

Müller 细胞对大鼠光感受器变性及视功能的保护作用

董晓飞 柳林 严良 陈淑娟

Effects of subretinal transplantation of Müller glia with neural stem cell properties on photoreceptor degeneration in rats

Dong Xiaofei, Liu Lin, Yan Liang, Chen Shujuan. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective The purpose of this study was to investigate whether subretinal transplantation of Müller cells with neural stem cell properties can rescue photoreceptor degeneration in RCS rat. **Methods** The mixed neurotoxins solution containing N-methyl-D-aspartate (NMDA), kainate, fibroblast growth factor-2 (FGF2) and insulin was intravitreally injected in the right eyes of 6-week-old VC rats (ten rats) to activate Müller cells and the physical salt solution was injected in the left eyes as control. One week later, the activated Müller cells were gathered, cultured and purified. After being labeled with DAPI, the activated Müller cells were transplanted into subretinal space of the right eyes of 6-week-old RCS rats (eight rats), and the left eyes received unactivated Müller cells as homotype control in three RCS rats and PBS as negative control eyes in three RCS rats. The histologic evaluation and electroretinogram (ERG) were carried out at the 1st, 3rd, 5th and 7th week after injection. **Results** Fluorescence-activated cell sorting (FACS) showed that the purified Müller cells labeled by glutamine synthetase was above 96.07%, and 53.47% of cells presented positive fluorescence staining for nestin. Four to five layer of survival Müller cells were seen in the retina of transplantation zone and only one layer in non-transplantation zone under the light microscope. The number of survival photoreceptors in transplantation eyes of Müller cells was significantly increased than that of control eyes ($P < 0.01$). The a-wave amplitudes of electrophysiology showed a statistically significant difference among the active cells injection group, inactive cells injection group and negative control group at 1, 5 and 7 weeks after injection ($P < 0.01$), and those of b wave were significantly different among the active cells injection group, inactive cells injection group and negative control group at 1, 3, 5 and 7 weeks after injection ($P < 0.01$). **Conclusion** Subretinal transplantation of Müller glia with neural stem cell properties can effectively delay photoreceptor degeneration and functional deterioration time in RCS rats, which offer a new method of therapeutic way of the retinal degenerative disease.

Key words retinal degeneration; cell transplantation; Müller cell; stem cell

摘要 目的 以 RCS 视网膜色素变性大鼠为模型, 研究经诱导产生神经干细胞特性的 Müller 细胞视网膜下腔移植对光感受器变性的保护作用。 **方法** 向 6 周龄 VC 大鼠玻璃体腔内注射神经毒素混合液(包含 NMDA、kainate、FGF2 和胰岛素)刺激视网膜 Müller 细胞。1 周后取材分离 Müller 细胞体外原代培养。将细胞标记后, 以每眼 1×10^5 个细胞密度移植到 6 周龄 RCS 大鼠右眼视网膜下腔, 左眼分组注射正常 Müller 细胞和 PBS 作为同型对照及阴性对照。术后分别于第 1、3、5、7 周, 行视网膜铺片、组织病理学及视觉电生理检查。 **结果** 培养的 Müller 细胞纯度可达 96% 以上, 其中表达神经干细胞标志物的细胞占总细胞量的 53% 以上。组织病理学观察显示, 在相同时间点移植眼保留的光感受器细胞数量明显较同型对照眼多, 同型对照移植眼保留的光感受器细胞数量明显较阴性对照眼多。视网膜电图(ERG)检查结果与病理学结果相符。 **结论** 视网膜下腔移植经诱导产生神经干细胞特性的 Müller 细胞可以有效延缓 RCS 大鼠视网膜光感受器变性, 为治疗视网膜变性性疾病提供了新的途径。

关键词 视网膜变性; 细胞移植; Müller 细胞; 干细胞

分类号 R 774.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)04-0279-06

2006年 Ani等^[1]诱导实验证明哺乳动物 Müller细胞具有潜在的神经干细胞特性。Akira等^[2]的研究也证明了该理论。为研究视网膜下腔移植具有神经干细胞特性的 Müller细胞是否会对视网膜变性疾病起治疗作用。我们以激活后的 VC(Vneversity College)大鼠视网膜 Müller细胞作为移植细胞,以 RCS大鼠作为视网膜变性动物模型,研究视网膜 Müller细胞活体激活后的转化效率、细胞移植后宿主视网膜的组织病理学变化,以及 Müller细胞移植对视网膜变性动物视功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6周龄 VC大鼠10只及6周龄 RCS大鼠8只(购自第三军医大学重庆大坪医院动物中心)。

