

DOI: 10.13376/j.cbbs/2014042

文章编号: 1004-0374(2014)03-0287-08

· 评述与综述 ·

调控Muller细胞去分化为视网膜前体细胞的信号通路

陶 醉, 李瑶琛*, 阴正勤*

(第三军医大学西南眼科医院, 视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室, 重庆 400038)

摘 要: 在视网膜中, Muller 细胞被视为具有干细胞特性及再生修复能力, 刺激内源性干细胞活化增殖并向视网膜前体细胞去分化, 或许是治疗视网膜疾病的重要策略之一。然而, 在高等哺乳动物视网膜中, Muller 细胞自发去分化的能力极为有限。近年来研究发现, 某些生长因子、转录因子及细胞外基质能通过一系列信号通路促进视网膜 Muller 细胞的去分化及再生修复。阐明这些信号通路的调控机制将对利用内源性干细胞治疗视网膜疾病有极大的帮助。

关键词: Muller 细胞; 去分化; 视网膜前体细胞; 信号通路

中图分类号: R774 **文献标志码:** A

The signaling pathways regulating Muller cells to dedifferentiate into the retinal progenitor cells

TAO Zui, LI Yao-Chen*, YIN Zheng-Qin*

(Southwest Hospital, Southwest Eye Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: In the retina, Muller cells are considered to have stem cell properties and regenerative ability. Stimulating the endogenous stem cells to proliferate and dedifferentiate into retinal progenitor cells may be one of the important strategies for the treatment of retinal diseases. In the retina of higher mammals, however, the spontaneous dedifferentiation ability of Muller cells is very limited. In recent years, studies have found that some growth factors, transcription factors, extracellular matrix can promote the dedifferentiation and regeneration ability of Muller cells through a series of signaling pathways. Ascertaining these regulatory mechanisms of signaling pathways will be a great help to utilize the endogenous stem cells to treat retinal diseases.

Key words: Muller cells; dedifferentiation; retinal progenitor cells; signaling pathways

Muller 细胞 (Muller glia) 是视网膜中主要的神经胶质细胞, 在脊椎动物视网膜中, 占细胞总数 90% 以上, 其细胞核位于内核层, 呈双极性, 向内、外侧发出放射状突起, 分布于视网膜全层, 具有结构支持、维持渗透压稳定、参与神经元营养运输和代谢、调节血-视网膜屏障等重要作用^[1]。近 10 年来研究表明, Muller 细胞在形态和功能上均表现有视网膜祖细胞特性的潜能^[2-6]。在一些低等的脊椎动物, 如鱼类当中^[7-9], 当视网膜受到损伤后, Muller 细胞能重新进入细胞周期和去分化增殖, 并横向分化为视网膜神经元, 对损伤的视网膜进行再生修复, 使其视功能得到完全的恢复。在鸡类视网膜中^[10-13], Muller 细胞也能在视网膜损伤后去分化,

但其增殖能力相对有限, 在外源性生长因子的刺激下可以提高其增殖能力, 并向神经元方向再分化。因此, Muller 细胞被认为是一种视网膜内源性干细胞, 其激活能促进视网膜组织的原位再生修复。因此, 有效活化视网膜内源性干细胞无疑是视网膜再生修复的重要途径之一, 并且避免了外源性干细胞移植的细胞来源、免疫排斥等问题。然而, 在哺乳

收稿日期: 2013-08-12; 修回日期: 2013-10-17

基金项目: 国家自然科学基金重大国际(地区)合作研究项目(非组织间协议项目)(30910103913); 国家自然科学基金面上项目(81271021)

*通信作者: 阴正勤, E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn;
李瑶琛, E-mail: yaocli@yahoo.com

动物中^[3-4,14-15], 视网膜损伤后, 激活 Muller 细胞增殖和去分化更加困难, 所得去分化的 Muller 细胞数目也是非常有限的, 之后 Muller 细胞很快形成胶质瘢痕, 进一步加速病变发展。怎样启动 Muller 细胞去分化为视网膜前体细胞, 获得可观的数量, 并且再分化为神经元以修复受损的视网膜, 是目前研究的热点。以往研究表明, 生长因子、转录因子、细胞外基质等通过一些重要的信号通路, 如 MAPK、Notch、Wnt、Shh 等调控 Muller 细胞的去分化与增殖, 极大地促进视网膜 Muller 细胞的去分化及再生修复能力, 本文将对这些信号通路进行分类综述。

