

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 591

АПОПТОЗ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В ПРЕЗУМПТИВНОЙ НЕЙРАЛЬНОЙ СЕТЧАТКЕ И ПРЕЗУМПТИВНОМ ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ СЕТЧАТКИ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ГЛАЗА У ЖАБЫ *Bufo raddei* STRAUCH

© 2012 г. В. Хан*, И.-П. Хан**, З.-Р. Ванг*

*Институт биологии развития, Факультет наук о жизни, Университете Ланжоу,
Ланжоу 730000, Китайская Народная Республика

**Колледж Наук о жизни и Технологии, Университет Лангдонг,
Кингуанг 734000, Китайская Народная Республика

E-mail: wangzr@lzu.edu.cn

Поступила в редакцию 29.03.11 г.

Окончательный вариант получен 18.10.11 г.

Проведено изучение апоптоза и дифференцировки в презумптивной нейральной сетчатке (ПНС) и презумптивном пигментном эпителии сетчатки (ППЭС) у жабы *Bufo raddei* Strauch. Окраска TUNEL была использована для оценки апоптозных клеток и иммуногистохимия для оценки уровня экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), RT97 и тирозиназы (Tyr) в раннем развитии глаза. Плотность апоптозных клеток и уровень экспрессии белка были оценены количественно с помощью программы Image-Pro Plus 6.0. Апоптоз был обнаружен и в ПНС, и в ППЭС, а плотность апоптозных клеток в ППЭС была выше, чем в ПНС ($P < 0.01$) на одной и той же стадии развития глаза. Уровень экспрессии GFAP и RT97 увеличивался в ПНС, но уменьшался в ППЭС, тогда как уровень экспрессии Tyr менялся в противоположном направлении и в ПНС, и в ППЭС. Точка пересечения была зарегистрирована через 5–6 ч после образования глазного пузырька. ППЭС становится тоньше, чем ПНС, возможно, благодаря более высокому уровню апоптоза в ППЭС. Молекулярная дифференцировка наблюдалась после контакта наружной стенки глазного пузырька с вышележащей эктодермой, запускающего экспрессию специфических молекул и подавляющего экспрессию неспецифических молекул в ПНС и ППЭС.

Ключевые слова: презумптивная нейральная сетчатка, презумптивный пигментный эпителий сетчатки, апоптоз, дифференцировка, иммунохимия.

ВВЕДЕНИЕ

Сетчатка глаза позвоночных животных берет свое начало от глазных пузырьков, которые возникают в виде двух выпячиваний боковой стенки переднего мозга до его разделения на конечный и промежуточный мозг в ходе зародышевого развития. Глазные пузырьки выпячиваются наружу, достигая эпидермиса и вступая в контакт с его внутренней поверхностью. Затем наружная поверхность глазного пузырька уплощается и вворачивается, образуя двухслойную глазную чашу. Внутренняя стенка глазной чаши гораздо толще наружной стенки, она развивается в нейральную сетчатку. Клетки наружной стенки продуцируют пигмент и развиваются в пигментный эпителий сетчатки (Lopashov, Stroeve, 1961, 1964; Lopashov, 1963; Jacobson, 1966; Hyer et al., 1998; Gilbert, 2003; Francisco-Morcillo et al., 2006).

При изучении механизмов дифференцировки глазной чаши возникает вопрос, почему внутрен-

няя и наружная стенки глазной чаши, которые имеют одинаковое происхождение, дифференцируются, соответственно, в нейральную и пигментную сетчатку. Есть два аспекта дифференцировки глазного пузырька – морфологический и молекулярный, или функциональный.

Морфологическую дифференцировку глазного пузырька описывали и изучали в течение длительного времени (Lopashov, Stroeve, 1961, 1964; Lopashov 1963; Jacobson, 1966; Feng et al., 1984; Martín-Partido et al., 1988; Li, Sakaguchi, 2002; Adler, Canto-Soler, 2007). Описываемые изменения объясняли как результат миграции некоторых клеток из ПНС в ППЭС в ходе раннего развития (ссылки) или как результат пролиферации клеток ПНС (Martín-Partido et al., 1988; Cuadros et al., 1991; Lee et al., 2001). До сих пор нет сведений о различиях в уровне апоптоза между ПНС и ППЭС.

Что касается молекулярной или функциональной дифференцировки, исследования касались

различных молекул (Lee et al., 2001; Canto-Soler, Adler, 2006; Adler, Canto-Soler, 2007), однако эти молекулы экспрессировались большей частью до образования глазного пузырька или на поздних стадиях развития глаза (Barnstable, 1987; Harris, Perron, 1998; Zhang et al., 2002). Было общепринято, что молекулярная дифференцировка связана с развитием глаза. Используемые в этих исследованиях белки (GFAP, RT97 и Tug) экспрессируются в раннем развитии глаза и участвуют в клеточной дифференцировке глазного зачатка (Holt, 1989; Kumasaka et al., 2003; Shin et al., 2003). Однако до сих пор нет сведений об экспрессии разных белков в ПНС и ППЭС в ходе раннего развития глаза. В настоящем исследовании окраска TUNEL была использована для выявления различий в уровне апоптоза и иммуногистохимия для изучения экспрессии разных белков в ПНС и ППЭС в ходе раннего развития глаза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Жабы *Bufo raddei* Strauch являются преобладающим видом амфибий на северо-западе Китая. Оплодотворенные яйца жаб собирали в лужах в окрестностях Ланжоу или получали путем искусственного оплодотворения в лаборатории. Зародыши на стадии развития 16–17 (Ge et al., 1982) собирали каждый час и фиксировали в 4% формалине в 0.1 М фосфатном буфере (PBS, рН 7.4) в течение 12–18 ч при 4°C. Затем их обезвоживали в спиртах и просветляли в ксилоле, после чего их заключали в парафин для приготовления срезов.

Плотность клеток на единицу площади. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и изучали под микроскопом Motic B5 с помощью программы Motic Images Advanced 3.0. Срезы рассматривали с помощью программы Photoshop CS3 (10.0), и на той же площади подсчитывали число клеток при одном и том же увеличении в дорсальной, вентральной и центральной областях ПНС и ППЭС, соответственно, через 2, 4, 6, и 8 ч после образования глазного пузырька. Плотность клеток = число клеток/единица площади.