1.2 实验方法

1.2.1 成年动物 Müller细胞激活及培养纯化 10%水合氯醛按3~4 mL/kg腹腔麻醉 VC大鼠,常规消毒、表面麻醉、铺巾,10 μ L微量进液器于右眼经睫状体扁平部向玻璃体腔内注射含有神经毒素 NMDA 40 mmol/L、KA 4 mmol/L(美国 Sigma公司)和人成纤维细胞生长因子2(FGF2)20 ng、胰岛素1 μ g的混合液5 μ L。左眼玻璃体内注射5 μ L PBS作为对照组。术后1周摘除眼球,选取部分处理组和对照组用于免疫组织化学检查。其余眼球用含双抗的 D-Hanks液冲洗数遍,DMEM/F-12(美国 Hyclone公司)培养基中孵育过夜。解剖显微镜下去除眼前节,剥取视网膜,剪除周边部视网膜,避免被视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞和睫状体上皮细胞污染。将视网膜剪碎,用0.1%的胰蛋白酶消化25 min,加入含15%胎牛血清的培养基终止消化。反复吹打成细胞悬液,经200目筛网过滤后800~1000 r/min离心5 min,弃上清,用DMEM-F12培养液(含15%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素)吹打悬浮,移至25 cm²培养瓶中,于5% CO₂培养箱内37℃贴壁培养。24 h后去上清及未贴壁细胞,换液1次。培养5~7 d观察,隔日换液,待细胞生长形成融合状态时,2/3换新鲜培养液,放入37℃的恒温摇床内,300 r/min振摇24 h。弃上清,DMEM-F12培养基冲洗2遍,重新加入培养液备用。

1.2.2 视网膜下腔细胞移植 6周龄 RCS大鼠为受体动物,按随机数字表法分为3个组,A组、B组各3只,C组2只,A组大鼠右眼视网膜下腔注射激活后的 Müller细胞,左眼视网膜下腔注射 PBS为对照眼;B组大鼠右眼视网膜下腔注射激活后的 Müller细胞,左眼

视网膜下腔注射未经激活的 Müller细胞(取材于正常 VC大鼠)为对照眼;C组大鼠右眼视网膜下腔注射未经激活的 Müller细胞,左眼视网膜下腔注射 PBS为对照眼。10%水合氯醛腹腔注射麻醉 RCS大鼠,以右眼为移植眼,固定大鼠体位使右眼朝向正上方,常规消毒、表面麻醉、铺巾,在11点钟方向用显微有齿镊提起球结膜及其下筋膜,用显微剪打开一小口,钝性分离球结膜及下筋膜,暴露巩膜。角巩膜缘后4 mm穿过浅层巩膜预置10-0角膜缝线。用持针器夹自制刀片在预置缝线中央处与巩膜呈15°角近水平轻划并刺穿巩膜,再用角膜针在6点钟方位的角膜处行前房穿刺,放出少量房水。然后用自制的显微注射器(将小儿用硬膜外导管一端拉制成外径为0.06~0.10 mm的毛细管,剪断另一端,将未拉制的一端与10 μ L的微量进液器针头相连)前端硅胶细管顺巩膜穿刺孔刺入视网膜下腔,边注细胞悬液边向后极部推送硅胶毛细管约4 mm,每只眼注射3~4 μ L细胞悬液。将预置缝线打结,防止液体外流,同时作为取材时标记。