1 MAPK信号通路

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是存在于所有真核细胞内的一类丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, MAPK 通路是细胞外信号转导至细胞内的主要途径^[16-17]。目前认为 MAPK 通路可以被机械刺激、细胞因子、生长因子、神经递质、激素等外源刺激信号激活。在受到刺激后, MAPK 的苏氨酸和酪氨酸残基被磷酸化, 激活它们内在的激酶活性, 启动一系列的细胞内信号通路, 将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内, 并引起细胞增殖、分化、转化及凋亡等细胞生物学反应。MAPKs 家族有 5 大类成员: (1) 细胞外信号调节激酶 (extra-cellular signal regulated kinase, ERK)1/2; (2) c-Jun 氨基端激酶 (JNK)/ 应激激活蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK); (3) p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase); (4) ERK5 /BMK1 (bigMAP kinase1); (5) ERK3/4。其中研究得比较广泛的是 ERK1/2、JNK 和 p38 MAPK。生长因子和细胞外的有丝分裂原信号能激活 ERK1/2, 可促进细胞增殖和阻止细胞死亡。而 p38 MAPK 和 JNK 被称为压力激活激酶, 可促进炎症的发展, 在特定条件下能启动细胞的程序化死亡。

1.1 FGF/MAPK

2009 年, Fischer 等^[18]研究了鸡急性损伤视网膜中 MAPK 通路对 Muller 细胞活化的调节作用。他们发现, 正常情况下 Egr1 (early growth response 1) 和 pCREB 通常在睫状边缘带中具有视网膜前体特性的细胞中表达; 而在急性视网膜损伤应答中, Muller 细胞堆积 pERK1/2 和 pCREB, 并且短暂表达 MAPK 的下游基因, 即刻早期基因 *cFos* 和 *Egr1*, 这说明损伤应答中的 Muller 细胞也具有一定的前体细胞特性。此外, 丝裂原细胞外激酶 (mitogen

extracellular kinase, MEK) 的小分子抑制剂 (UO126) 和 FGF 受体抑制剂 (SU5402) 能抑制去分化的 Muller 增殖, 并且抑制了去分化的 Muller 细胞内 Egr1 和 pCREB 的聚集, 而 cFos 的水平不受影响, 提示 Egr1 和 pCREB 是 Muller 细胞去分化 / 增殖信号级联的一部分, 并由 FGF 受体和 ERK1/2 活化。

2002 年, Fischer 等^[11]的研究就证实了在非损伤条件下, 胰岛素和 FGF2 能协同作用, 使鸡视网膜 Muller 细胞在体外具有更好的增殖、去分化能力。2009 年, 他们接着对体内正常视网膜中胰岛素和 FGF2 是怎样刺激 Muller 的去分化和增殖进行了进一步探索^[12]。通过在鸡眼球内注射胰岛素和 FGF2, 发现可以引起 ERK1/2、p38 MAPK 和 CREB 的磷酸化, 并且表达即刻早期基因 *cFos* 和 *Egr1*, 但这些分子在 Muller 细胞中的聚集是有限的, 因此, 视网膜不会有新的神经元生成。该研究进一步发现在视网膜兴奋性毒素损伤应答中, FGF2 和胰岛素对 Muller 细胞的影响是不同的。FGF2 能增强损伤视网膜中 Muller 细胞对神经元的保护作用, 使死亡的神经元数量减少, 而胰岛素却会增加神经元死亡数量。此外, 视网膜损伤后 FGF2 能促进 Muller 细胞增殖, 而胰岛素对胶质细胞增殖没有明显影响, 提示在损伤视网膜中 MAPK 信号通过 FGF 刺激 Muller 细胞具有更强的神经保护作用, 并且变得更前体细胞化, 而胰岛素对 Muller 却有相反的效应。

近两年来, 其他研究者也对 MAPK 信号通路促进 Muller 细胞去分化增殖做了进一步研究。Singhal 等^[19]在体外用 FGF2 在 Notch 通路抑制的条件下成功刺激人 Muller 细胞分化为神经节细胞前体, 说明在哺乳动物中, FGF2/MAPK 通路仍然是 Muller 细胞获得前体细胞特性的重要条件。

1.2 HB-EGF/MAPK和EGF/MAPK

Wan 等^[20]在斑马鱼损伤的视网膜中发现 Muller 细胞中肝素结合表皮样生长因子 (heparin-binding epidermal-like growth factor, HB-EGF) 表达量迅速增加, 并且通过表皮生长因子受体 / 丝裂原活化蛋白激酶 (EGFR/MAPK) 信号转导级联调节再生相关基因的表达, 如 *Ascl1a* 和 *Pax6b*, 也进一步诱导影响前体细胞增殖的重要分子的表达, 如 Notch 和 Wnt/ β -catenin, 最终导致 Muller 细胞的去分化与增殖。Ueki 和 Reh^[21]则对 EGF 促进 Muller 细胞分裂增殖的信号通路进行了探索, 发现 EGF 诱导 Muller 细胞增殖需要 MEK/ERK1/2 和 PI3K/AKT 信号通路, 并且 PI3K/AKT 信号的下游 BMP/Smad1/5/8 活化

也是 Muller 细胞增殖必需的, 还证明了 BMP/Smad1/5/8 的活化至少部分是由 Muller 细胞自身内分泌机制介导的。上述研究表明, HB-EGF/MAPK 和 EGF/MAPK 信号通路也是 Muller 细胞去分化增殖的重要机制之一。