Окрашивание TUNEL. Разрушенную ДНК в клетках выявляли с помощью окрашивания TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) (Nanjing KeyGen Biotech. Co. Ltd., China) после облучения в микроволновой печи с раствором цитратного буфера. Срезы промывали 0.1 М PBS, а затем блокировали 3% hydrogen peroxidase-carbinol. После этого срезы инкубировали в 50 мкл буфере, содержащем TDT (terminal deoxynucleotidyl transferase) с Biotin-11-dUTP

при 37°C в течение 1 ч. После промывания в 0.1 М PBS срезы инкубировали в streptavidin-HRP буфере при 37°C в течение 30 мин. Затем срезы снова промывали 0.1 М PBS6 визуализировали с помощью диаминобензидина (DAB), еще раз промывали 0.1 М PBS и окрашивали гематоксилином. После проведения в спиртах срезы заключали в нейтральный бальзам и изучали под микроскопом Motic B5. Фотографии срезов собирали с помощью Motic Images Advanced 3.0. В качестве отрицательного контроля использовали 0.1 М PBS для смещения фермента TDT.

Иммуногистохимия. Срезы зародышей и взрослой сетчатки обрабатывали 1 мМ ЭДТА (рН 8.0) в микроволновой печи для восстановления антигена и повторно промывали PBS. Затем срезы последовательно обрабатывали 0.3% перекиси водорода при 37°C в течение 30 мин и в 10% нормальной сыворотки овцы при 37°C в течение 30 мин.

Срезы обрабатывали различными антителами: антимышиными моноклональными против GFAP (разведение 1 : 800; Thermo, USA), антимышиными моноклональными против RT97 (1 : 800; Chemicon, USA) и антимышиными моноклональными против Tug (1 : 700; Thermo). Затем срезы инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи. После споласкивания в 0.1 М PBS срезы инкубировали с теми же вторичными антителами (овечьи антимышиные IgG) из двухэтапного иммуногистохимического набора (Beijing Zhongshan Golden Bridge Biotechnology Co. Ltd., China) при 37°C в течение 30 мин. Срезы снова промывали 0.1 М PBS, визуализировали с помощью DAB, трижды промывали 0.1 М PBS, окрашивали гематоксилином, обезвоживали в серии спиртов и просветляли в ксилоле. Затем срезы заключали в нейтральный бальзам и изучали под микроскопом Motic Images Advanced 3.0. В качестве отрицательного контроля использовали 0.1 М PBS для смещения первичных антител.

Для выявления специфичности антител у жабы использовали взрослую сетчатку.

Компьютерный анализ изображений на интенсивность окрашивания. Фотографии с окрашиванием TUNEL и на иммуногистохимию получали под микроскопом Image 3.0 при увеличении 400×. По крайней мере, десять образцов полученных от десяти различных зародышей рассматривали как одну группу. TUNEL-положительные ядра и иммуногистохимические данные о белках на срезах количественно обрабатывали с помощью программы Image-Pro 6.0. Область интереса (AOI) была создана и оптическая плотность была измерена. Участки с положительной экспрессией, визуализиро-

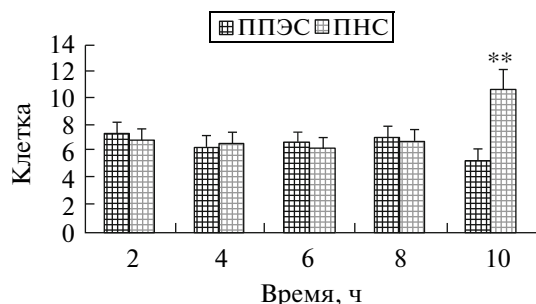


Рис. 1. Плотность клеток в ПНС и ППЭС глазного пузырька в раннем морфогенезе глаза.

Данные показывают плотность клеток в ПНС и ППЭС через 2, 4, 6, 8 и 10 ч соответственно, после образования глазного пузырька ($n = 10$). ** $P < 0.01$ считали статистически значимым при сравнении плотности клеток в ПНС и ППЭС на одной и той же стадии развития.

ванные с помощью DAB, были выбраны как АОI. После установления АОI в полученных фотографиях все пиксели в АОI были выбраны и интегральная оптическая плотность (IOD) была измерена соответственно в ПНС и ППЭС (Xavier et al., 2005; Sharma et al., 2006). Значения IOD показывают плотность апоптозных клеток и количественную экспрессию белков.

Анализ данных. Результаты были выражены как среднее \pm стандартная ошибка (SD) и оценены в соответствии с критерием Стьюдента. Значения $P < 0.05$ рассматривали как статистически значимые между группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Плотность клеток в развивающихся ППЭС и ПНС. Плотность клеток в ППЭС и ПНС различалась, но эта разница не была статистически значимой до 10 ч после формирования глазного пузырька, когда плотность клеток в ПНС была значительно выше, чем в ППЭС ($p < 0.01$; рис. 1).

Апоптоз в развивающихся ППЭС и ПНС. Фрагменты разрушенной ДНК выглядели как коричневые скопления в TUNEL-положительных участках, которые располагались в основном около стенки мозга и внутренней поверхности глазного пузырька (рис. 2). На стадии 16 плотность апоптозных клеток в ППЭС и ПНС достигла максимума и постепенно снижалась в ходе развития глаза.

Сравнивая плотность апоптозных клеток в ПНС и ППЭС, мы обнаружили, что в ПНС она была ниже, чем в ППЭС на одной и той же стадии развития ($p < 0.01$; рис. 2E). Апоптоз проходил в основном в ППЭС, а не в ПНС.

Экспрессия GFAP, RT97 и Туг в сетчатке взрослой жабы. Экспрессия GFAP наблюдалась в боль-

шинстве участков сетчатки, кроме пигментного эпителия, потому что там располагаются глиальные клетки и их отростки (рис. 3A). Экспрессия RT97 наблюдалась в основном в наружном и внутреннем сетчатых слоях, наружном и внутреннем ядерных слоях и ганглиозном клеточном слое и, в незначительной степени, в слое нервных волокон (рис. 3B). Экспрессия Туг наблюдалась в основном в пигментном эпителии и в слое фоторецепторных сегментов, где располагались отростки пигментных клеток (рис. 3C).

Распределение GFAP и RT97 в развивающихся ППЭС и ПНС. Участки экспрессии GFAP окрашены коричневым цветом (рис. 4A, B и C). В начале исследуемого периода уровень экспрессии GFAP был минимальным, затем он постепенно возрастал и достигал максимума в ПНС в конце исследуемого периода (рис. 4D).

Уровень экспрессии RT97 был сходен с уровнем экспрессии GFAP соответственно в ПНС и ППЭС (рис. 5).

Распределение Туг в развивающихся ППЭС и ПНС. Уровень экспрессии Туг был минимальным в начале исследуемого периода (рис. 6A), затем он постепенно возрастал (рис. 6B и C) и достигал максимума в ППЭС в конце исследуемого периода (рис. 6D). Напротив, уровень экспрессии Туг в ПНС постепенно уменьшался (рис. 6D).

ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с принципами классической эмбриологии, ключевым событием является контакт глазного пузырька с головной эктодермой. Часть глазного пузырька, вступившая в контакт с головной эктодермой, инвагинирует и становится внутренним слоем глазной чаши – ПНС, а остальная его часть становится наружным слоем внутренней чаши – ППЭС. В конечном счете, ПНС формирует многослойную структуру, а ППЭС становится однослойной плоской структурой. Исходя из формы клеток, можно допустить, что некоторые клетки мигрируют из ППЭС в ПНС на ранних стадиях развития глаза (Martin-Partido et al., 1988; Cuadros et al., 1991; Lee et al., 2001), а клетки ПНС быстро пролиферируют в ходе развития сетчатки (Li et al., 2000; Gilbert, 2003; Canto-Soler, Adler, 2006). Мы обнаружили более высокую плотность апоптозных клеток в ППЭС по сравнению с ПНС на одной и той же стадии, и их плотность постепенно снижалась в ходе раннего развития глаза. Однако сходная плотность в ППЭС и ПНС сменялась статистически более высокой плотностью в ПНС по сравнению с ППЭС. И, в конечном счете, она падала в ППЭС, но возросла в ПНС в ходе

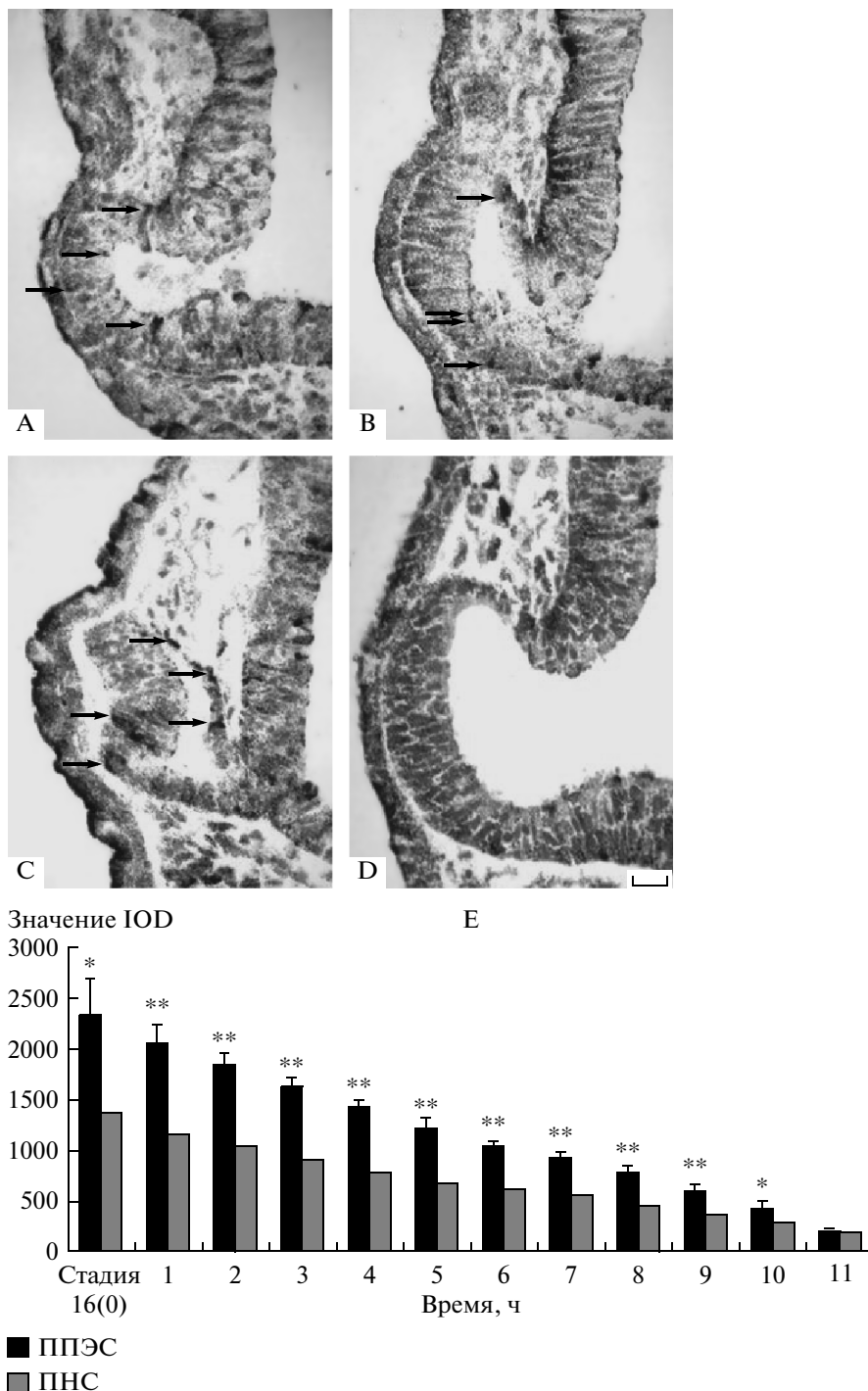


Рис. 2. Апоптоз в ППЭС и ПНС глазного пузыря в раннем морфогенезе глаза.

На фотографиях видны апоптотические тельца (показаны стрелками) через 1 (А), 5 (В) и 11 (С) ч после образования глазного пузыря. (D) Отрицательный контроль. (E) Данные представлены как средняя ± стандартная ошибка ($n = 10$) в каждой группе. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ считали статистически значимыми при сравнении интегральной оптической плотности в ПНС и ППЭС на одной и той же стадии развития.

морфогенеза глаза. Сравнивая характер изменений плотности апоптотических клеток с нормальной плотностью клеток в ППЭС и ПНС на ранних стадиях развития глаза, мы обнаруживаем, что кле-

точная пролиферация происходит и в ППЭС, и в ПНС, но характер изменения плотности апоптотических клеток более выражен, чем изменения нормальной плотности клеток. Поэтому апоптоз мог

бы быть одной из движущих сил наблюдаемой морфологической дифференцировки, особенно в ходе раннего развития глаза.

Мы обнаружили также, что плотность апоптозных клеток была максимальной на ранних стадиях развития сетчатки, но постепенно снижалась в ходе дальнейшего развития (рис. 2). Сходный характер изменений наблюдался и в ходе развития куриного зародыша (Martin-Partido et al., 1988), черепахи (Francisco-Morcillo, Hidalgo-Sanchez, 2004) и мыши (Rodriguez-Gallardo et al., 2005).

