability of protein, which are mature neurons.

【Key Words】 Rods (retina)/growth & development; Cell culture; Pigment epithelium of eye

视网膜神经元的发育与视网膜变性疾病的发病机理及视网膜移植供体材料的选择等研究均有密切关系^[1,3]。光感受器细胞作为视觉信号传递路径中的第一级神经元,对于视功能的完成起重要作用,其生长发育过程一直受到人们的关注^[4,5]。我们应用 rho4D2 抗体标记新生小牛视网膜视杆细胞,观察其体外发育规律。

1 材料和方法

1.1 视网膜神经细胞的分离和原代培养

出生 24 h 内的新生小牛由北京市红星屠宰场提供。将牛颈动脉放血急性处死,摘除眼球并分离其视网膜神经上皮层,将组织剪为约 1 mm×1 mm 的碎块,加入 0.25%胰蛋白酶,37℃消化 15 min,加入少许胎牛血清终止消化,以离心半径 15 cm、800 r/min 离心

5 min, 去除上清液后加入含5%胎牛血清的 Dulbecco 改良 Iscove 培养液 (IMDM) 培养液制成细胞悬液, 调细胞浓度至 1×10^6 个/ml, 分别接种于 6 孔培养板 (孔底置有盖玻片), 于 37°C 含 5% CO_2 孵箱内持续培养。培养期间每周更换培养液 2 次, 每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.2 免疫细胞化学染色

培养 10、20、30、40 d 的视网膜神经细胞用于实验, 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接 (SP) 法免疫细胞化学染色, 用单克隆小鼠抗 rho4D2 抗体标记视网膜视杆细胞 (由加拿大 British Columbia 大学 David Hicks 教授惠赠), 抗体稀释度为 1:200。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作空白对照, 正常小鼠血清代替一抗作阴性对照, 用正常大鼠视网膜组织切片作阳性对照。

1.3 阳性细胞免疫反应强度的测定

用多功能真彩色病理图像分析系统 (CMIAS, 北京航空航天大学、空军总医院研制) 测量阳性视网膜神经细胞中免疫化学染色的平均吸光度 [A, 旧称光密度 (OD)] 值, 平均 A 值为阳性染色面积内各点吸光度的积分总和与阳性染色面积的比值, 用于反映阳性细胞的免疫反应强度。每张盖玻片在 400 倍显微镜下, 随机选择通过中心的横轴和纵轴上的 10 个视野, 用分割生长目标功能, 手动选定阳性细胞, 进行定量测量。所测结果取平均值。

1.4 统计学方法

用 one-way ANOVA 及 SNK 检验比较不同培养时期阳性细胞的平均 A 值, 结果采用 SPSS10.0 软件进行统计。

2 结果

2.1 视网膜神经细胞的原代培养

细胞接种后 4~6 h 开始贴壁, 体外培养 2 d 后, 细胞开始伸出突起。培养 5 d 后, 贴壁的神经细胞从形态上分为两类, 一类细胞境界清楚, 为神经元; 另一类细胞呈扁平状, 境界欠清, 为神经胶质细胞。培养 10 d 时, 神经元细胞体呈多边形、楔形或圆形, 神经突起呈短粗状, 神经突起的数量仅为 1~2 个。

培养 20 d 时, 神经元具备不同的形态特征, 根据形态学特点的不同将神经元分为 3 类。(1) 多极神经元: 细胞体相对较大, 有 2 个或多个极, 从细胞体向外伸出神经突起, 不同神经元细胞的形状以及神经突起的数量、伸展方式、突起分支的方式各不相同 (图 1); (2) 带有顶端突起的细胞: 细胞体较小, 呈圆形或近似

圆形, 细胞呈现极性特征, 细胞体的一端有一个顶端突起 (图 2); (3) 无突起的小圆形细胞: 细胞体较小呈圆形, 细胞没有顶端突起 (图 2)。培养 30 d 以后, 神经元细胞体光晕减弱; 培养 50 d 以后细胞体内逐渐出现空泡, 到培养 90 d 时, 神经元胞体皱缩变圆, 突起萎缩, 神经元退化变性很快死亡。



图 1 体外培养 20 d 视网膜神经细胞光学显微镜像。不同形态特征的多极神经元。×200 图 2 体外培养 20 d 时视网膜神经细胞光学显微镜像。无突起的小圆形细胞 (黑箭) 和带有顶端突起的细胞 (白箭)。×200