2 Notch信号通路

Notch 基因是由于其功能缺失会造成果蝇翅膀边缘形成缺刻而命名, Notch 信号通路广泛表达于各种生物体内, 是细胞间一条保守的信号转导途径, 通过相邻细胞间 Notch 受体与配体的结合, 在组织器官发育早期, 尤其在神经系统中, 对细胞生长、分化起着重要调控作用^[22-23]。在脊椎动物中, Notch 受体由 Notch 1~4 组成, 配体由 Jagged 1, 2 和 Delta 1, 2, 3 组成^[24-25]。受体与其配体结合后, Notch 在 γ -分泌酶作用下发生酶解, 向细胞内释放 NICD(intracellular domain of notch), 并与相应的 DNA 结合蛋白结合, 刺激其下游区域的靶基因组织特异性碱性螺旋-环-螺旋(bHLH) 基因家族, 如 HES 的表达, 该基因可以促进细胞增殖, 抑制细胞分化。

Notch 信号通路在视网膜发育早期能够使前体细胞维持在一个不分化的状态^[26-27], 而在视网膜发育晚期促进了胶质分化^[28]。对鱼视网膜的研究表明, 在急性损伤应答中, Notch 和 Notch 相关基因在增殖/去分化的 Muller 细胞中上调^[29-30]。随后 Hayes 等^[13]报道, 在鸡急性视网膜损伤中, Notch 信号在去分化的 Muller 细胞中表达上调, 并且发现在损伤视网膜 Muller 细胞刚开始去分化时, 用小分子抑制剂 DAPT 抑制 Notch 信号会使去分化的 Muller 细胞增殖数量减少, 而对已经去分化的 Muller 细胞抑制 Notch 信号时, 则会引起新生神经元的比例明显增高。这表明, Notch 信号在视网膜再生中起到两种不同的作用: Notch 活化能促进 Muller 去分化为前体细胞及增殖; 而对增殖的 Muller 细胞来说, Notch 活化则会抑制去分化的 Muller 细胞向神经元分化。

Ghai 等^[31]研究了 Notch 信号在正常视网膜和生长因子刺激的环境中是否会影响 Muller 细胞去分化。他们发现 Notch1 及其信号通路成员在正常视网膜 Muller 细胞中表达水平很低, 并且在视网膜周边区域表达比中央高, 这个发现与 Fischer 和 Reh^[32]报道的视网膜周边区域的 Muller 细胞具有更强的前体细胞特性及可塑性相一致。在正常视网膜中, 经

胰岛素和 FGF2 处理的 Muller 细胞中 Notch 信号上调, 促进其增殖和去分化。抑制 Notch 会减少 FGF2/MAPK 信号通路下游的 p38 MAPK 和 pCREB 的信号水平, 并且会进一步减少 Notch 信号的表达, 从而阻碍 FGF2 介导的 Muller 细胞增殖。这说明 FGF2/MAPK 诱导的 Muller 细胞增殖需要 Notch 信号的参与。

3 Wnt信号通路

Wnt 家族是一类分泌型糖蛋白, 富含半胱氨酸保守序列, 广泛存在于各种生物体中, 对胚胎发育、细胞增殖分化及迁移等有重要作用^[33]。Wnt 信号通路包括经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路和非经典的平面细胞极性通路(Wnt/PCP 通路)及 Wnt/ Ca^{2+} 通路^[34]。经典 Wnt 信号通路由 Wnt 蛋白、跨膜受体、胞质蛋白、核内转录因子及下游靶基因组成。当 Wnt 与跨膜受体卷曲蛋白(Frizzled, FZL) 结合后可活化胞内散乱蛋白(disheveled, DVL), 随后 β -catenin 从轴蛋白(axin)、结肠腺瘤样息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 组成的降解复合物中分离、去磷酸化并在胞质内积累并转入核内, 与 T 细胞转录因子/淋巴样增强因子(T cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF) 结合, 从而调节下游靶基因如 c-myc 的表达。

近年来的研究发现, Wnt 信号途径能够明显促进多种干细胞的增殖和分化^[35]; 另一方面, 许多生物的视网膜中都表达经典 Wnt 信号通路中的受体、配体以及下游靶分子^[36-37], 提示 Wnt 信号通路很可能对维持视网膜干细胞特性起到关键作用。

Meyers 等^[38]在幼年斑马鱼视网膜光损伤模型中观察到, 去磷酸化的 β -catenin 在重新进入细胞周期的 Muller 细胞中聚集, 而在仍处于静止期的 Muller 细胞中不表达; 还发现当 Wnt 信号过表达时, 内核层的 Muller 细胞消失, 同时所有增殖的细胞迁移到外核层, 说明 β -catenin/Wnt 信号转导途径对 Muller 细胞去分化增殖有非常重要的作用。进一步的研究表明, 在斑马鱼正常视网膜和小鼠光损伤视网膜中, 通过抑制 Wnt 信号的负向调节因子 GSK-3 β ^[39] 和 Axin2^[40-41] 使 Wnt 信号表达显著增强, 从而充分刺激 Muller 细胞增殖并且表达视网膜前体细胞标志物, 如 Nestin、Pax6, 甚至还能表达视杆细胞标志 rhodopsin。Del Debbio 等^[40]的研究也表明 Notch 和 Wnt 信号可激活一部分活化的 Muller 细胞

