

Pax2 和 Sox2 及 Prox1 在胚胎小鼠眼发育中的表达模式

陈裕庆¹, 刘少峰²

作者单位: (241001) 中国安徽省芜湖市, 皖南医学院弋矶山医院¹眼科; ²耳鼻咽喉头颈外科

作者简介: 陈裕庆, 女, 主治医师, 研究方向: 视网膜与视神经疾病。

通讯作者: 陈裕庆. eyedoctor.chen@163.com

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-30

Differential temporospatial expression patterns of Pax2, Sox2 and Prox1 during eye development in the embryonic mouse

Yu-Qing Chen¹, Shao-Feng Liu²

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China

Correspondence to: Yu-Qing Chen. Department of Ophthalmology, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China. eyedoctor.chen@163.com

Received: 2012-02-20 Accepted: 2012-03-30

Abstract

• **AIM:** To investigate the relationships of the temporal and spatial expression profiles of Pax2, Sox2 and Prox1 during eye development in the embryonic mouse, and to gain further insight into their possible functions.

• **METHODS:** Time-mated embryonic C57/6 mice were killed at different developmental stages. The eye tissues were embedded in OCT and sectioned at 10 μ m. The sections were then mutually colabeled with Pax2, Sox2 or Prox1 and observed by fluorescence microscope.

• **RESULTS:** On E9.5, Sox2 transcripts were initially distributed throughout optic vesicle and lens placode. However, Pax2 was only expressed in the entire optic vesicle and Prox1 in the lens placode. At E11.5, Sox2 was still distributed throughout presumptive retina and lens vesicle. But Pax2 was more restricted to the proximal portions of the optic cup and stalk, while Prox1 was in the posterior portion of the lens vesicle. After E12.5, Sox2 was still distributed throughout retina and lens vesicle, but the positive expression intensity in lens vesicle was much lower in the retina. Meanwhile, Pax2 was only restricted in the optic stalk and Prox1 was gradually limited in the presumptive lens epithelium and the primary lens fibers.

• **CONCLUSION:** Expression patterns of Pax2, Sox2 and Prox1 were different, and they were overlapped during eye development in the embryonic mouse. The different expression patterns in eye which suggest that they play

different roles in the developing eye may help to shape each respective structure.

• **KEYWORDS:** eye; mouse; development; expression

Chen YQ, Liu SF. Differential temporospatial expression patterns of Pax2, Sox2 and Prox1 during eye development in the embryonic mouse. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(5):819-822

摘要

目的: 研究 Pax2 及 Sox2 和 Prox1 在小鼠眼胚胎发育过程中的时空表达模式及相互关系, 探讨其可能的作用。

方法: 取不同发育阶段的胚胎小鼠眼的中轴冰冻切片, 采用免疫荧光共标记技术, 观察 Pax2 和 Sox2 及 Prox1 在眼内表达分布规律及相互关系。

结果: 在胚胎期 9.5d (E9.5), Sox2 表达在视泡和晶状体板, 而 Pax2 表达在视泡前体细胞中, 而 Prox1 仅在晶状体板中弱表达。E11.5 时, Sox2 在晶状体泡和原始视网膜均呈阳性, 而 Pax2 仅在视柄和视柄邻近的腹侧视网膜及色素上皮层内表达, Prox1 主要集中在晶状体泡后壁细胞内。到 E12.5 后, Sox2 仍广泛分布在视网膜和晶状体中, 但晶状体的表达强度明显弱于视网膜区域的表达; Pax2 仅表达在视柄及分化形成的视神经中; 而 Prox1 逐渐局限在原始晶状体纤维细胞及晶状体上皮细胞中。

