

视网膜色素上皮发育发生学的研究进展

张燕¹, 彭绍民²

作者单位:¹(022150)中国内蒙古自治区牙克石市,内蒙古林业总医院眼科;²(150000)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第二医院眼科

作者简介:张燕,博士,副主任医师,研究方向:玻璃体视网膜疾病。

通讯作者:彭绍民,博士,主任医师,研究方向:玻璃体视网膜疾病. psm06511@yahoo.com

收稿日期:2013-11-12 修回日期:2014-01-28

Recent advances of morphogenesis and development in retinal pigment epithelium

Yan Zhang¹, Shao-Min Peng²

¹Department of Ophthalmology, Inner Mongolia Forestry General Hospital, Yakeshi 022150, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, the 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical Hospital, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Shao-Min Peng, Department of Ophthalmology, the 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical Hospital, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China. psm06511@yahoo.com

Received:2013-11-12 Accepted:2014-01-28

Abstract

• The retinal pigment epithelium (RPE) is a pigmented simple cuboidal monolayer of epithelial cells that located between the photoreceptors in the neural retina and the Bruch's membrane in the vascular choroid and is critical for the survival and function of retinal photoreceptors. The pathogenesis of multiple congenital RPE diseases is closely related to embryonic development. This review summarized the current knowledge of the molecular mechanisms controlling early steps of RPE development, with emphasis on basic process, critical signaling molecules, key transcription factors and pathway maintaining the RPE cell fate.

• **KEYWORDS:** retinal pigment epithelium; development

Citation: Zhang Y, Peng SM. Recent advances of morphogenesis and development in retinal pigment epithelium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(3):464-467

摘要

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)为一单

层排列整齐的六角柱形细胞所组成,位于神经视网膜的光感受器和脉络膜的 Bruch's 膜之间,在维持光感受器细胞存活和正常功能方面起重要作用。多种先天性视网膜色素上皮疾病的发生与胚胎期的发育发生有着密切的关系。本文对 RPE 胚胎发育的基本过程、诱导 RPE 发生发育的信号分子、调控 RPE 发生发育的基因及维持 RPE 分化的信号通路等几个方面做一综述。

关键词: 视网膜色素上皮;发育

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.03.22

引用: 张燕,彭绍民. 视网膜色素上皮发育发生学的研究进展. 国际眼科杂志 2014;14(3):464-467

0 引言

近年来,随着分子生物学、遗传学向胚胎发育发生学领域的渗透,使传统的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)胚胎发育诱导调控机制得以进入到分子和基因水平,这为进一步研究与胚胎发育相关的各种先天性视网膜色素上皮疾病的发病机制、诱导干细胞向 RPE 的定向分化以及指导临床 RPE 细胞移植奠定坚实的理论依据。本文对近年来调控 RPE 细胞早期发育的分子机制的研究进展做一综述。

1 RPE 胚胎发育的基本过程

人眼在受孕后 18d 开始发育。胚胎 22d,由神经管发育而来的前脑两侧神经褶内陷,形成视沟。视沟继续深陷,向表面外胚叶接近,形成腔室,称为视泡。视泡远端不断膨大,继续向表面外胚层生长、贴近,进而发生内陷形成双层杯状结构,称为视杯。视杯分为两层,厚者为内层,发育成神经视网膜;外层为单层,发育成 RPE 层。两层的交界区为睫状体边缘带(ciliary marginal zone, CMZ),最终发育为睫状体和虹膜内面的上皮。同时,视杯近端与前脑连接处缩窄变细,形成视茎,为视神经始基。RPE 层在 30d 左右开始分化,胚胎 35d 就可见到 RPE 细胞内有色素颗粒,并在 1wk 内全部色素化。

在脊椎动物眼的胚胎发育过程中,视泡的远端/腹侧为假定的视网膜神经上皮层区域,而近端/背侧为假定的 RPE 层区域。研究表明,视泡阶段这两个区域具有双向发育潜能,或者发育成神经视网膜上皮层,或者发育成 RPE 层^[1,2]。RPE 前体细胞决定和细胞分化过程不是自发的,而受微环境中多种因素的影响,在细胞外信号的诱导下,通过细胞内转录因子和信号通路的调控,按照严格的时间和空间顺序分化产生的。