迁移到外核层沿视杆细胞谱系分化。这些研究说明在视网膜中, Wnt 信号短暂的放大可能会解锁潜在的视网膜神经组织再生能力, 对视网膜再生有重大意义。

此外, Besser 等^[42]对细胞外基质分子 Tnc (Tenascin C) 在维持视网膜前体细胞环境中的功能进行了研究, 发现 Tnc 缺失能影响 Muller 细胞去分化的行为, 并且是通过 Wnt 信号级联调控的, 提示细胞外环境的变化可以刺激 Wnt 信号介导的 Muller 细胞去分化和增殖。

4 Shh信号通路

Hedgehog(Hh) 基因^[43]是 Nüsslein-Volhard 和 Wieschaus 在研究果蝇的基因突变时发现的, 该基因编码一种高度保守的分泌型糖蛋白。在脊椎动物中 Hh 基因有 3 种, 分别为 desert hedgehog (Dhh)、indian hedgehog (Ihh) 和 sonic hedgehog(Shh), 其中对 Shh 研究最深入。Shh 信号通路在胚胎发育, 尤其是在神经系统发育中发挥着重要作用^[44]。Shh 信号通路主要由分泌型糖蛋白 Shh、细胞跨膜蛋白 Patched (Ptch)、细胞跨膜蛋白 Smoothed (Smo) 和 Smo 的下游锌指家族转录因子 Gli 组成。Ptch 蛋白是 Shh 的受体, 当 Shh 缺乏时, Ptch 与 Smo 结合, 抑制其活性; 当 Shh 存在时, Ptch 与 Shh 结合, 释放 Smo, Smo 进入细胞内, 激活 Gli 及相关靶基因^[45]。

以往研究表明, Shh 能促进神经干细胞/前体细胞增殖^[46-48], 维持神经干细胞生存。近年来还发现, 在胚胎鸡损伤视网膜中, Shh 通路能激活视网膜睫状边缘带的干细胞, 使损伤区域完全修复^[49-50]。在小鼠损伤的视网膜中, Shh 通路也参与了修复过程^[51], 可见对于哺乳动物, Shh 通路对视网膜再生也发挥了一定作用。

Wan 等^[52]在大鼠视网膜中检测到 Shh 能与表达在 Muller 细胞上的受体结合, 作用于其下游靶基因, 从而刺激 Muller 细胞增殖, 并能诱导 Muller 细胞去分化为视网膜前体细胞和向视杆细胞方向再分化。抑制 Shh 则会抑制 Muller 细胞的增殖和去分化。在感光细胞损伤的眼球内注射 Shh 可刺激 Muller 细胞活化, 还能增强神经发生潜能, 使去分化的 Muller 细胞生成视紫质阳性的感光细胞。他们的研究提示 Shh 信号通路能激活 Muller 细胞的干细胞潜能, 可能对促进视网膜再生有治疗意义。

另外, Dyer 和 Cepko^[53]认为 Muller 细胞在损伤或外源性生长因子、细胞因子、转录因子的诱导

下能进入细胞周期, 启动去分化增殖的一个重要分子事件和本质上的调节是一种细胞周期蛋白依赖激酶抑制子 p27kip1 表达的减少, 其表达量在正常视网膜的 Muller 细胞里非常高。当 Notch/Wnt/FGF/Shh 信号通路在视网膜损伤应答中短暂激活后, p27kip1 的表达可能被抑制^[54], 促进 Muller 细胞进行分裂并形成中间前体细胞 (intermediate progenitor cells, IPCs), 这些 IPCs 能表达视网膜前体细胞标志 Pax6、Chx10 等^[29,55], 并且从内核层迁移到损伤部位。

5 Ascl1a信号通路

碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 家族是一类转录调节因子, 几乎存在于所有的真核生物中, 包括抑制型和激活型两种, 对胚胎发育尤其是神经系统发育起到重要调节作用^[56]。在视网膜中, 抑制型 bHLH 转录因子 (如 Hes1、Hes5) 具有维持胚胎期视网膜干细胞状态和促进出生后视网膜胶质细胞分化的功能; 而活化型 bHLH 转录因子 (如 Mash1、Math5、NeuroD 等) 能促进神经元细胞的分化^[57]。近年来, bHLH 家族中的另一成员 ascl1a (achaete-scute complex-like 1a) 引起人们关注, 它被认为与神经元发生^[58]以及神经内分泌系统发育^[59]密切相关。