Известно, что сетчатка позвоночных представляет собой структуру, состоящую из десяти слоев и трех типов клеток — нейронов, глиальных и пигментных клеток (Dowling, 1987); и после формирования глазного пузырька одиночная клетка-предшественник нейробласта сетчатки может мигрировать и дать начало нейронам и глиальным клеткам (Turner, Soroko, 1987). Антитела против GFAP обычно считают маркером глиальных клеток (главным образом, астроцитов и немиэлинизированных шванновских клеток) и они экспрессируются в начале дифференцировки глиальных клеток (Bignami et al., 1972; Eng, 1982; Schnitzer, 1985). Известно, что антитела RT97 являются маркером нейронов и специфичны для крупных и средних субъединиц нейрофиламентов в нейронах, и поскольку RT97 является главным компонентом нейрального отростка, например аксонов и дендритов, он экспрессируется несколько позже (Ezeonu et al., 1999; Velasco et al., 2000; Shin et al., 2003). Тут и связанные с ним белки задействованы в биосинтезе пигментных клеток (Newton et al., 2001), и антитела против Тут являются маркером пигментных клеток (Basu et al., 1983; Kumasaka et al., 2003; Bharti et al., 2006; Julien et al., 2007). Наше исследование показало, что эти три типа антител специфичны для сетчатки жабы (рис. 3).

Кроме того, оказалось, что GFAP, RT97 и Тут экспрессируются до или после образования нервной трубки (GFAP — у амфибий, Messenger, Warner, 1989; у куриного зародыша, Norkute et al., 2010; RT97 — у костистых рыб, Velasco et al., 2000; Wang et al., 2006; Тут — у мышей, Coglein et al., 1977; Cronin et al., 2003). Наши исследования показали, что уровень экспрессии GFAP и RT97 постепенно повышается в ППЭС, но понижается в ПНС на ранних стадиях развития глаза (рис. 4 и 5). Напротив, уровень экспрессии Тут постепенно понижается в ПНС, но повышается в ППЭС (рис. 7). Это означает, что количество нейронов и глиальных клеток увеличивается, а биосинтез пигмента уменьшается в ПНС. Напротив, в ППЭС количество нейронов и глиальных клеток уменьшается, а биосинтез пигмента увеличивается. И ПНС, и ППЭС образуются из одного источника — стенки переднего мозга

(Лопашов, Строева, 1961; Лопашов, 1963; Lopashov, Stroeveva, 1964; Jacobson, 1966; Lee et al., 2001; Li, Sakaguchi, 2002; Francisco-Morcillo et al., 2006; Adler, Canto-Soler, 2007), так что GFAP, RT97 и Тут экспрессируются в них в первую очередь. Все приведенные данные показывают, что различные уровни экспрессии белков могут быть обусловлены различным положением ПНС и ППЭС в глазном пузырьке. Известно, что пигментные клетки обычно локализуются в отдаленной маргинальной области, например на поверхности стенки мозга и кожи. ПНС локализуется в более удаленном маргинальном участке, чем ППЭС после образования глазного пузырька. Кроме того, когда глазные пузырьки выпячиваются наружу, ПНС увеличивается, но число клеток в ПНС заметно не возрастает. Так что уровень экспрессии Тут в ПНС был выше, чем в ППЭС, а уровни экспрессии GFAP и RT97 были ниже в начале образования глазного пузырька (рис. 4А, 5А и 6А). Из этих данных следует, что молекулярная дифференцировка связана с положением ткани в начале морфогенеза глазного пузырька.

Кривые экспрессии всех трех белков пересекаются через 5–6 ч после образования глазного пузырька во время прямого контакта глазного пузырька с покрывающей эктодермой (Feng et al., 1984). Известно, что взаимодействие глазного пузырька с покрывающей эктодермой приводит к образованию хрусталика из находящейся в контакте эктодермы и образованию глазной чаши, в которой контактирующая часть глазного пузырька становится внутренней стенкой глазной чаши, т.е. ПНС и остальные части становятся наружной стенкой глазной чаши или ППЭС (Лопашов, Строева, 1961; Лопашов, 1963; Lopashov, Stroeveva, 1964; Jacobson, 1966; Gilbert, 2003). Дифференцировка ПНС и ППЭС активирует экспрессию новых генов или изменяют экспрессию уже активированных генов. В этой работе мы использовали три типа антител, GFAP, RT97 и Тут, которые экспрессируются уже перед образованием глазного пузырька. Так что наши результаты показывают, что взаимодействие между глазным пузырьком и покрывающей эктодермой стимулирует специфическую молекулярную экспрессию и подавляет неспецифическую. Наконец, молекулярная дифференцировка приводит к максимальному уровню экспрессии в нейронах и глиальных клетках в ПНС, тогда как уровень экспрессии Тут оказывается наивысшим в ППЭС. Специфическая молекулярная дифференцировка начинается после установления контакта между глазным пузырьком и эктодермой. Мы предполагаем, что три различных белка проявляют различную экспрессию в ходе дифференцировки различных типов клеток в сетчатке. После взаимодействия нейроны и гли-