2.2 不同培养阶段视网膜神经细胞的免疫细胞化学染色结果

培养 10 d 时, 无突起的小圆形细胞中, 免疫反应阳性物质弥漫地分布于细胞膜; 带有顶端突起的细胞中, 免疫反应阳性物质呈弥漫性分布于细胞膜和顶端突起 (图 3)。培养 20 d 时, 阳性细胞形态同培养 10 d 时的细胞。在无突起的小圆形细胞中, 免疫反应阳性物质分布于靠近细胞一端的细胞膜; 在有顶端突起的细胞中, 免疫反应阳性物质位于靠近顶端突起的细胞膜和顶端突起, 并有向顶端突起集中的趋势, 其它部位显示阴性染色 (图 4)。培养 30 d 时, 阳性细胞形态同培养 10 d 时的细胞。在无突起小圆形细胞内, 免疫反应阳性物质聚集于细胞一端的细胞膜; 带有顶端突起的细胞中, 免疫反应阳性物质集中于顶端突起, 细胞膜呈阴性 (图 5)。培养 40 d 时, 阳性细胞的形态及免疫阳性物质的分布部位同培养 30 d 时的细胞 (图 6)。

2.3 不同培养阶段 rho4D2 阳性细胞免疫反应强度

体外培养 20 d 时的平均 A 值 (0.499 ± 0.068) 明显高于培养 10 d 时的平均 A 值 (0.445 ± 0.047) ($F=5.014, P=0.038$)。体外培养 30 d 时的平均 A 值 (0.5 ± 0.065) 与培养 40 d 时的平均 A 值 (0.49 ± 0.052) 及培养 20 d 时的平均 A 值相比, 差异无统计学意义 ($F=0.062, P=0.942$)。



图3 体外培养 10 d 视网膜神经细胞免疫组织化学染色像。无突起的小圆形细胞中,免疫反应阳性物质弥漫地分布于细胞膜(黑箭);带有顶端突起的细胞中,免疫反应阳性物质呈弥漫性分布于细胞膜和顶端突起(白箭) DAB $\times 400$ 图4 体外培养 20 d 时视网膜神经细胞免疫组织化学染色像。带有顶端突起的阳性细胞(黑箭)。免疫反应阳性物质位于靠近顶端突起的细胞膜和顶端突起 DAB $\times 400$

Fig. 3 Photograph of immunocytochemical stain of the neural cells at the 10th DIC shows 2 kinds of positive cells; process-free cell with diffuse immunoreaction in whole cell membrane (black arrow), and the cell with apical process and with immunoreaction in cell membrane and apical process (white arrow) DAB $\times 400$ Fig. 4 Photograph of immunocytochemical stain of the neural cells at the 20th DIC shows the immunoreaction gathering in apical process and part of cell membrane near the apical process (black arrow) DAB $\times 400$



图5 体外培养 30 d 时视网膜神经细胞免疫组织化学染色像。无突起的小圆形细胞中,免疫反应阳性物质集中于细胞一端的细胞膜(黑箭头);带有顶端突起的细胞中,免疫反应阳性物质集中于顶端突起,细胞膜呈阴性(黑箭) DAB $\times 400$ 图6 体外培养 40 d 时视网膜神经细胞免疫组织化学染色像。带有顶端突起的阳性细胞,免疫反应阳性物质集中于顶端突起,细胞膜呈阴性(黑箭) DAB $\times 400$

Fig. 5 Photograph of immunocytochemical stain of the neural cells at the 30th DIC shows the immunoreaction gathering in apical process (black arrow) and the immunoreaction at one pole of the cell body in process-free cells (black arrow) DAB $\times 400$ Fig. 6 Photograph of immunocytochemical stain of the neural cells at the 40th DIC shows the immunoreaction gathering exclusively in apical process (black arrow) DAB $\times 400$