5.1 Ascl1a/Lin28/MicroRNA let-7信号通路

以往研究表明, microRNA (miRNA) 在干细胞分化和维持干细胞特性的过程中起到至关重要的作用^[60]。MicroRNA let-7 家族是一类具有高保守性、时序性、组织细胞特异性的 miRNA, 在人类中, let-7 家族有 10 个成员, 由 13 个前体 let-7 序列 (pre-let-7) 加工而成^[61]。Let-7 作用靶点包括癌基因、细胞周期因子等, 如 Ras、ERK、HMGA2 和 cyclinD1^[62-63], 具有抑癌、促分化等作用。

Lin28 是一种 RNA 结合蛋白, 在脊椎动物中, 表达在早期胚胎发育和各种组织的组织发生中, 包括中枢神经系统^[64]。研究表明, Lin28 可能在调节神经胶质发生中起到重要作用。Lin28 在早期视网膜前体中高表达, 这些细胞优先形成神经元; Lin28 在晚期视网膜前体中低表达, 这些细胞形成 Muller 细胞。

Ramachandran 等^[65]研究发现, 在斑马鱼损伤的视网膜中, Ascl1a 和 lin28 在损伤后 6 h 内在 Muller 细胞中聚集, 并且 Ascl1a 表达是 lin28 表达的必要条件, 过表达的 lin28 会抑制 let-7 的促分化作用, 从而促进 Muller 细胞增殖和去分化为视网膜

前体细胞, 参与视网膜再生修复。Lin28 和 let-7 在 Muller 细胞分化和去分化中的相反作用与在胚胎干细胞中的表现非常类似^[66]。Lin28 对 let-7 的抑制主要发生在转录后水平, lin28 与初级 let-7 序列 (pri-let-7) 的茎环结构结合, 形成空间位阻效应, 使 Drosha 酶不能与 pri-let-7 结合, 阻止 pri-let-7 加工形成前体 let-7 序列 (pre-let-7), let-7 成熟过程受到抑制^[67]。Lin28 也能与 pre-let-7 的茎环结构结合, 影响 Dicer 酶对 per-let-7 的切割, 同样抑制了 let-7 成熟。Ascl1a 则通过促进 lin28 的表达来影响 let-7 的表达量, 促进 Muller 细胞去分化。

5.2 其他Ascl1a信号通路

Fausett 等^[68]在斑马鱼中发现, 视网膜损伤 4 h 内, Ascl1a 在 Muller 细胞中表达, 通过与位于多能性 $\alpha 1$ 微管蛋白 (multipotent alpha1-tubulin, alpha1T) 基因启动子 954 位点的 E-box (CATGTG) 结合, 诱导 Muller 细胞表达 alpha1T 和 Pax6, 进而促进 Muller 细胞增殖和视网膜再生。

Ramachandran 等^[39]则在损伤的斑马鱼视网膜中检测到 Ascl1a 的表达抑制了 Wnt 信号的阴性调节因子 Dickkopf (DKK) 的水平, 并且诱导了 Wnt4a 的表达, 同样促进了 Muller 细胞增殖和去分化。Ramachandran 等^[69]认为转录抑制可能是损伤刺激斑马鱼视网膜 Muller 细胞重编程的潜在原因, 于是比较了 Muller 细胞和去分化的 Muller 细胞转录组, 发现抑制物 insm1a (insulinoma-associated 1a) 刺激了 Ascl1a 的表达和对 DKK 的抑制。上述研究表明 Ascl1a 上调是鱼视网膜静止期 Muller 转变为活化的视网膜前体细胞的必要条件, 在视网膜再生中起到重要作用。

Powell 等^[70]探索了 DNA 甲基化与视网膜再生的关系, 发现两个胞苷脱氨酶 Apobec2a 和 Apobec2b 在非损伤视网膜中有基本表达, 并且在增殖、去分化的 Muller 细胞中被诱导表达上调。进一步发现 Apobec2b 达到最大表达量需要 Ascl1a 参与, 而当 Apobec2a 或 Apobec2b 被抑制后, 也抑制了 Ascl1a 的表达, 且 Muller 细胞增殖反应会明显减少, 提示 Apobec 蛋白与 Ascl1a 之间存在反馈性调节环路, 这些过程是 lin28/let-7 非依赖的, 因此, 定义了一个新的起源于 Ascl1a 的独立信号通路。

6 Stat3信号通路

信号转导子和转录激活子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 家族是一类既

能传递胞浆信号, 又能启动核内基因转录的蛋白。STAT 家族有 7 个亚型, 分别为 Stat1、Stat2、Stat3、Stat4、Stat5 α 、Stat5 β 和 Stat6^[71]。其中 Stat3 信号转导通路具有促进增殖、抑制凋亡等多种作用, 该通路活化被认为与肿瘤发生密切相关^[72-73]。多种细胞因子和生长因子与细胞膜外的特异性受体结合, 通过 JAK 酪氨酸激酶使受体磷酸化, 从而激活 Stat3 进入细胞核调节靶基因转录。此外, 胞浆内 SRC 样激酶、配体激活的 G 蛋白偶联受体等都能通过其他不同的途径激活 Stat3。