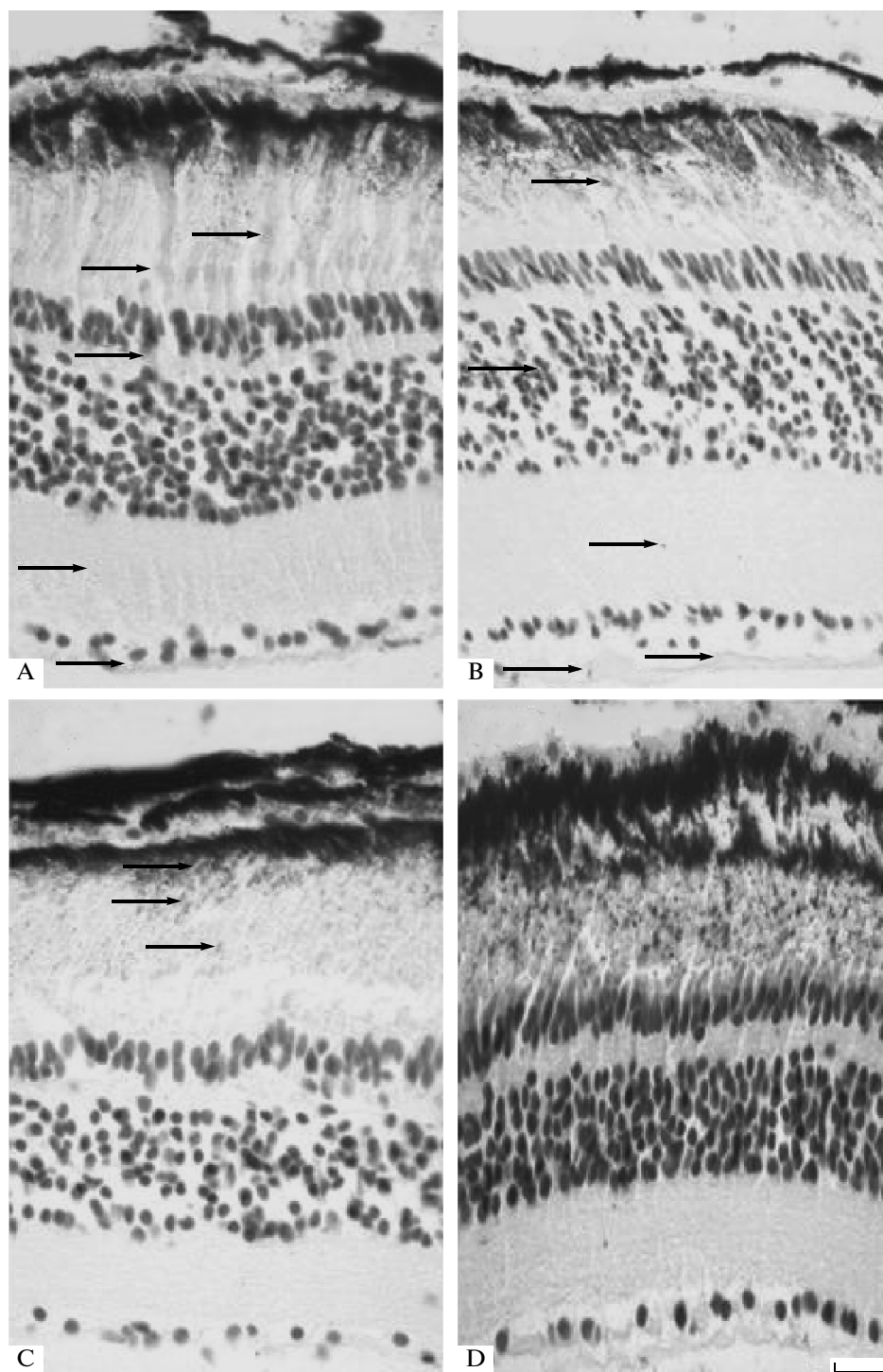


Рис. 3. Иммуногистохимический анализ сетчатки взрослой жабы.

(A) Экспрессия GFAP (показано стрелками) в сетчатке взрослой жабы. (B) Экспрессия RT97 (показано стрелками) в сетчатке взрослой жабы. (C) Экспрессия Tug (показано стрелками) в сетчатке взрослой жабы. (D) Отрицательный контроль. Масштаб 20 мкм.

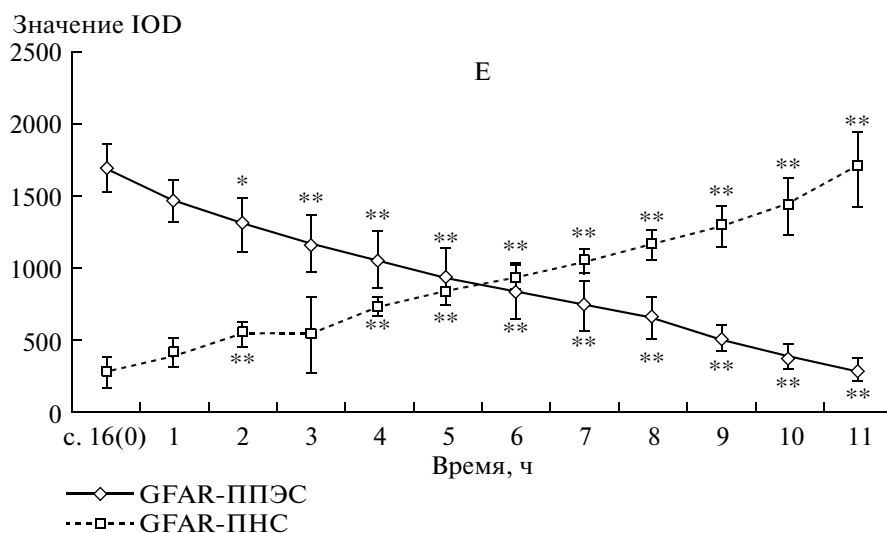
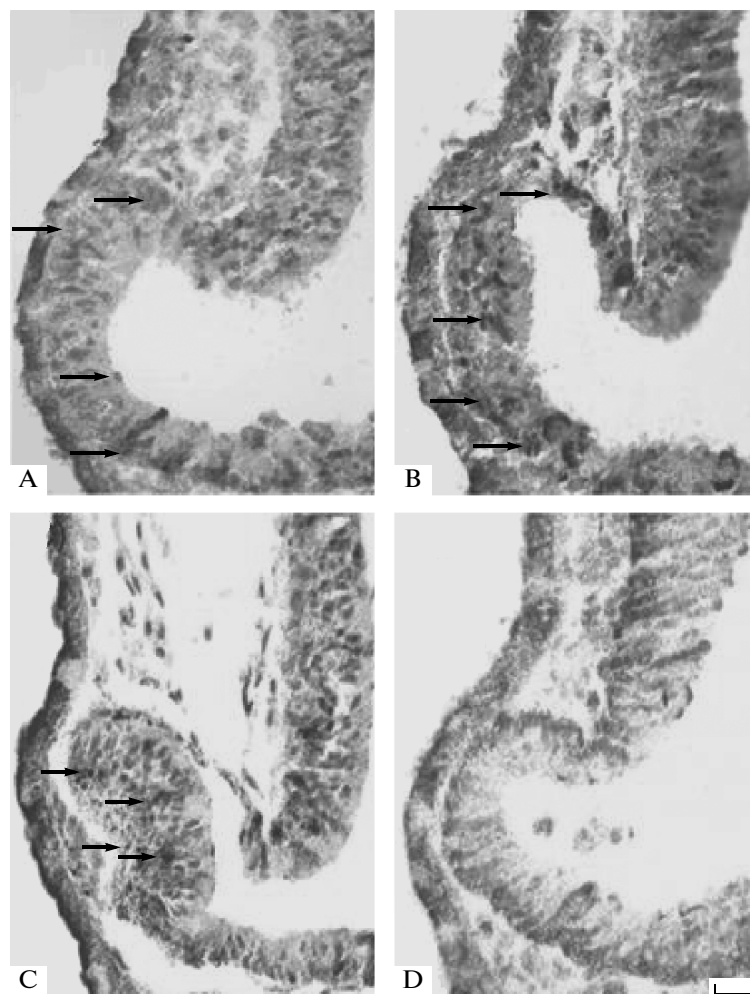


Рис. 4. Динамика экспрессии GFAR в ПНС и ППЭС в раннем морфогенезе глаза.

(А) Уровень экспрессии GFAR (показано стрелками) был низким в вентральной части ПНС через 5 ч после образования глазного пузыря. (В) Уровень экспрессии GFAR (показано стрелками) увеличился через 8 ч после образования глазного пузыря. (С) Уровень экспрессии GFAR (показано стрелками) был наивысшим в ПНС через 11 ч после образования глазного пузыря. (D) Отрицательный контроль. Масштаб 30 мкм. (E) Данные представлены как средние \pm стандартная ошибка ($n = 10$) в каждой группе. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ считали статистически значимыми при сравнении ПНС и ППЭС на стадии 16 (0 ч).