2 诱导 RPE 发生发育的信号分子

在胚眼的发育过程中,视泡的远端,也就是假定的视

网膜神经上皮区域,逐渐与表面外胚层相接触;视泡的背侧部分,即假定的 RPE 区域,与眼间充质相接触。此时细胞具有高度的可塑性,极易受周围环境因素的影响,在邻近组织提供的信号分子的诱导下,通过细胞的表面受体、细胞与细胞之间的相互作用,激活细胞内信号转导级联,作用于细胞核内转录因子,促使视泡背侧前体细胞产生向 RPE 细胞的分化倾向。

2.1 TGF β 家族成员 Activins 眼周围间充质促进 RPE 发育的直接证据来自于鸡胚的体外移植研究^[3]。移除鸡胚视泡周围间充质后,RPE 标志物在视泡的表达下调,神经视网膜标志物的表达上调。而 TGF β 家族成员 Activin A 可代替间充质的作用阻断这种改变的发生^[4]。同时,研究证实 Activins 及其特异性受体分别表达于眼间充质及视泡的相应部位。近来还有研究表明,Activins 还可以诱导体外培养的人胚胎干细胞转化成为 RPE 前体细胞^[5]。

Activin A 诱导靶基因的信号传导主要依靠下游的 Smad 蛋白^[6]。Activins 结合并活化 Activin 受体(Alks)后,可以招募并磷酸化 Receptor-regulated Smads (R-Smads): Smad2、Smad3。磷酸化的 R-Smads 又可以与 Common mediator Smad4 (Co-Smad) 结合成 R-Smads/Co-Smad 复合物,转运至细胞核,在细胞核内与其他转录因子一起调控靶基因从而发挥其生物学效应。

2.2 成纤维细胞生长因子 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)中 FGF1 和 FGF2 高表达于覆盖眼原基的表面外胚层,相应的受体位于视泡的假定视网膜神经上皮区域。移除鸡胚的表面外胚层(即主要的 FGFs 来源)后,视泡的假定视网膜神经区域的前体细胞向类 RPE 细胞转变;而加入外源性的 FGF1 或 FGF2 后可阻止这种转变的发生^[7]。反之,异位表达 FGF9 于小鼠的假定 RPE 区域会促使其增殖成为第二视网膜神经上皮^[8];而 FGF9 缺失的小鼠,RPE 将扩展至假定的视网膜神经上皮区域^[9]。这些研究结果提示 FGF 信号对视网膜神经上皮细胞的特化起促进作用,对 RPE 细胞的特化起抑制作用。

FGF 信号通过酪氨酸激酶型的 FGF 受体传导,可激活多种信号转导级联反应,包括 Raf-MEK-MAPK 通路。对假定的 RPE 区域表达激活的 Ras 或异位表达激活的 MEK-1 的等位基因,都可以诱导转基因鼠发生与 FGF 作用下相同的表型^[9]。由此推测 FGF 信号对 RPE 特化的抑制作用可能是通过 Ras-Raf-MEK-MAPK 通路介导的。

3 调控 RPE 发生发育的基因

脊椎动物早期视泡阶段的细胞在形态学和分子组成上无明显差别,且共同表达很多转录因子,如 Rx, Six3, Pax6, Lhx2 等。随着发育的进展,视泡的不同区域时空上序贯表达了许多重要的发育基因或蛋白,这些基因通过多重信息反馈、交互抑制、基因重叠以及分子网络多点连接等作用机制^[10],出现时空特异性的基因表达谱,实现了视泡的区域划分,从而调控多潜能的上皮向 RPE 组织的定向分化。目前证实为 RPE 特化所必需的基因主要