1.2.3 流式细胞术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)检测 为了确定原代培养的 Müller细胞的纯度和表达神经干细胞标志物 Nestin的 Müller细胞占总细胞的比率,我们将神经毒素刺激后培养所得的 Müller细胞均分为3管,每管约 1×10^6 个细胞,分为空白对照管、二抗对照管和样品管,另设一管加入相同数量的正常 Müller细胞,作为同型对照管。将细胞悬液离心,弃上清,PBS冲洗并混悬,1200 r/min离心5 min,弃上清,反复3次。每管各加入固定液(美国 eBioscience公司)500 μ L,混匀固定,静置25 min。加 PBS液在室温下1200 r/min离心5 min \times 2次,洗去固定液。各管分别加入细胞膜裂解液(美国 eBioscience公司)1 mL,震荡混悬,1200 r/min离心5 min,弃上清,反复3次。在同型对照管和样品管中加入小鼠抗大鼠 Nestin 一抗(1:200)(美国 Chemicon公司)1 μ g,震荡混匀,静置1 h。加入细胞膜裂解液洗3次,洗去未结合一抗。在二抗对照管、同型对照管和样品管中分别加入 RPE 标记的羊抗小鼠二抗(英国 Abcam公司),震荡混匀,室温避光静置染色30 min。加入细胞膜裂解液洗3次,洗去未结合二抗。去上清,加入 PBS调至每管含液体约500 μ L,流式细胞分析仪检测。

1.2.4 移植细胞标记 于超净台上行细胞换液,加4~8 mL培养液,用微量加样器加 DAPI(北京碧海晴天公司)到培养瓶中,质量浓度为50 μ g/mL,无菌避光操作,染色过夜。移植前用 PBS清洗6遍,0.1%胰蛋白酶消化30 s,培养液终止消化,细胞计数,1000 r/min离

心 10 min, 弃上清, 加入生理盐水, 以 $1 \times 10^5/\mu\text{L}$ 的密度吹打成细胞悬液备用。

1.2.5 视网膜结构及光感受器存活状态的光镜观察

移植 1、3、5、7 周后取各组大鼠眼球, 4% 甲醛-乙醇-冰醋酸混合固定液固定 24 h。55%、65%、75%、85%、95% 及无水乙醇梯度脱水, 开窗取晶状体, 浸蜡、包埋、切片、染色。选择缝线标记位置附近的切片, 镜下观察各组切片相同层面的相同部位。高倍镜下, 通过目镜中的测微尺, 计数 4 个或 5 个 $100 \mu\text{m}$ 长度视网膜外颗粒层中光感受器细胞核数目, 计算平均数。每次随机选取 10 个视野计数, 平行重复 3 次。

1.2.6 细胞免疫荧光组织化学 将培养在 6 孔板盖玻片上的 Müller 细胞用 PBS 洗涤 $5 \text{ min} \times 2$ 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次, 0.3% TritonX-100 破膜 20 min, PBS 洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次, 吸干。封闭 30 min, 立即吸干。加小鼠抗大鼠谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 一抗 (1:10 000), 阴性对照用 PBS 代替一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 湿盒过夜。PBS 洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次, 吸干。加 RPE 标记的兔抗鼠二抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光 2 h, PBS 洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次, 吸干。缓冲甘油封片, 荧光显微镜观察并拍照。

1.2.7 闪光视网膜电图 (flash electroretinogram, F-ERG) 检测 10% 水合氯醛按 $3 \sim 4 \text{ mL/kg}$ 腹腔注射麻醉大鼠, 托吡卡胺滴眼液散瞳。ERG 接地电极为针型电极, 埋植于大鼠腮部或耳垂; 参考电极也为针型电极, 埋植于大鼠前额中央区域皮肤内; 角膜电极为环形接触电极, 置于大鼠角膜上。检测前大鼠暗适应 30 min, 0.5% 丁卡因表面麻醉角膜。操作遵循视觉临床电生理国际标准化委员会制定的操作标准。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学处理。对细胞移植术后不同时间 A、B、C 组中两样本间视网膜残留感光细胞计数的比较采用独立样本的 *t* 检验, 对 A、B、C 组各时间点 F-ERG a 波、b 波振幅的比较采用单因素方差分析, 组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Müller 细胞原代培养

原代培养的视网膜 Müller 细胞, 最初悬浮于培养液内, 4 h 后细胞开始贴壁。36 h 后, 部分贴壁细胞向周围迁移。48 h 后细胞团内有细胞迁出。在第 6~7 d 迁出的细胞形成融合状态。细胞形成两层, 底层为扁平且折光性弱的多角形细胞为 Müller 细胞, 其上为胞