结论: Pax2 和 Sox2 及 Prox1 参与小鼠眼的发育, 它们之间互相联系但有明显不同的时空分布特点, 提示在眼的发育中可能具有不同的功能。

关键词: 眼; 小鼠; 发育; 表达

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.05.04

陈裕庆, 刘少峰. Pax2 和 Sox2 及 Prox1 在胚胎小鼠眼发育中的表达模式. 国际眼科杂志 2012;12(5):819-822

0 引言

视觉系统的发育是一个非常复杂的过程, 由神经外胚层、头部表皮外胚层及中胚层来源的间充质细胞分化形成的不同结构共同组合而成。多种基因在时空上互相协调和调控, 是眼睛正常发育的关键, 而转录调控是基因表达的第一步, 转录因子间的复杂结合控制特异性基因的表达, 从而决定组织器官的命运^[1,2]。近年来研究表明: Prox1 和 Pax6 能激活 Sox2 基因的启动子, 而 Sox2 同样能调节这些基因的表达, 它们共同参与视觉系统正常发育的时空调控; 而 Pax2 作为 Pax 基因家族的一员, 也可能与 Sox2 和 Prox1 的表达存在某种联系^[3,4]。我们采用免疫荧光共标记技术, 观察小鼠眼的胚胎发育过程中 Pax2 和 Sox2 及 Prox1 表达的相互关系和时空变化, 探讨它们在眼的胚胎发育过程中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选用胚胎期 9.5 ~ 18.5d (E9.5 ~ E18.5) 的