有三种。

3.1 小眼球相关转录因子 小眼球相关转录因子(microphthalmia transcription factor, MITF)是一种具有基本螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链结构的转录因子,在 RPE 细胞的发育、分化和功能调节中发挥关键性作用^[11,12]。MITF 通过与位于下游基因启动子区的、六聚体修饰的 CATGTG (M-box) 盒结合,活化下游基因黑色素合成酶 Tyrosinase (Tyr) 和 Tyrosinase-Related proteins TRP-1 和 TRP-2 的转录,从而启动黑色素的合成,决定 RPE 的分化命运^[11]。MITF 突出表达于 RPE,其突变会引起假定的 RPE 区域的过度增生及无色素,发育成为分层的、倒置的第二视网膜神经上皮层^[13]。RPE 的发育异常还会引起球壁扩张和胚裂闭合缺陷,导致小眼畸形的发生,同时由于视网膜仍然在小眼内正常增殖,从而形成多重皱襞,最终发生视网膜功能的退行性变。反之,过表达 MITF 于视网膜神经上皮会诱导色素沉着的表型发生^[14]。MITF 具有多种亚型,其中 A 和 J-MITF 存在于整个 RPE 的发育过程中,而 H 和 D-MITF 在 RPE 的发育过程中发挥着更为重要的作用^[11]。

3.2 Otx2 基因 Otx2 为 RPE 发育过程中另一重要的转录因子。在脊椎动物眼中,Otx2 最初表达于整个视泡,随着视杯的形成,表达局限于假定的 RPE 区域并维持至成年^[15]。Otx2 基因缺失的小鼠表现为 RPE 发育障碍,假定的 RPE 区域被视网膜神经上皮样组织所取代^[15]。过表达 Otx2 于鸟类的视网膜神经上皮前体细胞会诱导色素表型的发生^[14]。与 MITF 类似,Otx2 也包含特异性的结合位点 TAATCC/T,可以转激活黑色素生成基因 QNR71, Tyr, TRP-1 和 TRP-2^[16]。

Otx2^{-/-}突变鼠中,MITF 的表达与残存 Otx2 表达的部位相一致^[14];MITF 突变鼠中,Otx2 的表达缺失^[17]。由此提示,MITF 与 Otx2 的表达通过反馈环路的作用方式互为依赖。MITF 与 Otx2 共表达于 RPE 的细胞核,其相互的生物化学作用可以最大限度地激活黑色素生成基因的启动区^[14],单独表达 MITF 或 Otx2 都会影响 RPE 的正常发育。

3.3 Pax2 和 Pax6 基因 Pax 家族的共同特点为含有配对盒基元序列。在脊椎动物眼内,Pax2 主要表达于视泡的腹侧部分,其表达水平在假定的 RPE 与视神经区域形成明显的分界。Pax6 表达于整个视泡及视杯早期,视杯晚期在即将发育成 RPE 的区域表达缺失。

Pax6 突变的纯合子小鼠表现为无眼畸形。因此,对于 Pax6 在发育晚期的作用主要来自于野生型和 Pax6^{-/-}共建的嵌合体小鼠的研究。在这些鼠中,Pax6 缺陷的细胞有向 RPE 细胞发育的倾向,但分化水平(通过 Trp2 的表达水平及色素颗粒衡量)降低或延迟^[18]。因此,Pax6 的功能失活不会影响 RPE 细胞的分化方向,但会延迟其分化程度。

Pax2/Pax6 双基因缺失的小鼠,视泡小,不表达 MITF,RPE 转分化为视网膜神经上皮,而且视泡不能够内陷形成视杯。单纯 Pax2^{-/-}或 Pax6^{-/-}突变鼠的 MITF 表达正常;而 Pax2^{-/-},Pax6^{+/-}突变鼠则表现为中间型表型,

即 MITF 表达下调及 RPE 的改变。基于以上观察, Bäumer 等^[16]认为 Pax2 和 Pax6 基因之间的重叠作用在 RPE 细胞的命运决定中起重要作用。Pax2 和 Pax6 通过相同的结合位点激活 MITF-A 的启动区,也证明了上述观点^[16]。

Pax2 和 Pax6 之间为直接的交互抑制作用,Pax6 突变的小鼠中 Pax2 的表达区域扩大,反之亦然^[19]。在 Otx 表达缺失的胚眼,即便上调 Pax2 和 Pax6 的表达,仍无 MITF 的表达伴 RPE 细胞发育缺陷,提示这两种基因的联合作用不足以启动 RPE 细胞的发育^[15]。

这三种主要调控基因作用过程可以简单描述如下: RPE 的特化在 Otx1/Otx2 和 Pax6 的联合作用下启动, Pax6 联合 Wnt 信号开启了 MITF 的表达,MITF 又与 Otx 蛋白协同作用启动了 RPE 的分化过程,此时 Pax6 在 RPE 的表达下调^[20]。