体较小、折光性强且带有突起的细胞, 为不易贴壁且贴壁不牢的小胶质细胞和极少量残留神经元细胞。培养期间隔日换液可将悬浮的及贴壁不牢的细胞洗掉, 剩下的细胞绝大多数为 Müller 细胞, 但是无法将上层的混合性视网膜细胞清洗干净。当细胞生长至融合状态时, 置恒温摇床震荡, 可将附着于 Müller 细胞上层的其他细胞清除, 从而获得纯度极高的 Müller 细胞, 流式细胞术分析表明培养的细胞中表达 Müller 细胞标志物 GS 的细胞占总细胞的 96.07% (图 1)。

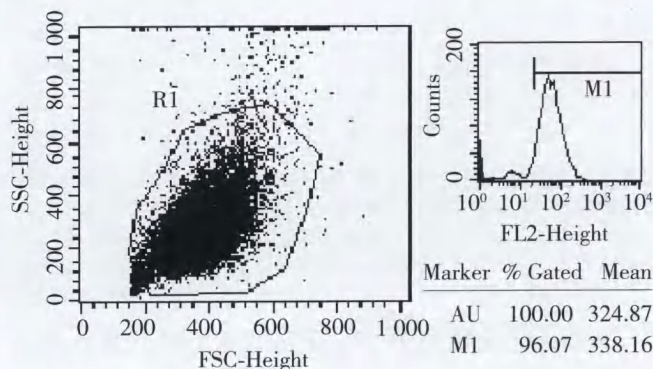


图 1 流式细胞术分析结果 96.07% 的培养细胞表达 Müller 细胞标志物

Fig.1 FACS shows that 96.07% of cultured cells express immunoreactivities corresponding to Müller cell markers



图 2 细胞爬片的免疫荧光组织化学结果 A: 细胞爬片 B: 毒素刺激后的 Müller 细胞 Nestin 表达阳性

Fig.2 The immunofluorescence result of cultured cells A: cultured cells B: The stimulating active Müller cells exhibit the positive reaction for Nestin, showing the red fluorescence

2.2 经刺激后的 Müller 细胞产生神经干细胞特性

细胞爬片的免疫荧光组织化学结果显示, 毒素刺激后的 Müller 细胞 Nestin 表达阳性, 而未经刺激的 Müller 细胞上未见 Nestin 蛋白表达 (图 2)。流式细胞术分析结果显示, 表达 Nestin 蛋白荧光阳性细胞占样

品管中细胞总数的 53.47% (图 3A); 阳性细胞占空白管中细胞的 0.25% (图 3B); 阳性细胞占二抗对照

管中细胞的 0.95% (图 3C); 阳性细胞占同型对照管中细胞的 1.54% (图 3D)。

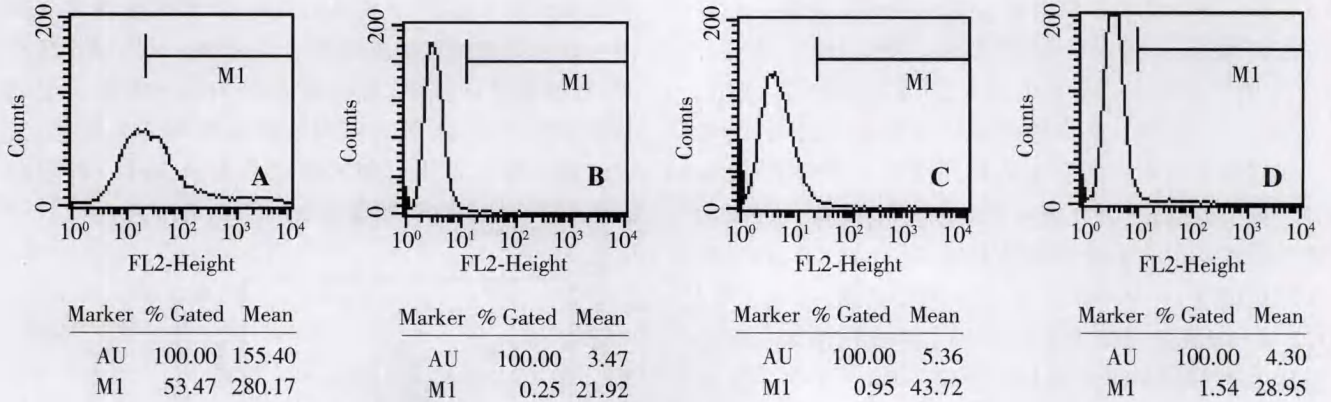


图 3 流式细胞术分析结果 表达 Nestin 蛋白荧光阳性细胞占样品管中细胞总数的 53.47% (A), 阳性细胞占空白管中细胞的 0.25% (B), 阳性细胞占二抗对照管中细胞的 0.95% (C), 阳性细胞占同型对照管中细胞的 1.54% (D)