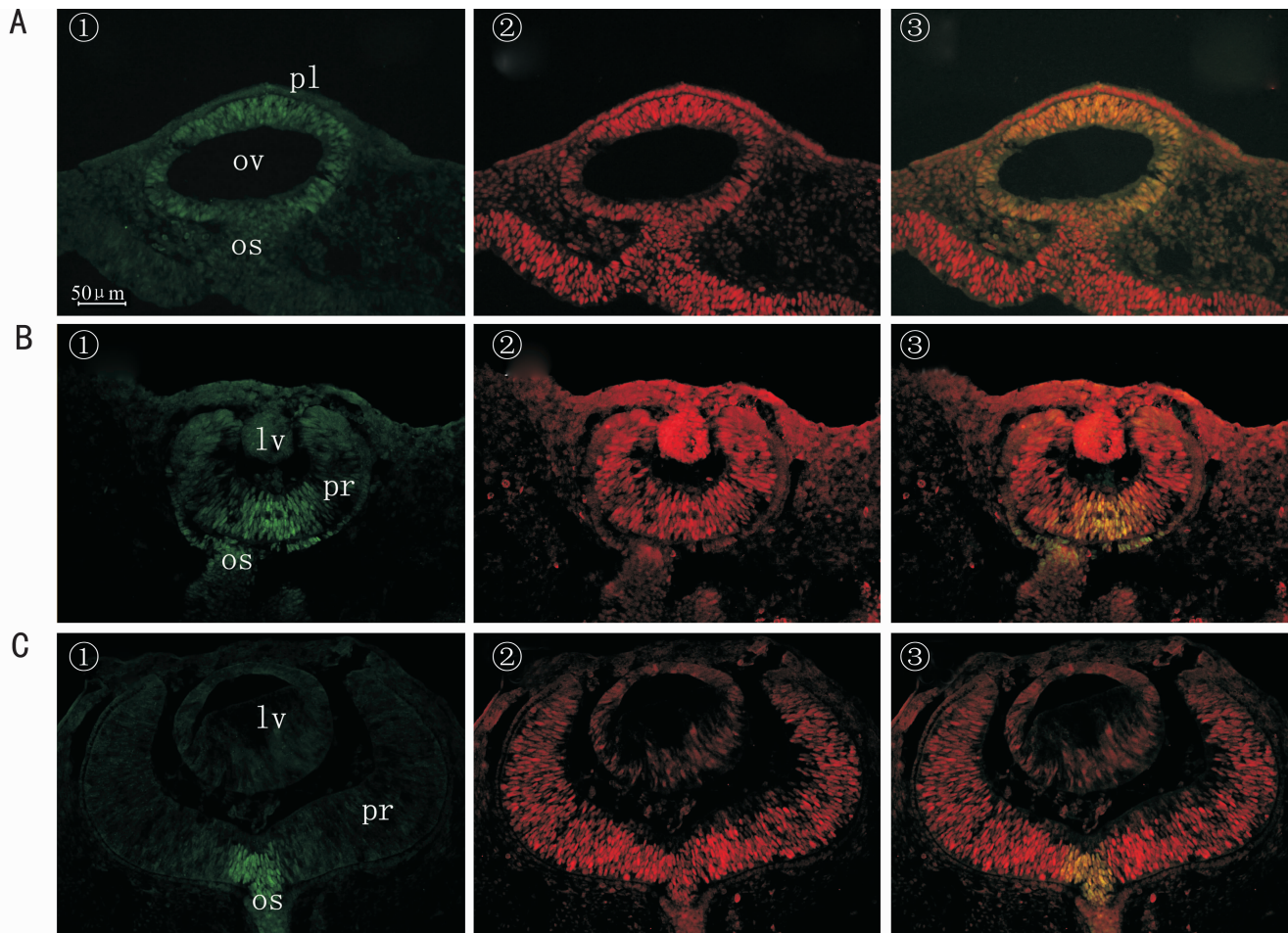


图1 Pax2 和 Sox2 在 E9.5 ~ E12.5 时视泡中的表达模式 A: E9.5; B: E11.5; C: E12.5。①: Pax2; ②: Sox2; ③: Pax2 和 Sox2。注: ov: 视泡; pl: 晶状体板; os: 视柄; pr: 原始视网膜; lv: 晶状体泡。标尺 = 50 μm。

C57bl/6 孕鼠各 3 只(下午 5:00 左右将成年 C57bl/6 雌雄鼠合笼,次日 8:00 发现孕栓时为胚胎第 0.5d),所有实验孕鼠均由复旦大学实验动物中心提供并具有合格证。

1.2 方法

1.2.1 标本制作 以甲苯噻嗪-氯胺酮背部皮下注射麻醉孕鼠后,剖腹,取出胚胎, E9.5 ~ E11.5 取整个胚胎, E12.5 后直接断头,放入 40mL/L 多聚甲醛固定,4℃ 保存。

1.2.2 冰冻切片 固定后标本经 0.01mol/L PBS 漂洗后,梯度浸糖(150 和 300g/L 蔗糖溶液)、浸胶(OCT 冰冻切片包埋剂,不同胎龄所需时间不同)后,冰冻切片定位(从顶部纵向垂直切片),留取眼的中轴切片,-80℃ 保存。

1.2.3 免疫组织化学 切片经 0.01mol/L PBS 漂洗后,柠檬酸钠液(10mmol/L Na-Citrate, pH=6.0)97℃ 抗原修复 15min,经 0.01mol/L PBS 再次漂洗后,放入 PBS/0.1% Triton X-100 于 37℃ 通透 40min;10% 驴血清室温下封闭 30min,加入 1:400 兔抗 Pax2(科文斯公司,美国)和 1:600 羊抗 Sox2(圣克鲁斯生物技术公司,美国)或 1:600 羊抗 Sox2 和 1:1000 兔抗 Prox1(Chemicon, 美国)。4℃ 过夜。漂洗后加入 1:200 驴抗兔 Alexa Fluor 488(分子探针公司,美国)和 1:200 驴抗羊 conjugated AffiniPure IgG(H+L)(Jackson Immuno Research, 美国)二抗,37℃ 孵育 1h;漂洗后,加入 1:1000 DAPI,室温孵育 1h,漂洗后抗淬灭剂(分子探针公司,美国)封片。采用 Nikon 荧光显微镜观察,Adobe PhotoshopCS 3.0 测量图片灰度值。

统计学分析:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0

统计软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E9.5 ~ E11.5 时 Pax2 和 Sox2 及 Prox1 的表达 在 E9.5 时,Sox2 在整个视泡和晶状体板均有表达(图 1A2), Pax2 只表达在视泡前体细胞中(图 1A1),但在不同区域它们的表达强度存在一定的差别,而 Prox1 仅在晶状体板呈弱阳性表达。Pax2 在视泡靠近视柄的区域呈弱阳性表达(灰度值:0.916±0.0043),而在其他区域,即将来发育为视网膜色素上皮层和凹陷形成原始视网膜的区域呈阳性(灰度值:0.821±0.0067),两者灰度值的差异具有显著统计学意义($P < 0.01$);而 Sox2 在视泡远端将来凹陷形成原始视网膜区域呈强阳性(灰度值:0.786±0.0159),而在将来发育为视网膜色素上皮层的区域呈弱阳性(灰度值:0.926±0.0045),两者灰度值的差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。随着晶状体板逐渐凹陷开始形成晶状体泡及原始视网膜的形成,Sox2 在晶状体板、晶状体泡及原始视网膜区域仍然高表达(图 1B2),而与之不同的是,Pax2 逐渐限制在视柄和视柄邻近的腹侧视网膜及色素上皮层内表达(图 1B1),而 Prox1 主要表达在晶状体窝后部(图 2A1)。