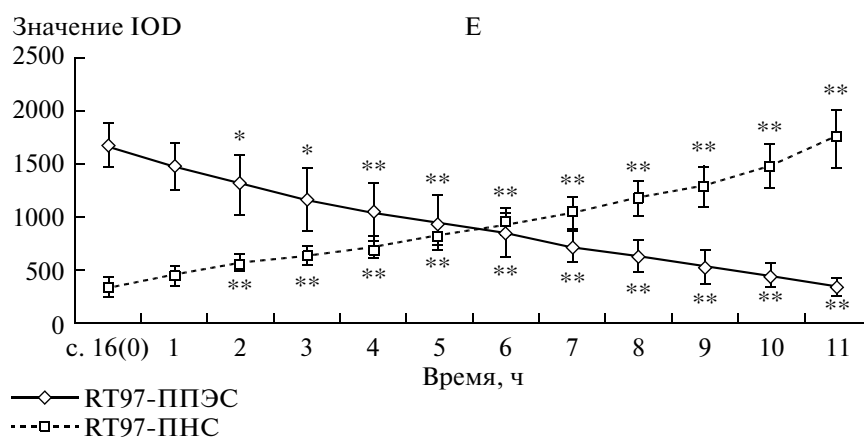
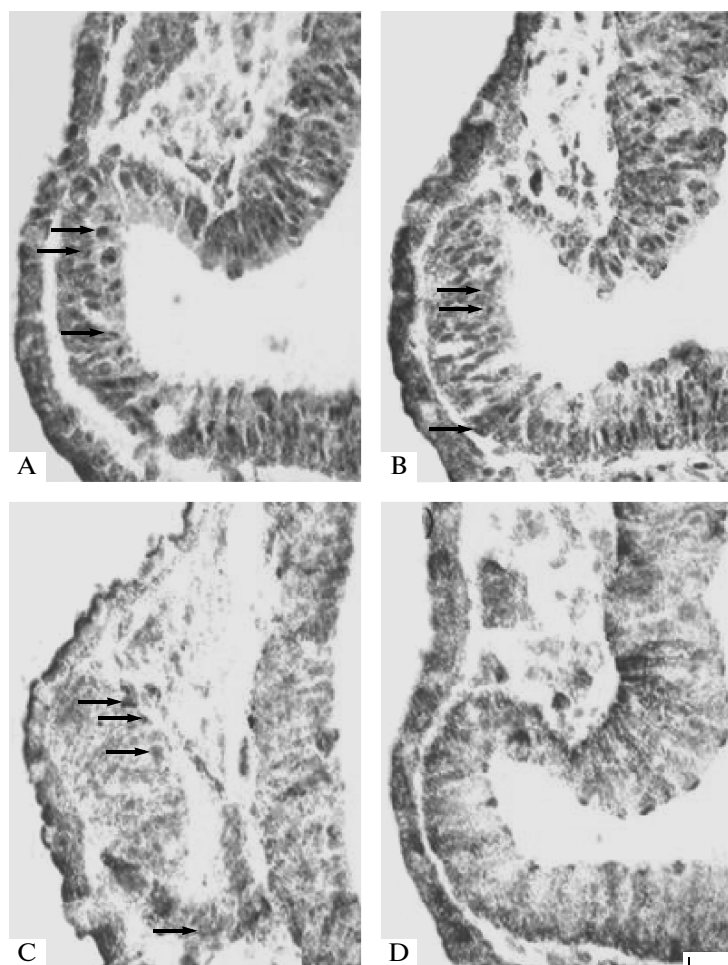


Рис. 5. Динамика экспрессии RT97 в ПНС и ППЭС в раннем морфогенезе глаза.

(А) Уровень экспрессии RT97 (показано стрелками) был низким в ПНС через 4 ч после образования глазного пузырька. (В) Уровень экспрессии RT97 (показано стрелками) увеличился через 9 ч после образования глазного пузырька. (С) Уровень экспрессии RT97 (показано стрелками) был наивысшим в ПНС через 11 ч после образования глазного пузырька. (D) Отрицательный контроль. Масштаб 30 мкм. (Е) Данные представлены как средняя \pm стандартная ошибка ($n = 10$) в каждой группе. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ считали статистически значимыми при сравнении ПНС и ППЭС на стадии 16 (0 ч).