Kassen 等^[74]发现在斑马鱼非损伤眼中玻璃体内注射睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) 能增加 Stat3 表达, 进而刺激一部分 Muller 细胞增殖; 若在眼中注射 CNTF 抑制剂抑制 Stat3 的表达, Muller 细胞的增殖则会受到抑制, 说明 CNTF 通过 Stat3 途径促进了 Muller 细胞增殖。Thummel 等^[9]在斑马鱼光损伤视网膜中检测到 Ascl1a 和 Stat3 蛋白在损伤后表达立即增加。Fausett 等^[68]研究显示, 在抑制 Ascl1a 或 Stat3 蛋白表达的情况下, 制造视网膜损伤模型, 增殖的 Muller 细胞数目会明显减少, 重要的是, Ascl1a 或 Stat3 其中一个被抑制不会影响另一个分子的表达, 两个同时被抑制也不会加倍阻碍 Muller 细胞增殖, 这说明这两种启动 Muller 细胞依赖的再生的机制是相互独立又平行的。

Nelson 等^[75]进一步研究认为, 在硬骨鱼视网膜损伤中, Ascl1a 和 Stat3 之间存在一定联系。他们发现感光细胞凋亡后 Stat3 在所有 Muller 细胞中表达, 而 Ascl1a 只在有丝分裂的 Muller 细胞中表达。抑制 Stat3 不会影响感光细胞的凋亡, 但增殖的 Ascl1a 阳性的 Muller 细胞数目会明显减少。抑制 Ascl1a 也不会影响感光细胞凋亡的程度, 但 Stat3 阳性的 Muller 细胞的数目和密度会明显减少, 重新进入细胞周期的 Muller 细胞也减少。他们还观察到抑制 lin28a 会使 Muller 细胞中 Stat3 和 Ascl1a 的表达降低, 增殖的 Muller 细胞数目也明显减少。因此, Nelson 等总结在光损伤的硬骨鱼视网膜中有 3 类 Muller 细胞: (1) Stat3 表达、Ascl1a 不表达的非增殖性 Muller 细胞; (2) Stat3 表达、Ascl1a 表达的增殖性 Muller 细胞; (3) Stat3 不表达、Ascl1a 表达的增殖性 Muller 细胞。也就是说, Ascl1a 和 lin28a 是 Muller 细胞增殖所必需, 而 Stat3 是视网膜再生中 Muller 细胞增殖数量达到最多的必需条件。

Nelson 等^[76]最近的研究还发现, 肿瘤坏死因

子 (tumor necrosis factor α , TNF α) 在斑马鱼视网膜光损伤后在 Muller 细胞中表达增加, 并且与 Muller 细胞中 Ascl1a 和 Stat3 表达量呈正相关, 通过 TNF α /Jak/Stat3 信号通路刺激 Muller 细胞增殖和去分化, 促进视网膜再生修复。

7 结语

对不同种属的研究表明, Muller 细胞在成体视网膜中具有视网膜前体细胞特性, 被认为是视网膜再生的细胞来源和治疗视网膜疾病的重要种子细胞, 但是, Muller 细胞在体内横向分化为视网膜神经元的有效性却不能肯定。与鱼类相比, 哺乳动物视网膜在损伤情况下, 大量的 Muller 细胞活化形成胶质瘢痕, 成为 Muller 细胞的再生治疗的主要障碍, 而去分化后再生为神经元的能力是非常有限的, 那么 Muller 细胞在视网膜中是否存在着不同的亚群; 哪一个 Muller 细胞亚群在视网膜损伤的情况下能获得视网膜前体细胞特性; 如何扩大这个 Muller 细胞亚群的比例并避免胶质瘢痕形成。这一系列的问题亟待解决。虽然目前的研究发现了许多分子与信号通路参与了 Muller 细胞去分化、增殖以及再分化为视网膜神经元, 但研究者尚不能随心所欲地利用这些分子与信号通路控制 Muller 细胞的潜能, 更不明确上述促进 Muller 细胞去分化的各种信号通路之间存在着怎样交互作用; 这些信号通路是否存在时空调控; 去分化的 Muller 细胞横向分化为神经元需要什么特殊的微环境; 如果我们能够明确这些问题, 那么急性视网膜损伤及慢性视网膜疾病, 如视网膜色素变性、年龄相关的黄斑变性以及高发糖尿病视网膜疾病都将有可能得到延缓或治愈。

[参 考 文 献]