2.2 E12.5 ~ E18.5 时 Pax2 和 Sox2 及 Prox1 的表达

E12.5 后,在晶状体形成外部的上皮层和位于内部的延伸的纤维时,Sox2 在晶状体泡的表达明显下调(灰度值:0.900±0.0094),但在原始视网膜仍然呈强阳性(灰度值:0.766±0.0102),两者灰度值的差异具有显著统计学意义

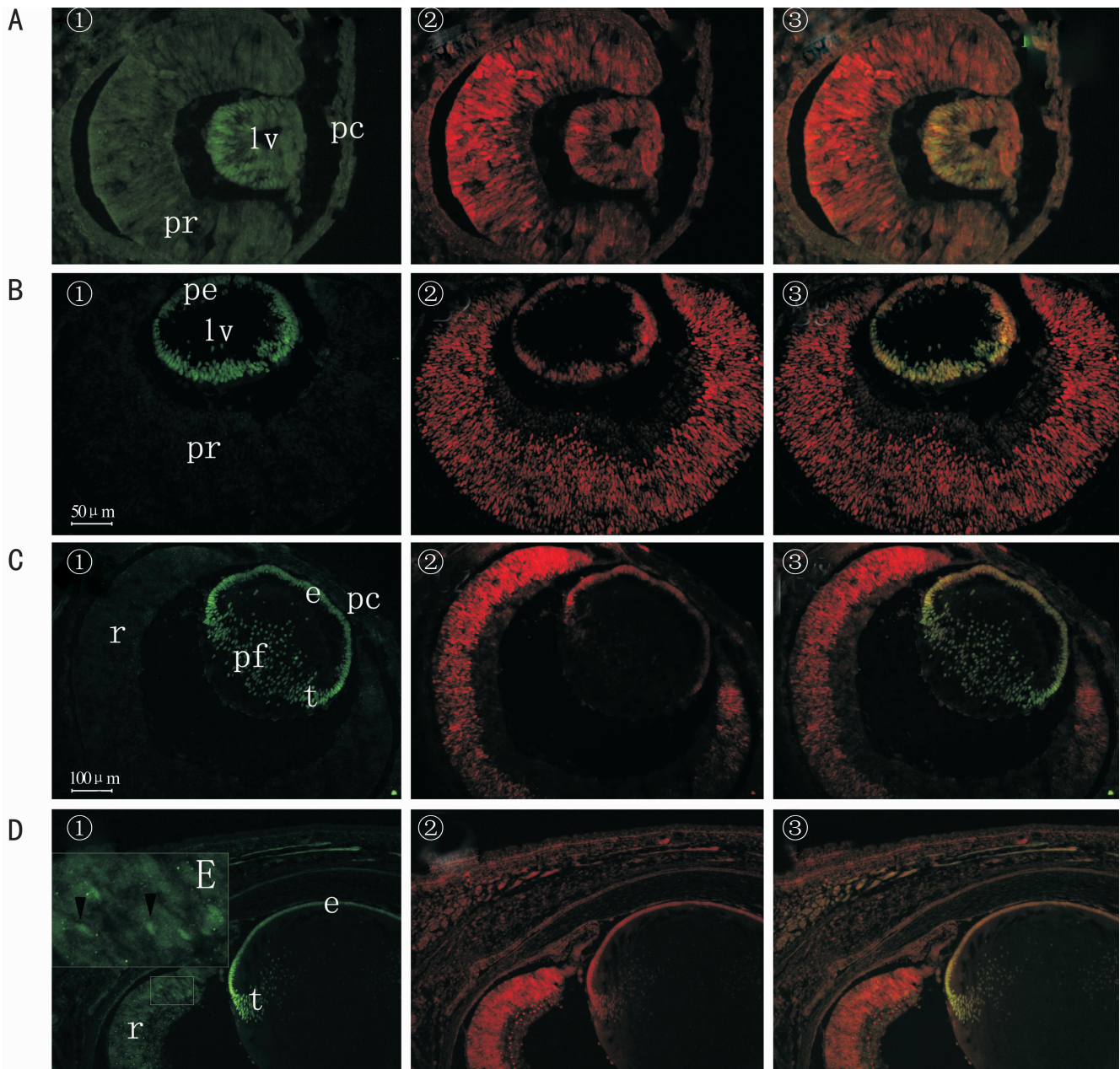


图2 Sox2 和 Prox1 在 E11.5 ~ E18.5 时视泡中的表达模式 A: E11.5; B: 13.5; C: E15.5; D: E18.5 (E 为 D1 图局部视网膜放大图)。①: Prox1; ②: Sox2; ③: Prox1 和 Sox2。注: pc: 原始的角膜; pr: 原始视网膜; lv: 晶状体泡; pe: 原始的晶状体上皮; pf: 初级晶状体纤维; e: 晶状体上皮; r: 视网膜; t: 晶状体移行区。标尺 = 50 μm (A1 ~ B3), 100 μm (C1 ~ D3)。