4 维持 RPE 分化的信号通路

在开启 RPE 细胞分化过程的初期,RPE 细胞的命运是可逆的,如外源性的给予 FGF,可诱导 RPE 细胞过度增殖并转分化为视网膜。因此,在 RPE 细胞的发育过程中,还涉及一系列维持 RPE 分化状态的细胞因子及通路。

4.1 sonic hedgehog 信号通路 sonic hedgehog (SHH) 信号通路是维持视杯腹侧 RPE 细胞的分化命运所必须的。在鸡和鼠的胚眼中,阻断 SHH 信号不会影响 RPE 初期的特化,但会在接下来的分化过程中造成 RPE 细胞标志物的表达下调,细胞增殖并转分化为视网膜^[21]。Gas1 一种磷脂酰肌醇锚定的细胞表面受体,可与 SHH 相结合并对 SHH 信号起阳性的调节作用。干扰 Gas1 引起的 RPE 发育缺陷类似于 SHH 信号的破坏,如:异位增生及转分化为视网膜。Gas1 突变体中^[22],视泡阶段 RPE 的特化过程正常,但视杯阶段腹侧 RPE 细胞增殖减慢的过程受阻,导致细胞过度增殖,从而转分化为视网膜。因此, Gas1 对于下调腹侧 RPE 细胞的增殖是必须的。而 Gas1 突变体的背侧 RPE 并未受到影响,提示 RPE 细胞背侧和腹侧分化的机制是不同的。

4.2 骨形态生成蛋白信号通路 研究证实,骨形态生成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMP) 信号通路在视杯阶段腹侧 RPE 细胞的分化过程中起重要作用。过度表达 BMP 拮抗剂 Noggi 会引起视杯腹侧 RPE 细胞标志物的表达下调,代之以具有视茎特征的细胞^[23]。目前对于 BMP 信号通路在视泡阶段的作用仍存在争议。Müller 在对鸡胚的研究中发现,将 BMPs 表达于靠近视泡的表面外胚层会诱导 MITF 的异位表达,而阻断视泡期的 BMP 信号会抑制 RPE 的发育并诱导神经视网膜特异性基因的表达。由此推断 BMP 对视泡期 RPE 的分化命运有诱导作用^[23]。但还有研究显示 BMP 可诱导视泡期 RPE 细胞的凋亡,从而干扰视杯的形态发生^[24]。

4.3 Wnt/ β -catenin 信号通路 近年来的研究证实 Wnt/ β -catenin 通路可以调控视杯期 RPE 细胞的分化状态。Wnt/ β -catenin 通路的激活会增加 β -catenin 胞质的稳定性,进一步激活 TCF/LEF 转录因子。在斑马鱼、鸡和鼠

的 RPE 细胞的发育过程中,均观察到 TCF/LEF 转录因子呈激活状态,且通路中涉及的成分也表达于 RPE。干扰鸡和鼠视杯阶段 RPE 细胞的 Wnt/ β -catenin 信号,会导致 TCF/LEF 转录因子失活,发生严重的发育缺陷如小眼畸形及 RPE 转分化为视网膜^[2,25]。

应用染色质免疫沉淀和反式激活分析揭示 β -catenin/TCF/LEF 复合体可以结合并激活 MITF 和 Otx2 的增强子,从而调节其在 RPE 的表达^[2,25]。另有研究证实 β -catenin/TCF/LEF 复合体还可以直接调节甾体类/甲状腺素受体超家族成员 COUPTFI 和 COUPTFII^[24]。COUPTFI/II 双突变的小鼠在视杯期表现为严重的发育缺陷,包括 RPE 转分化为视网膜。COUPTFs 可直接调节 Otx2 的表达^[26]。

在假定的视网膜区域异位激活 Wnt/ β -catenin 通路不足以诱导 RPE 细胞的分化命运。但同时过表达 Wnt/ β -catenin 信号和 Otx2 可促进 MITF 表达于发育中的鸡胚的视网膜^[25]。因此,Otx2 可能作为一种必不可少的辅因子参与 RPE 对 Wnt/ β -catenin 信号的应答。