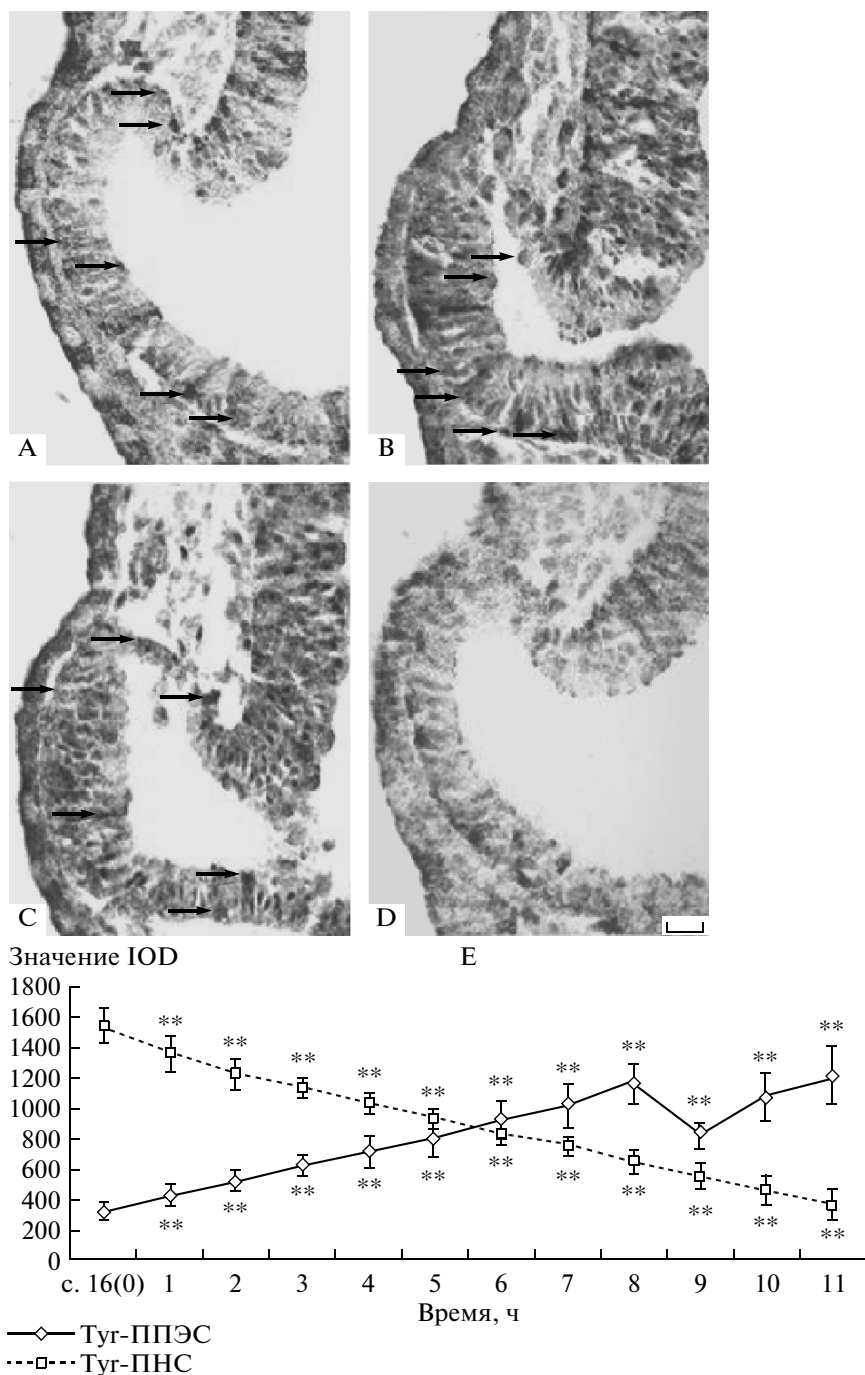


Рис. 6. Динамика экспрессии Tug в ПНС и ППЭС в раннем морфогенезе глаза.

(А) Уровень экспрессии Tug (показано стрелками) был низким в ПНС через 5 ч после образования глазного пузыря. (В) Уровень экспрессии Tug (показано стрелками) увеличился через 7 ч после образования глазного пузыря. (С) Уровень экспрессии Tug (показано стрелками) был наивысшим в ПНС через 10 ч после образования глазного пузыря. (D) Отрицательный контроль. Масштаб 30 мкм. (Е) Данные представлены как средняя \pm стандартная ошибка ($n = 10$) в каждой группе. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ считали статистически значимыми при сравнении ПНС и ППЭС на стадии 16 (0 ч).

альные и пигментные клетки начинают экспрессировать специфические белки в соответствии с их будущими функциями, а не с их положением.

Это исследование было поддержано Национальным фондом естественных наук КНР, проект 30670230.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adler, R. and Canto-Soler, M.V., Molecular Mechanisms of Optic Vesicle Development: Complexities, Ambiguities and Controversies, *Dev. Biol.*, 2007, vol. 305, pp. 1–13.
- Basu, P.K., Sarkar, P., Menon, I., et al., Bovine Retinal Pigment Epithelial Cells Cultured in vitro: Growth Characteristics, Morphology, Chromosomes, Phagocytosis Ability, Tyrosinase Activity and Effect of Freezing, *Exp. Eye Res.*, 1983, vol. 36, pp. 671–683.
- Bharti, K., Nguyen, M.T.T., Skuntz, S., et al., The Other Pigment Cell: Specification and Development of the Pigmented Epithelium of the Vertebrate Eye, *Pigm. Cell Res.*, 2006, vol. 19, pp. 380–394.
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., et al., Localization of the Glial Fibrillary Acidic Protein in Astrocytes by Immunofluorescence, *Brain Res.*, 1972, vol. 43, pp. 429–435.
- Barnstable C.J.A., Molecular View of Vertebrate Retinal Development., *Molecul. Neurobiol.*, 1987, vol. 11, pp. 9–46.
- Canto-Soler, M.V. and Adler, R., Optic Cup and Lens Development Requires Pax6 Expression in the Early Optic Vesicle during a Narrow Time Window, *Dev. Biol.*, 2006, vol. 294, pp. 119–132.
- Coughlin, M.D., Boyer, D.M. and Black, I.B., Embryologic Development of a Mouse Sympathetic Ganglion in Vivo and in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, pp. 3438–3442.
- Cronin, C.A., Ryan, A.B., Talley, E.M., et al., Tyrosinase Expression during Neuroblast Divisions Affects Later Pathfinding by Retinal Ganglion Cells, *J. Neurosci.*, 2003, vol. 23, pp. 11692–11697.
- Cuadros, M.A., García-Martín, M., Martín, C., et al., Haemopoietic Phagocytes in the Early Differentiating Avian Retina, *J. Anat.*, 1991, vol. 177, pp. 145–158.
- Dowling, J.E., *The Retina*. Cambridge, MA: Belknap Press. 1987.
- Eng, L.F., The Glial Fibrillary Acidic Protein: The Major Protein Constituent of Glial Filaments, *Scand. J. Immunol.*, 1982, vol. 15, pp. 41–51.
- Ezeonu, I., Dutt, S. and Smith, K., Differentiation in a Human Retinal Precursor Cell Line: Limitation to Multipotency, in vitro, *Cell Dev-An.*, 1999, vol. 35, pp. 435–440.
- Feng, B.S., Ge, R.C. and Tong, Y.X., Studies on Morphogenesis of *Bufo raddei* Eye, *Acta Herpetol., Sin.*, 1984, vol. 3, pp. 5–10.
- Francisco-Morcillo, J., Hidalgo-Sánchez, M. and Martín-Partido, G., Spatial and Temporal Patterns of Apoptosis during Differentiation of the Retina in the Turtle, *Anat. Embryol.*, 2004, vol. 208, pp. 289–299.
- Francisco-Morcillo, J., Hidalgo-Sánchez, M. and Martín-Partido, G., Spatial and Temporal Patterns of Proliferation and Differentiation in the Developing Turtle Eye, *Brain Res.*, 2006, vol. 1103, pp. 32–48.
- Ge, R.C., Feng, B.S., and Tong, Y.X., The Early Development and Stages of the Toad, *Bufo raddei* Strauch, *J. Lanzhou University (Nature and Science edition)* 1982, vol. 18, pp. 125–136.
- Gilbert, S.F., *Developmental Biology*, Sunderland, MA: Sinauer, 2003.
- Harris W.A. and Perron M., Molecular Recapitulation: The Growth of the Vertebrate Retina, *Int. J. Dev. Biol.*, 1998, vol. 42, pp. 299–304.
- Holt, C.E., A Single-Cell Analysis of Early Retinal Ganglion Cell Differentiation in *Xenopus*: From Soma to Axon Tip, *J. Neurosci.*, 1989, vol. 9, pp. 3123–3145.
- Hyer, J., Mima, T. and Mikawa, T., FGF1 Patterns the Optic Vesicle by Directing the Placement of the Neural Retina Domain, *Development*, 1998, vol. 125, 869–877.
- Jacobson, A.G., Inductive Processes in Embryonic Development, *Science*, 1966, vol. 152, pp. 25–34.
- Julien, S., Kociok, N., Kreppel, F., et al., Tyrosinase Biosynthesis and Trafficking in Adult Human Retinal Pigment Epithelial Cells, *Graef. Arch. Clin. Exp.*, 2007, vol. 245, pp. 1495–1505.
- Kumasaka, M., Sato, S., Yajima, I., et al., Isolation and Developmental Expression of Tyrosinase Family Genes in *Xenopus laevis*, *Pigm. Cell Res.*, 2003, vol. 16, pp. 455–462.
- Lee, C.S., May, N.R. and Fan, C.M., Transdifferentiation of the Ventral Retinal Pigmented Epithelium to Neural Retina in the *growth arrest specific gene 1* Mutant, *Dev. Biol.*, 2001, vol. 236, pp. 17–29.
- Li, M. and Sakaguchi, D.S., Expression Patterns of Focal Adhesion Associated Proteins in the Developing Retina, *Dev. Dynam.*, 2002, vol. 225, pp. 544–553.
- Li, Z., Hu, M., Ochocinska, M.J., et al., Modulation of Cell Proliferation in the Embryonic Retina of Zebrafish (*Danio rerio*), *Dev. Dynam.*, 2000, vol. 219, pp. 391–401.
- Lopashov, G.V., *Developmental Mechanisms of Vertebrate Eye Rudiment*, Oxford, 1963.
- Lopashov, G.V. and Stroeva, O.G., Morphogenesis of the Vertebrate Eye, *Adv. Morphol.*, 1961, vol. 1, pp. 331–370.
- Lopashov, G.V. and Stroeva, O.G., *Development of the Eye: Experimental Studies*, Jerusalem, 1964.
- Martín-Partido, G., Rodríguez-Gallardo, L., Álvarez I.S., et al., Cell Death in the Ventral Region of the Neural Retina during the Early Development of the Chick Embryo Eye, *Anat. Rec.*, 1988, vol. 222, pp. 272–281.
- Messenger, N.J. and Warner, A.E., The Appearance of Neural and Glial Cell Markers during Early Development of the Nervous System in the Amphibian Embryo, *Development*, 1989, vol. 107, pp. 43–54.
- Newton, J.M., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., et al., Mutations in the Human Orthologue of the Mouse *underwhite* Gene (*uw*) Underlie a New Form of Oculocutaneous Albinism, OCA4, *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, vol. 69, pp. 981–988.
- Norkute, A., Kipp, M., Dang, J., et al., Early Formation of a GFAP-Positive Cell Population in the Ventricular Zone during Chicken Brain Development, *Cells Tissues Organs*, 2010, vol. 191, pp. 57–65.
- Rodríguez-Gallardo, L., Lineros-Domínguez, M.D.C., Francisco-Morcillo, J., et al., Macrophages during Retina and Optic Nerve Development in the Mouse Embryo: Relationship to Cell Death and Optic Fibres, *Anat. Embryol.*, 2005, vol. 210, pp. 303–316.