($P < 0.01$, 图 1C2); 而 Pax2 进一步局限在视柄区域 (图 1C1)。随着晶状体的分化, Prox1 主要表达在晶状体泡后壁细胞 (图 2A1), 并进一步局限在原始晶状体纤维细胞及晶状体上皮细胞核内 (图 2B1, C1)。

在 E16.5, Prox1 开始在视网膜呈散在弱表达; 一直到 E18.5, Prox1 在视网膜内仍呈散在弱表达 (图 2D1 中 E 区), 在晶状体内虽依然有表达, 但不同部位表达强度不同 (图 2D1)。在晶状体移行区 (transition zone) 上皮细胞内呈强阳性 (灰度值: 0.674 ± 0.0127), 明显高于晶状体前壁上皮细胞 (灰度值: 0.886 ± 0.0091) 和次级晶状体纤维细胞 (灰度值: 0.946 ± 0.0056), 它们灰度值的差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。而与之明显不同的是, E18.5 时 Sox2 在视网膜、晶状体上皮细胞和原始晶状体纤维细胞均有表达, 但它们的表达强度明显不同 (图 2D2), 在视网膜呈强阳性 (灰度值: 0.795 ± 0.0103), 而在晶状体上皮

细胞 (灰度值: 0.898 ± 0.0049) 呈弱表达, 在次级晶状体纤维细胞 (灰度值: 0.969 ± 0.0018) 内仅有微弱表达, 它们灰度值的差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。与 Prox1 不同的还有, Sox2 在晶状体移行区的上皮细胞和晶状体前壁上皮细胞中表达并无差别。

3 讨论

视泡来源于前脑两侧的神外胚层, 随着视泡的增大与前面的体表外胚层接近时, 此处的体表外胚层增厚形成晶状体板。随后, 视泡逐渐内陷形成内外双层的视杯, 外层形成视网膜色素上皮层, 内层则分化形成视网膜神经感觉层; 与此同时, 晶状体板内陷, 加深形成晶状体泡, 逐渐与表面外胚层完全分离分化形成晶状体^[2]。

我们的研究显示, Pax2 仅仅短暂地表达在早期视泡前体细胞中, 随着视泡内陷形成内外双层的视杯时, Pax2 表达从外侧向内侧逐渐减弱并消失, 最后仅仅局限在视

柄。Pax2 早期表达及从外向内的时间和空间上的局限性,提示 Pax2 基因在视网膜祖细胞增殖分化以及视神经的分化形成等方面可能起着重要的作用^[5,6]。在人类 Pax2 基因突变可引起视网膜缺损综合征也表明了这一点^[7]。另外,Pax2 在视网膜色素上皮层从外向内同样变化的表达模式,表明它也可能参与了色素上皮层形成的调控。

视网膜是由视杯内层神经上皮演化而来,渐次分化形成视网膜节细胞、无长突细胞、双极细胞和 Müller 细胞。Sox2 和 Pax2 在视泡和原始视网膜虽然有部分共同表达,但与 Pax2 早期局限短暂的表达明显不同,Sox2 不但在早期视泡和头部外胚层均有表达,而且在整个视网膜发育过程中均广泛表达,提示 Sox2 参与视觉系统早期发育中各种细胞命运的确切及不同细胞分化的格局化和空间控制,在眼的早期胚胎发生、视网膜祖细胞增殖分化和晶状体发育等多种重要发育事件中都起着重要的作用^[8,9]。在视网膜前体细胞内条件性敲除 Sox2 基因,则导致视网膜前体细胞失去增殖分化能力^[10],这从另一方面说明了 Sox2 在视网膜前体细胞增殖分化过程中的作用。另外,Sox2 在晶状体发育中的表达模式明显不同于视网膜,在形成外部的上皮层和位于内部的延伸的纤维团时,Sox2 在晶状体的表达存在明显下调。Smith 等^[11]在晶状体板阶段条件敲除 Sox2 基因,发现晶状体发育停滞在视窝阶段。这些结果均表明 Sox2 不仅参与表皮外胚层接受诱导信号向晶状体分化的调控,而且在晶状体开始分化时同样发挥作用。