5 小结

RPE 来源于神经外胚层,与视网膜神经上皮具有相同的前体细胞,在一系列信号传导级联反应和转录因子的调控下,逐渐完成了 RPE 细胞的区域划分和表型特化。RPE 的发育涉及一个复杂的转录因子调控网络,我们对其具体机制的理解才刚刚开始。人胚胎干细胞具有多向分化潜能,可以进行发育上的重演,是进行胚眼发育研究的新方法。结合模式生物研究结果,通过诱导或抑制特定基因的表达来促使人胚胎干细胞向特定表型分化,可以进一步明确人眼 RPE 的发生及调控过程。

参考文献

- 1 Bharti K, Liu W, Csermely T, et al. Alternative promoter use in eye development: the complex role and regulation of the transcription factor MITF. *Development* 2008;135(6):1169-1178
- 2 Westenskow PD, McKean JB, Kubo F, et al. Ectopic Mitf in the embryonic chick retina by co-transfection of β -catenin and Otx2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(10):5328-5335
- 3 Fuhrmann S, Levine EM, Reh TA. Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* 2000;127(21):4599-4609
- 4 Sakami S, Etter P, Reh TA. Activin signaling limits the competence for retinal regeneration from the pigmented epithelium. *Mech Dev* 2008;125(1-2):106-116
- 5 Gong J, Sagiv O, Cai H, et al. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res* 2008;86(6):957-965
- 6 Eivers E, Demagry H, De Robertis EM. Integration of BMP and Wnt signaling via vertebrate Smad1/5/8 and Drosophila Mad. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20(5-6):357-365
- 7 Nguyen M, Arnheiter H. Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development* 2000;127(16):3581-3591
- 8 Zhao S, Overbeek PA. Tyrosinase-related protein 2 promoter targets transgene expression to ocular and neural crest-derived tissues. *Dev Biol* 1999;216(1):154-163

9 Zhao S, Hung FC, Colvin JS, *et al.* Patterning the optic neuroepithelium by FGF signaling and Ras activation. *Development* 2001;128(24):5051–5060

10 Whitacre JM. Biological robustness: paradigms, mechanisms, and systems principles. *Front Genet* 2012;3:67

11 Craw J. Eye development. *Curr Top Dev Biol* 2010; 90:343–386

12 Tsukiji N, Nishihara D, Yajima I, *et al.* Mitf functions as an in ovo regulator for cell differentiation and proliferation during development of the chick RPE. *Dev Biol* 2009;326(2):335–346

13 Bumsted KM, Barnstable CJ. Dorsal retinal pigment epithelium differentiates as neural retina in the microphthalmia (mi/mi) mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):903–908

14 Martínez-Morales JR, Dolez V, Rodrigo I, *et al.* OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J Biol Chem* 2003;278(24):21721–21731

15 Martínez-Morales JR, Signore M, Acampora D, *et al.* Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 2001;128(11):2019–2030

16 Bäumer N, Marquardt T, Stoykova A, *et al.* Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Development* 2003;130(13):2903–2915

17 Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, *et al.* Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 2003;130(21):5155–5167

18 Li S, Goldowitz D, Swanson DJ. The requirement of pax6 for postnatal eye development: evidence from experimental mouse chimeras. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(7):3292–3300

19 Schwarz M, Ceccconi F, Bernier G, *et al.* Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* 2000;127(20):4325–4334

20 Bharti K, Gasper M, Ou J, *et al.* A regulatory loop involving PAX6, MITF, and WNT signaling controls retinal pigment epithelium development. *PLoS Genet* 2012;8(7):1–17

21 Zhang XM, Yang XJ. Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. *Dev Biol* 2001;233(2):271–290

22 Martinelli DC, Fan CM. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev* 2007;21(10):1231–1243

23 Zhao L, Saitsu H, Sun X, *et al.* Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. *Mech Dev* 2010;127(1–2):62–72

24 Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* 2010;93:61–84

25 Fujimura N, Taketo MM, Mori M, *et al.* Spatial and temporal regulation of Wnt/ β -catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium. *Dev Biol* 2009;334(1):31–45

26 Tang K, Xie X, Park JI, *et al.* COUP – TFs regulate eye development by controlling factors essential for optic vesicle morphogenesis. *Development* 2010;137(5):725–734