3 讨论

1986 年,Adler^[3]首先应用去除神经胶质细胞的原代视网膜神经细胞分散培养体系,观察鸡视网膜感光感受器细胞(PhR)的体外发育,结果显示体外培养 7 d 的鸡胚 PhR 能在细胞的一端形成外节段样的顶端突起,在形态学上呈现典型的极性特征;免疫细胞化学染色证实视色素集中分布于外节段样的顶端突起,由于缺乏特异性抗体,未能对 PhR 进行分类。而后 Saga 等^[2]应用透射电子显微镜观察了体外培养的鸡胚 PhR 的超微结构,显示顶端突起为 PhR 纤毛的远端膨胀,包含不规则排列的盘膜,其形态特征与体内 PhR 外节段发育过程中的表现一致。同时应用 rho4D2 抗体标记视杆细胞,显示免疫反应阳性物质呈现典型的极性分布,主要或完全位于外节段样的顶端突起,在没有外节段的细胞,视色素位于内节段。

我们采用视网膜神经细胞混合培养,即将视网膜神经元和神经胶质细胞共同培养,细胞在体外培养时间长达 40 d 以上,观察长期培养的新生期视网膜视杆

细胞的体外动态发育规律。结果显示, rho4D2 阳性的视杆细胞呈现两种形态,一种是无突起的小圆形细胞,另一种是带有顶端突起的细胞。免疫细胞化学染色表明,培养后期的阳性细胞中视色素分子分布于顶端突起,证实顶端突起为发育的视杆细胞外节段。在不同的培养阶段,由于受机械分离、酶消化作用及细胞发育程度的影响,均有一定数量的无顶端突起的阳性细胞,在体外发育过程中,其视色素分子分布呈规律性的改变,培养晚期时,视色素分子位于细胞一端的细胞膜,提示其位置相当于内节段^[2,3]。

在 PhR 的发育过程中,细胞内视色素分子分布呈现动态变化的特性。Dorn 等^[4]应用 rho4D2 抗体标记视杆细胞,观察胚胎视网膜发育过程中视杆细胞视色素的变化规律,发现视杆视色素最初位于连接纤毛,很快遍布整个细胞膜,而后细胞膜染色消失,而外节段逐渐发育延长并显示强阳性染色。Araki 等^[5]发现,在大鼠视网膜的发育过程中,未发育成熟的视杆细胞,其视色素在细胞膜和开始形成的外节段都有表达,而在发育成熟的视杆细胞,视色素只在外节段出现;他们还发现,位于内核层的移位的 PhR 不能正常发育,缺少视色素分子分布的极性特征。上述研究表明视色素分子分布的极性特征是 PhR 发育成熟的标志。本实验结果显示,体外培养的 rho4D2 阳性的新生小牛视杆细胞随培养时间的延长,细胞内视色素的分布呈现动态变化的特性。定量分析结果表明,体外发育过程中,视杆细胞在特异性蛋白质表达方面逐步成熟,并在较长时间内保持高水平的视色素表达能力。体外培养 30、40 d 的视杆细胞具备细胞结构及视色素分子分布的极性特征,并有高水平的蛋白质表达能力,是发育成熟的神经元。我们所建立的培养体系适合视杆细胞体外生长发育。

4 参考文献

- Sharma RK, O'Leary TE, Field CM, et al. Development of the outer retina in the mouse. *Dev Brain Res*, 2003, 145: 95-105.
- Lund RD, Kwan AS, Keegan DJ, et al. Cell transplantation as a treatment for retinal disease. *Prog Retin Eye Res*, 2001, 20: 415-449.
- DiLoreto DA Jr, del Cerro C, Lazar ES, et al. Storage of human fetal retin in optical prior to subretinal transplantation. *Cell Transplant*, 1996, 5: 331-341.
- Wu SM, Yew DT. A cytological study on the development of the different types of visual cells in the chicken (*Gallus domesticus*). *Cell Mol Neurobiol*, 2002, 22: 57-85.
- Dorn EM, Hendrickson L, Hendrickson AE. The appearance of rod opsin during monkey retinal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36: 2634-2651.
- Adler R. Developmental predetermination of the structural and molecular polarization of photoreceptor cells. *Dev Biol*, 1986, 117: 320-327.
- Saga T, Scheufer D, Adler R, et al. Development and maintenance of outer segment by isolated chick embryo photoreceptor cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37: 361-373.
- Araki M, Itoh Y, Taketani S, et al. Characterization of photoreceptor cell differentiation in the rat retinal cell culture. *Dev Biol*, 1987, 124: 239-247.

(收稿日期: 2004-06-28)

(本文编辑: 朱敏)