Fig. 3 FACS shows that the positive fluorescenc for Nestin is found in 53.47% of cells in the sample bottle(A), 0.25% of cells in the blank bottle(B), 0.95% of cells in the antibody-control bottle(C) and 1.54% of cells in the homotype-control bottle(D)

2.3 各组动物视网膜结构变化及残留视网膜感光细胞计数分析

第 5 周末, 移植了激活后 Müller 细胞的大鼠眼眶状面组织切片苏木精 - 伊红染色显示在同一张切片上, 移植部位 (缝线标记) 附近的视网膜感光细胞层可见 4 ~ 5 层细胞, 而其他部分的视网膜感光细胞层仅见一层细胞 (图 4A); 第 5 周末, 移植了未激活 Müller 细胞的鼠眼移植部位附近的视网膜感光细胞层可见 2 ~ 3 层细胞, 而同一切片其他部分的视网膜感光细胞层仅

见一层细胞 (图 4B); 第 5 周末, 注射 PBS 液的阴性对照眼视网膜感光细胞层仅见一层不连续的细胞分布 (图 4C)。各组处理眼与对照眼视网膜残留感光细胞数差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.4 Müller 细胞移植后各组 RCS 大鼠 F-ERG 的改变

细胞移植后各组大鼠眼的 F-ERG b 波波幅在第 1、3、5、7 周末比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 各组 F-ERG a 波波幅在第 1、5、7 周末比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 第 3 周末时移植激活后细胞和移植未激活细胞组 F-ERG a 波波幅差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5, 6)。

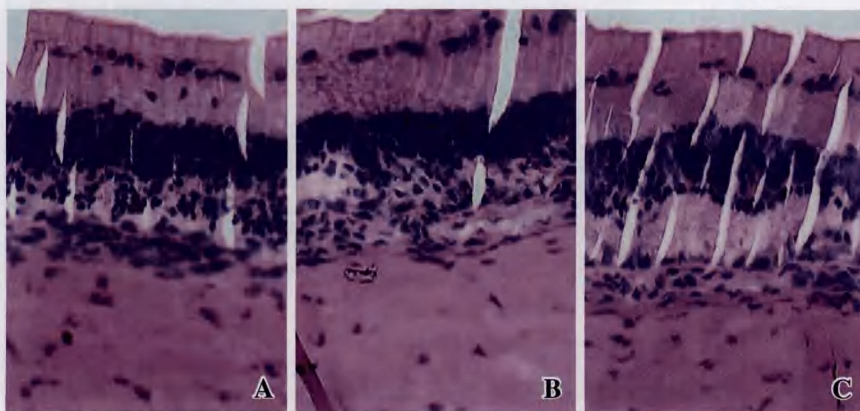


图 4 第 5 周末视网膜结构变化 A: 移植部位 (缝线标记) 附近的视网膜感光细胞层可见 4 ~ 5 层细胞, 而其他部分的视网膜感光细胞层仅见一层细胞 B: 移植了未激活 Müller 细胞的鼠眼移植部位附近的视网膜感光细胞层可见 2 ~ 3 层细胞 C: 注射 PBS 液的阴性对照眼视网膜感光细胞层仅见一层不连续的细胞分布

Fig. 4 At the end of 5th week, four to five layer of survival Müller cells were seen in the transplanted zone of activated Müller cell and only one layer in untransplantated zone under the light microscope(A). Two to three layers of survival Müller cells were seen in transplanted zone of inactivated Müller cell(B), and only a discontinuous layer of survival Müller cells was seen in the retina of negtive control eyes(C)