- [1] Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25(4): 397-424
- [2] Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, et al. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci*, 2007, 27(26): 7028-40
- [3] Karl MO, Hayes S, Nelson BR, et al. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(49): 19508-13
- [4] Ooto S, Akagi T, Kageyama R, et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(37): 13654-9
- [5] Berninger B. Making neurons from mature glia: a far-fetched dream? *Neuropharmacology*, 2010, 58(6): 894-902
- [6] Otteson DC, Phillips MJ. A conditional immortalized mouse muller glial cell line expressing glial and retinal stem cell genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(11): 5991-6000
- [7] Hitchcock P, Ochocinska M, Sieh A, et al. Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res*, 2004, 23(2): 183-94
- [8] Fimbel SM, Montgomery JE, Burket CT, et al. Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci*, 2007, 27(7): 1712-24
- [9] Thummel R, Kassen SC, Enright JM, et al. Characterization of Muller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration. *Exp Eye Res*, 2008, 87(5): 433-44
- [10] Fischer AJ, Reh TA. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci*, 2001, 4(3): 247-52
- [11] Fischer AJ, McGuire CR, Dierks BD, et al. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J Neurosci*, 2002, 22(21): 9387-98
- [12] Fischer AJ, Scott MA, Ritchey ER, et al. Mitogen-activated protein kinase-signaling regulates the ability of Muller glia to proliferate and protect retinal neurons against excitotoxicity. *Glia*, 2009, 57(14): 1538-52
- [13] Hayes S, Nelson BR, Buckingham B, et al. Notch signaling regulates regeneration in the avian retina. *Dev Biol*, 2007, 312(1): 300-11
- [14] Wan J, Zheng H, Chen ZL, et al. Preferential regeneration of photoreceptor from Muller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Res*, 2008, 48(2): 223-34
- [15] Close JL, Liu J, Gumuscu B, et al. Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal rat retina. *Glia*, 2006, 54(2): 94-104
- [16] Waskiewicz AJ, Cooper JA. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, 7(6): 798-805
- [17] Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(4): 2435-44
- [18] Fischer AJ, Scott MA, Tuten W. Mitogen-activated protein kinase-signaling stimulates Muller glia to proliferate in acutely damaged chicken retina. *Glia*, 2009, 57(2): 166-81
- [19] Singhal S, Bhatia B, Jayaram H, et al. Human Muller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors *in vitro* and partially restore RGC function *in vivo* following transplantation. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(3): 188-99
- [20] Wan J, Ramachandran R, Goldman D. HB-EGF is necessary and sufficient for Muller glia dedifferentiation and retina regeneration. *Dev Cell*, 2012, 22(2): 334-47
- [21] Ueki Y, Reh TA. EGF stimulates muller glial proliferation via a BMP-dependent mechanism. *Glia*, 2013, 61(5): 778-89

- [22] Borggreffe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(10): 1631-46
- [23] Liu Y, Pathak N, Kramer-Zucker A, et al. Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros. *Development*, 2007, 134(6): 1111-22
- [24] Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science*, 1995, 268(5208): 225-32
- [25] Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*, 2000, 228(2): 151-65
- [26] Dorsky RI, Rapaport DH, Harris WA. Xotch inhibits cell differentiation in the *Xenopus* retina. *Neuron*, 1995, 14(3): 487-96
- [27] Jadhav AP, Cho SH, Cepko CL. Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(50): 18998-9003
- [28] Furukawa T, Mukherjee S, Bao ZZ, et al. *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron*, 2000, 26(2): 383-94
- [29] Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL, et al. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol*, 2006, 6: 36
- [30] Sullivan SA, Barthel LK, Largent BL, et al. A goldfish Notch-3 homologue is expressed in neurogenic regions of embryonic, adult, and regenerating brain and retina. *Dev Genet*, 1997, 20(3): 208-23
- [31] Ghai K, Zelinka C, Fischer AJ. Notch signaling influences neuroprotective and proliferative properties of mature Muller glia. *J Neurosci*, 2010, 30(8): 3101-12
- [32] Fischer AJ, Reh TA. Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia*, 2003, 43(1): 70-6
- [33] Cadigan KM, Peifer M. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(2): a002881
- [34] Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22429-33
- [35] Dravid G, Ye Z, Hammond H, et al. Defining the role of Wnt/ β -catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23(10): 1489-501
- [36] Van Raay TJ, Vetter ML. Wnt/frizzled signaling during vertebrate retinal development. *Dev Neurosci*, 2004, 26(5-6): 352-8
- [37] Osakada F, Ooto S, Akagi T, et al. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci*, 2007, 27(15): 4210-9
- [38] Meyers JR, Hu L, Moses A, et al. β -catenin/Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina. *Neural Dev*, 2012, 7: 30
- [39] Ramachandran R, Zhao XF, Goldman D. *Ascl1a/Dkk/ β -catenin* signaling pathway is necessary and glycogen synthase kinase-3 β inhibition is sufficient for zebrafish retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(38): 15858-63
- [40] Del Debbio CB, Balasubramanian S, Parameswaran S, et al. Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Muller cells in adult mammalian retina. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12425
- [41] Liu B, Hunter DJ, Rooker S, et al. Wnt signaling promotes Muller cell proliferation and survival after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(1): 444-53
- [42] Besser M, Jagatheaswaran M, Reinhard J, et al. Tenascin C regulates proliferation and differentiation processes during embryonic retinogenesis and modulates the de-differentiation capacity of Muller glia by influencing growth factor responsiveness and the extracellular matrix compartment. *Dev Biol*, 2012, 369(2): 163-76
- [43] Choy SW, Cheng SH. Hedgehog signaling. *Vitam Horm*, 2012, 88: 1-23
- [44] Marti E, Bovolenta P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci*, 2002, 25(2): 89-96
- [45] Cohen MM, Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A*, 2003, 123A(1): 5-28
- [46] Lai K, Kaspar BK, Gage FH, et al. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nat Neurosci*, 2003, 6(1): 21-7
- [47] Palma V, Lim DA, Dahmane N, et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*, 2005, 132(2): 335-44
- [48] Calloni GW, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, et al. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(50): 19879-84
- [49] Spence JR, Madhavan M, Ewing JD, et al. The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development*, 2004, 131(18): 4607-21
- [50] Spence JR, Aycinena JC, Del Rio-Tsonis K. Fibroblast growth factor-hedgehog interdependence during retina regeneration. *Dev Dyn*, 2007, 236(5): 1161-74
- [51] Moshiri A, Reh TA. Persistent progenitors at the retinal margin of *ptc*^{+/-} mice. *J Neurosci*, 2004, 24(1): 229-37
- [52] Wan J, Zheng H, Xiao HL, et al. Sonic hedgehog promotes stem-cell potential of Muller glia in the mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(2): 347-54
- [53] Dyer MA, Cepko CL. Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci*, 2000, 3(9): 873-80
- [54] Ahmad I, Del Debbio CB, Das AV, et al. Muller glia: a promising target for therapeutic regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(8): 5758-64
- [55] Das AV, Mallya KB, Zhao X, et al. Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol*, 2006, 299(1): 283-302
- [56] Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron*, 2003, 39(1): 13-25
- [57] Hatakeyama J, Kageyama R. Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol*, 2004,