Prox1 和 Sox2 虽然在晶状体同样都有表达,但与 Sox2 明显不同的是,Prox1 的表达主要与晶状体的发育形成有关^[12]。Sox2 和 Prox1 在晶状体发育形成中,既有相似但又有区别的表达方式,表明它们晶状体的分化形成中的功能具有一定的相关性。Prox1 最初表达在晶状体板,但随着晶状体的分化,随后集中表达在晶状体泡后壁细胞,并进一步局限在原始晶状体纤维细胞及晶状体上皮细胞核内,但在晶状体移行区呈强阳性表达,表明 Prox1 不但同 Sox2 一样参与晶状体形态发生,而且可能与晶状体上皮分化为晶状体纤维的过程有关。Prox1 敲除的小鼠晶状体不能发育出纤维细胞而维持空泡状态,同样说明 Prox1 基因活性对于晶状体纤维的分化和延伸过程是必需的^[13]。

我们的结果表明:Pax2, Sox2 和 Prox1 参与眼胚胎发育的调控,但不同的转录因子只能在一定的时间和空间上对视觉系统的特异细胞或组织的发育起到调控作用,它们互相联系但又有不同的时空分布特点,提示转录因子间的复杂结合控制着细胞分化,从而确保眼的正常发育和功能

的维持^[2,14]。胚胎发育与出生后的组织修复具有相似的调控机制,晶状体、视网膜及视神经损伤后的再生修复过程同样与眼的胚胎发生有着密切的关系^[15],了解这些信号因子构成的网络调控系统在视觉系统发育中的作用,可能为视网膜、视神经损伤后再生修复的研究提供新的线索。

参考文献

- 1 Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* 2010;93:61-84
- 2 Graw J. Eye development. *Curr Top Dev Biol* 2010;90:343-386
- 3 Matsushima D, Heavner W, Pevny LH. Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by SOX2 and PAX6. *Development* 2011;138(3):443-454
- 4 Lengler J, Bittner T, Münster D, et al. Agonistic and antagonistic action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 AND Six3 in the regulation of Sox2 expression. *Ophthalmic Res* 2005;37(6):301-309
- 5 Stanke J, Moose HE, El-Hodiri HM, et al. Comparative study of Pax2 expression in glial cells in the retina and optic nerve of birds and mammals. *J Comp Neurol* 2010;518(12):2316-2333
- 6 Alur RP, Cox TA, Crawford MA, et al. Optic nerve axon number in mouse is regulated by PAX2. *J AAPOS* 2008;12(2):117-121
- 7 Alur RP, Vijayasarathy C, Brown JD, et al. Papillorenal syndrome-causing missense mutations in PAX2/Pax2 result in hypomorphic alleles in mouse and human. *PLoS Genet* 2010;6(3):1-13
- 8 Agathocleous M, Iordanova I, Willardson MI, et al. A directional Wnt/beta-catenin-Sox2-proneural pathway regulates the transition from proliferation to differentiation in the Xenopus retina. *Development* 2009;136(19):3289-3299
- 9 Lin YP, Ouchi Y, Satoh S, et al. Sox2 plays a role in the induction of amacrine and Müller glial cells in mouse retinal progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(1):68-74
- 10 Taranova OV, Magness ST, Fagan BM, et al. SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev* 2006;20(9):1187-1202
- 11 Smith AN, Miller LA, Radice G, et al. Stage-dependent modes of Pax6-Sox2 epistasis regulate lens development and eye morphogenesis. *Development* 2009;136(17):2977-2985
- 12 Duncan MK, Cui W, Oh DJ, et al. Prox1 is differentially localized during lens development. *Mech Dev* 2002;112(1-2):195-198
- 13 Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, et al. Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet* 1999;21(3):318-322
- 14 Cvekl A, Duncan MK. Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development. *Prog Retin Eye Res* 2007;26(6):555-597
- 15 Huang Y, Xie L. Expression of transcription factors and crystallin proteins during rat lens regeneration. *Mol Vis* 2010;16(3):341-352