3 讨论

以视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 为代表的导致视网膜感光细胞受损的疾病是眼科常见的一组致盲性眼病, 至今尚无满意的治疗方法。光感受器细胞 (photoreceptor cells, PRCs) 的变性、死亡, 直至最后消失是该类疾病的主要病理学特征。

众所周知, 同角膜缘干细胞相似, 在成年脊椎动物的视网膜上也具有成体干细胞。这些细胞包括视网膜缘的干细胞、睫状体和虹膜的色素细胞、睫状体的非色素细胞和视网膜内的 Müller 细胞等^[3]。

表 1 细胞移植术后不同时间各组视网膜残留感光细胞计数(个/100 μm)

Table 1 The number of survival photoreceptors in different groups (cells/100 μm)

Transplanted time(week)	Group A		Group B		Group C	
	Active cells	PBS	Active cells	Inactive cells	Inactive cells	PBS
1	155 ± 1 ^c	112 ± 2	174 ± 1 ^c	150 ± 2	149 ± 1 ^c	118 ± 1
3	109 ± 2 ^c	76 ± 1	101 ± 1 ^c	79 ± 1	83 ± 1 ^c	69 ± 1
5	71 ± 1 ^c	33 ± 2	67 ± 1 ^c	44 ± 2	50 ± 1 ^c	24 ± 1
7	27 ± 1 ^c	11 ± 1	25 ± 1 ^c	14 ± 2	19 ± 2 ^c	12 ± 1

^c $P < 0.01$ vs respective control eyes (Student's *t* test)

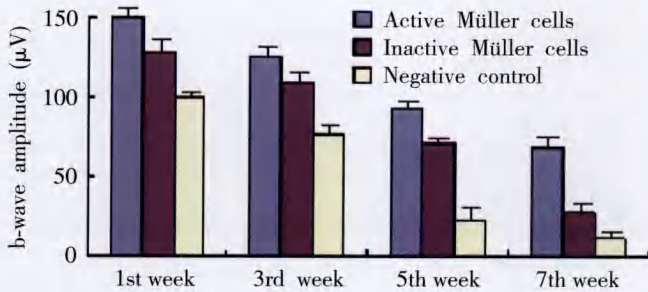


图 5 细胞移植后各组大鼠眼的 F-ERG b 波波幅在第 1、3、5、7 周末差异均有统计学意义 ($F_1 = 23\ 754.15$, $F_3 = 11\ 117.65$, $F_5 = 35\ 005.71$, $F_7 = 34\ 253.33$, $P < 0.01$)

Fig. 5 The amplitude of b-wave is significantly different among the active cells injection group, inactive cells injection group and negative control group at 1, 3, 5 and 7 weeks after injection ($F_1 = 23\ 754.15$, $F_3 = 11\ 117.65$, $F_5 = 35\ 005.71$, $F_7 = 34\ 253.33$, $P < 0.01$; intergroup comparison at various time points; $P < 0.05$) (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

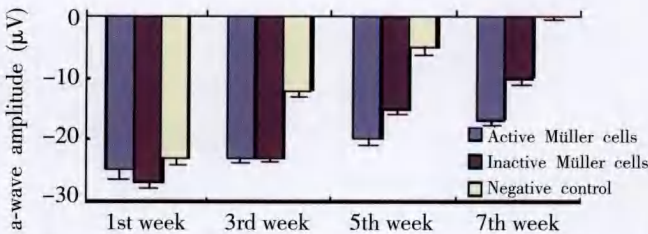


图 6 各组 F-ERG a 波波幅在第 1、5、7 周末差异均有统计学意义 ($F_1 = 172.71$, $F_3 = 1\ 056.59$, $F_5 = 1\ 377.05$, $F_7 = 4\ 778.18$, $P < 0.01$), 第 3 周末时移植激活后细胞和移植未激活细胞组 F-ERG a 波波幅差异无统计学意义 ($P > 0.05$)

Fig. 6 The a-wave amplitude of F-ERG shows a statistically significant difference among the active cells injection group, inactive cells injection group and negative control group at 1, 3, 5 and 7 weeks after injection ($F_1 = 172.71$, $F_3 = 1\ 056.59$, $F_5 = 1\ 377.05$, $F_7 = 4\ 778.18$, $P < 0.01$). The intergroup comparison at various time points; $P < 0.05$, but no significant difference was found between active cells transplanting group and inactive cells transplanting group in 3 weeks ($P > 0.05$) (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