- 15(1): 83-9
- [58] Cameron DA, Gentile KL, Middleton FA, et al. Gene expression profiles of intact and regenerating zebrafish retina. *Mol Vis*, 2005, 11: 775-91
- [59] Pogoda HM, von der Hardt S, Herzog W, et al. The proneural gene *ascl1a* is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis. *Development*, 2006, 133(6): 1079-89
- [60] Yi R, Fuchs E. MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt11): 1775-83
- [61] Roush S, Slack FJ. The *let-7* family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(10): 505-16
- [62] Bussing I, Slack FJ, Grosshans H. *let-7* microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med*, 2008, 14(9): 400-9
- [63] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell*, 2005, 120(5): 635-47
- [64] Yokoyama S, Hashimoto M, Shimizu H, et al. Dynamic gene expression of *Lin-28* during embryonic development in mouse and chicken. *Gene Expr Patterns*, 2008, 8(3): 155-60
- [65] Ramachandran R, Fausett BV, Goldman D. *Ascl1a* regulates Muller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a *Lin-28*-dependent, *let-7* microRNA signalling pathway. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(11): 1101-7
- [66] Melton C, Blelloch R. MicroRNA regulation of embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 695: 105-17
- [67] Newman MA, Hammond SM. *Lin-28*: an early embryonic sentinel that blocks *Let-7* biogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(8): 1330-3
- [68] Fausett BV, Gumerson JD, Goldman D. The proneural basic helix-loop-helix gene *ascl1a* is required for retina regeneration. *J Neurosci*, 2008, 28(5): 1109-17
- [69] Ramachandran R, Zhao XF, Goldman D. *Insm1a*-mediated gene repression is essential for the formation and differentiation of Muller glia-derived progenitors in the injured retina. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(10): 1013-23
- [70] Powell C, Elsaieidi F, Goldman D. Injury-dependent Muller glia and ganglion cell reprogramming during tissue regeneration requires *Apobec2a* and *Apobec2b*. *J Neurosci*, 2012, 32(3): 1096-109
- [71] Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(10): 496-502
- [72] Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, et al. Targeted inhibition of *Stat3* with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 4138-43
- [73] Zhang X, Yue P, Fletcher S, et al. A novel small-molecule disrupts *Stat3* SH2 domain-phosphotyrosine interactions and *Stat3*-dependent tumor processes. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(10): 1398-409
- [74] Kassen SC, Thummel R, Campochiaro LA, et al. CNTF induces photoreceptor neuroprotection and Muller glial cell proliferation through two different signaling pathways in the adult zebrafish retina. *Exp Eye Res*, 2009, 88(6): 1051-64
- [75] Nelson CM, Gorsuch RA, Bailey TJ, et al. *Stat3* defines three populations of Muller glia and is required for initiating maximal muller glia proliferation in the regenerating zebrafish retina. *J Comp Neurol*, 2012, 520(18): 4294-311
- [76] Nelson CM, Ackerman KM, O'Hayer P, et al. Tumor necrosis factor- α is produced by dying retinal neurons and is required for Muller glia proliferation during zebrafish retinal regeneration. *J Neurosci*, 2013, 33(15): 6524-39