- Schnitzer, J., Distribution and Immunoreactivity of Glia in the Retina of the Rabbit, *J. Comp. Neurol.*, 1985, vol. 240, pp. 128–142.
- Sharma, S., Sharma, M.C., Gupta, D.K., et al., Angiogenic Patterns and Their Quantitation in High Grade Astrocytic Tumors, *J. Neuro-Oncol.*, 2006, vol. 79, pp. 19–30.
- Shin, D.H., Lee, K.S., Lee, E., et al., The correspondence between the Labeling Patterns of Antibody RT97, Neurofilaments, Microtubule Associated Protein 1B and tau Varies with Cell Types and Development Stages of Chicken Retina, *Neurosci. Lett.*, 2003, vol. 342, pp. 167–170.
- Turner, D.L. and Copko, C.L., A Common Progenitor for Neurons and Glia Persists in Rat Retina Late in Development, *Nature*, 1987, vol. 328, pp. 131–136.
- Velasco, A., Bragado, M.J., Jimeno, D., et al., Growing and Regenerating Axons in the Visual System of Teleosts are Recognized with the Antibody RT97, *Brain Res.*, 2000, vol. 883, pp. 98–106.
- Wang, F.C., Liu, Z.H., Si, K.Y., et al., Immunohistochemical Localization of the Medium and High-Weight Neurofilament in the Visual Nervous System of *Carasius auratus*, *Journal of Northwest Normal University (Natural Science)*, 2006, vol. 42, pp. 74–77.
- Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., et al., A Simple and Fast Densitometric Method for the Analysis of Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Substantia Nigra Pars Compacta and in the Ventral Tegmental Area, *Brain Res.*, 2005, vol. 16, pp. 58–64.
- Zhang, S.S., Fu X.Y. and Barnstable, C.J., Molecular Aspects of Vertebrate Retinal Development, *Mol. Neurobiol.*, 2002, vol. 26(2–3), pp. 137–152.

Apoptosis and Differentiation in Presumptive Neural Retina and Presumptive Retinal Pigmented Epithelium during Early Eye Development in Toad, *Bufo raddei* Strauch

W. Han^a, Y.-P. Han^{a,b}, and Z.-R. Wang^a

^a Institute of Developmental Biology, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, 730000 P.R. China

^b College of life Sciences and Techenology, Longdong University, Qingyang, 734000 P.R. China

e-mail: wangzr@lzu.edu.cn

Abstract—Apoptosis and differentiation in presumptive neural retina (PNR) and presumptive retinal pigmented epithelium (PRPE) were investigated during early retina development of toad, *Bufo raddei* Strauch. TUNEL staining was used to evaluate apoptotic cells and the immunohistochemistry was used to assess the expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP), RT97 and tyrosinase (Tyr) during early eye development respectively. The density of apoptotic cells and protein expression were quantitated with Image-Pro Plus 6.0. Apoptosis was found in both PNR and PRPE and the density of apoptotic profiles in PRPE was higher than that in PNR (most $P < 0.01$) at the same stage during early eye development. The expression levels of GFAP and RT97 changed from low to high in PNR, but from high to low in PRPE, whereas the expression level of Tyr, was contrary to those of GFAP and RT97 in both PNR and PRPE. The point of intersection of these, increase and decrease respectively was found at 5–6 h after formation of optic vesicle (FOV). PRPE becomes thinner than PNR, one of the reasons might be due to higher density of apoptosis in PRPE than that in PNR during early eye development. Molecular differentiation, however, occurred after the contact of the optic vesicle outer wall with the overlying ectoderm which promotes the expression of specific molecules and inhibits the expression of non-specific molecules in PNR and PRPE respectively.

Keywords: presumptive neural retina, presumptive retinal pigmented epithelium, apoptosis, differentiation, immunohistochemistry.