本研究联合采用了 Ani 等^[1]的视网膜取材方法和苟琳等^[4]的恒温摇动法纯化培养细胞。流式细胞术分析结果显示,本研究培养的 Müller 细胞纯度可达 96% 以上。镜下形态学观察可见细胞污染主要为少量的小胶质细胞和极少量的星形胶质细胞,而这两种细

胞已经被证明在本实验刺激条件下不具有神经干细胞特性^[1]。

Fischer 等^[5]用 NMDA 活体刺激哺乳动物的视网膜,可以使视网膜 Müller 细胞大量增生。在此基础上, Ani 等^[1]利用神经毒素混合液(包含 NMDA、Kainate、FGF2 和胰岛素)成功启动正常哺乳动物中视网膜 Müller 细胞的神经干细胞特性。使其表达 Chx10、Pax6 和 Six、Nestin 等多种干细胞标记物^[6]。并通过诱导实验证明,所得 Müller 细胞可以被诱导培养为其他视网膜终末神经细胞。证实哺乳动物 Müller 细胞具有潜在的神经干细胞特性, Akira 等^[2]的研究也证明了该理论。本研究采用 Ani 等^[1]的方法刺激 Müller 细胞,用 Nestin (Nestin 是 VI 型中间丝蛋白,是目前最常用的神经干细胞标志物)的特异性抗体标记具有神经干细胞特性的 Müller 细胞。流式细胞术分析及细胞免疫荧光组织化学结果均证明我们成功激活了 Müller 细胞,并使其表达神经干细胞特性。

本研究所用的视网膜变性动物模型为 RCS 大鼠^[6],为研究视网膜移植研究的主要动物模型。RCS 大鼠视网膜的特征性变化是感光细胞凋亡和视网膜下特征色素小体的出现。为了尽量避免移植免疫排斥,我们选用与 RCS 大鼠同源的 VC 大鼠作为细胞供体, VC 大鼠和亲代 RCS 大鼠仅是在染色体上影响色素形成的某些位点有所不同。

RP 原发于视网膜感光细胞,而感光细胞是位于视网膜外层的细胞。我们采用视网膜下腔移植刺激后的 Müller 细胞,可以使移植细胞更直接的与病变部位的细胞形成突触联系,并且 Müller 细胞产生的可溶性因子能够更直接地对病变细胞起到滋养作用,促进变性细胞的功能恢复。同时,由于视网膜下腔的免疫赦免特性,可以最大限度地保证移植细胞的成活率。

本实验采用了外路法进行视网膜下腔移植。为了使尽可能多的移植细胞悬液能够准确地注入视网膜下腔,并尽量减小巩膜切口和视网膜解剖结构的破坏,我们采用自行拉制的毛细软管^[7]。经拉制后这种毛细管外径不到 0.1 mm,且材质柔软,可在视网膜下腔顺巩膜弧度潜行 3~4 mm,对视网膜物理损伤较小。经病理学切片证实,我们成功地将标记的移植细胞注入到视网膜下腔,同时宿主视网膜未见明显炎性细胞浸润及结构破坏。

为了研究 Müller 细胞的神经干细胞特性对视网膜感光细胞变性疾病的治疗作用,我们在第 1、3、5、7 周末取眼球行组织切片光镜观察视网膜结构变化,并计数残留感光细胞层细胞数。结果表明各组中处理眼

残留感光细胞数均高于对照眼,差异有统计学意义;光谱观察也显示各组中处理组视网膜中盘膜堆积厚度明显较对照组薄、外颗粒层较对照组厚。该结果同视功能的检查统计结果相一致。根据 A 组和 B 组所得数据,我们推论视网膜下腔移植具有神经干细胞特性的 Müller 细胞可以显著延缓视网膜变性动物的视网膜变性进程;且视网膜下腔移植正常的 Müller 细胞也具有延缓视网膜变性的作用,这可能归因于 Müller 细胞作为视网膜的主要神经胶质细胞能够分泌 bFGF、CNTF 和 TGF- α 等多种细胞因子^[8],并且已有实验证明这些细胞因子对 RP 具有一定的营养治疗作用^[9-10]。为了排除 Müller 细胞的营养作用,单一研究 Müller 细胞的神经干细胞特性对 RP 的作用,我们设立了 B 组。我们认为激活后 Müller 细胞的神经干细胞特性在对模型动物的 RP 的治疗中起到了至关重要的作用。

本实验采用 DAPI 标记和示踪移植细胞。虽然 DAPI 对活细胞无毒性,不改变细胞器的超微结构。但是其荧光强度随时间延长逐渐减弱,在第 2 周末前就几乎全部淬灭。所以,我们无法继续研究具有神经干细胞特性的 Müller 细胞在宿主视网膜中的融合状态和分化转归。但 B 组动物实验的结果显示,激活后 Müller 细胞的神经干细胞特性在对模型动物的 RP 的治疗中起到了至关重要的作用。推论移植的激活后 Müller 细胞极有可能已融合入病变视网膜各层并建立了突触联系,甚至部分细胞转分化为感光细胞等其他视网膜终末细胞。

Müller 细胞作为视网膜的一种终末细胞,其受刺激后转变为神经干细胞的特性可为进一步了解视网膜

成体干细胞的形成和转化条件提供一个经典的细胞模型。深入研究将能够为临床治疗视网膜变性性疾病提供一种新的治疗手段。

(志谢:感谢上海市第一人民医院吴晓平工程师为本研究提供视网膜电生理动物电极)

参考文献

- 1 Ani VD, Kavita BM, Zhao X, et al. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina; Regulation by Notch and Wnt signaling [J]. *Develop Biol*, 2006, 299: 283 - 302
- 2 Akira K, Kohji N, Kinichi N, et al. Conversion of mammalian Müller glial cells into a neuronal lineage by in vitro aggregate-culture [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 514 - 520
- 3 Fischer AJ. Neural regeneration in the chick retina [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2005, 24: 161 - 182
- 4 荀琳, 张作明, 许汉鹏, 等. 恒温摇动法纯化培养大鼠视网膜 Müller 细胞的技术研究 [J]. *眼科研究*, 2002, 20: 411 - 413
- 5 Fischer AJ, Reh TA. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina [J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4: 247 - 252
- 6 LaVail MM, Sidman RL, Gerhardt CO. Congenic strains of RCS rats with inherited retinal dystrophy [J]. *J Hered*, 1975, 66: 242 - 244
- 7 唐仕波, 罗燕, 李加青, 等. 经巩膜外路至视网膜下腔移植视网膜细胞的实验研究 [J]. *眼科研究*, 2003, 39: 610 - 615
- 8 Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, et al. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 4268 - 4274
- 9 MacDonald IM, Sauvè Y, Sieving PA. Preventing blindness in retinal disease; ciliary neurotrophic factor intraocular implants [J]. *Canada J Ophthalmol*, 2007, 42: 399 - 402
- 10 Lau D, McGee LH, Zhou S, et al. Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 3622 - 3633

(收稿:2008-10-06 修回:2009-02-20)

(本文编辑:王莉红)

读者·作者·编者

本刊对作者署名的要求

作者署名应符合 5 个条件:参与论证、参与研究、参与写作、能够答辩、承担责任。作者名次按对论文贡献的大小排序列于文题下方,并应在投稿时确定,在编排过程中不应再做变更或增减。有英文文题的论著和综述,应有作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。作者中如有外籍作者,应征得本人同意,并附外籍作者同意刊登的信件。文章如果在国外完成,应提供国外作者(单位)同意以国内作者为第一作者在国内发表的证明信。

本刊对图表的要求

表格采用三线表,表内容用英文;表题用中、英两种文字且中文在上,英文在下,分别用表 1、表 2 和 Table 1、Table 2 列于表上方;只有 1 个表格者标为表 1。照片少而精,可保留 4~6 幅。彩色、黑白均可,图像清晰,对比度好,尺寸一致,需说明的阳性指征应加箭头或字母,照片背面注明作者姓名、图序及上下方向。线条图和照片的图题和图说明用中英两种文字,用图 1、图 2 和 Fig. 1, Fig. 2 列于图下方,且中文在上,英文在下;只有一幅图者标为图 1。图中需要文字说明处用英文。

(本刊编辑部)