

蛇毒神经生长因子对高眼压下兔视网膜髓鞘碱性蛋白的影响

钱道卫 刘金华 杜秀娟 乔峰 廖伟

The effects of venom nerve growth factor on myelin basic protein of retina in rabbits with elevated intraocular pressure

Qian Daowei, Liu Jinhua, Du Xiujian, Qiao Feng, Liao Wei. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract Objective Myelin basic protein (MBP) is key protein in sustaining structure and function stabilization of neuron and nerve fiber myelin sheath. Our previous study demonstrated that venom nerve growth factor (vNGF) has a protection on acute optical nerve damage of rat. Present study was to observe the protective effect of vNGF on retinal ganglion cells (RGCs) in rabbits with elevated intraocular pressure (IOP). **Methods** Chronic ocular hypertention was induced by injection of 0.3% carbomer into anterior chamber of the right eyes in 24 rabbits. The rabbits were divided into two groups randomly. After elevation of IOP continuously for 2 weeks, vNGF was injected into the vitreous of the right eyes of rabbits in the experimental group, and balance salt solution was injected in the control group with matched-IOP for 2 times at a 3-day interval. The eyeballs of rabbits were enucleated and the section samples were prepared at 5 days and 10 days after the last injection. The numbers of the RGCs were counted by using image analysis system. The expression of MBP in rabbit retina was detected by regular HE stain and immunohistochemistry under the light microscope. **Results** Chronic ocular hypertention models were successfully established with the mean IOP (32.93 ± 6.33) mmHg through the experimental period. The numbers of RGCs were 19.25 ± 2.60 and 16.84 ± 1.52 in the experimental group and 12.88 ± 1.46 and 7.63 ± 1.72 in control group at the 5th days and 10th day after injection of 0.3% carbomer, showing statistically significant differences between them ($P < 0.05$). The expression of MBP in rabbit retina was more prominent in control group than in experimental group. **Conclusion** vNGF can reduce the expression of MBP in retina and therefore increase the survival rate of RGCs. vNGF may have a protective effect on the prevention of RGCs from degeneration.

Key words venom nerve growth factor; retinal ganglion cells; intraocular pressure; myelin basic protein

摘要 目的 通过对兔视网膜损伤后髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的研究, 观察蛇毒神经生长因子 (vNGF) 对慢性高眼压下兔视网膜神经节细胞 (RGCs) 的保护作用。 **方法** 24 只大白兔右眼前房注入 0.3% 复方卡波姆溶液 0.1 mL, 制成兔慢性高眼压模型后, 随机分为 vNGF 治疗组和平衡盐液对照组, 分别于眼压缓慢升高 2 周后右眼玻璃体腔内注入 vNGF 和平衡盐液; 3 d 后重复注药 1 次。分别于最后 1 次给药后第 5 d、10 d 取材; 采用病理图像分析仪计数 RGCs 数目; 进行 MBP 免疫组织化学染色分析。 **结果** 前房注入复方卡波姆溶液后, 眼压在 1 周内缓慢升高并维持到实验结束, 平均眼压 (32.93 ± 6.33) mmHg。5 d 时实验组和对照组的 RGCs 分别为 19.25 ± 2.60 和 12.88 ± 1.46 ; 10 d 时实验组和对照组的 RGCs 分别为 16.84 ± 1.52 和 7.63 ± 1.72 , 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组 MBP 表达高于实验组。 **结论** vNGF 能降低高眼压后视网膜 MBP 的含量, 提高 RGCs 的存活数量, 对 RGCs 损伤后的修复有明显的促进作用。

关键词 蛇毒神经因子; 视网膜神经节细胞; 眼压; 髓鞘碱性蛋白

分类号 R 774 文献标识码 A 文章编号 1003-0808 (2009)01-0010-04

本课题为国家自然科学基金项目资助 (30460138)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院眼科 (钱道卫, 研究生, 现在深圳恒生医院眼科 518102)

通讯作者: 刘金华 (Email: jinhua56@hotmail.com.cn)

青光眼是全球第 2 位的致盲性眼病。视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 是青光眼视神经保护治疗的主要靶细胞^[1]。髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 是广泛存在于中枢神经系统少突胶质细胞及其髓鞘中的骨架蛋白, 是维持神经元和神经纤维髓鞘结构和功能稳定的重要物质基础^[2]。我们以前的研究证实蛇毒神经生长因子 (venom nerve growth factor, vNGF) 对大鼠视神经急性损伤具有保护作用^[3]。本实验将 vNGF 用于兔青光眼模型, 通过观察 RGCs 数目的变化及 MBP 免疫组织化学的表达, 进一步研究 vNGF 在视神经保护和修复中的作用, 探索治疗视神经病变的新途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

健康成年大耳白兔 24 只 (广西医科大学动物实验中心提供), 兔龄 10~14 个月、体重 3.5~4.0 kg, 雌雄不限, 眼部检查无异常。vNGF (广西医科大学蛇毒研究所); 卡波姆 940 (北京国人逸康科技有限公司), 地塞米松注射液 (浙江仙居医药公司), 二者配制成 0.3% 复方卡波姆溶液 (含地塞米松 0.25 g/L); MBP 单克隆抗体和 DAB 试剂 (上海长岛生物技术有限公司)。

1.2 慢性青光眼模型制作

按照徐岩等^[4]的方法制作慢性青光眼模型。由专人配合, 固定白兔, 丁卡因滴眼液点眼 2 次, Schiötz 眼压计测量基础眼压并记录, 每只眼测量 3 次, 取平均值, 平均基础眼压为 (16.5 ± 2.14) mmHg ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)。盐酸氯胺酮和盐酸氯丙嗪 1:2 混合, 取 50 mg/kg 腹腔内注射, 右眼前房注入 0.3% 复方卡波姆 0.1 mL。每日观察右眼情况, 每 3 d 测眼压 1 次, 眼压 ≥ 22 mmHg 并维持 1 周者为造模成功。若眼压 < 22 mmHg, 则前房重复注药 1 次。左眼为正常对照眼, 不做任何处理。

1.3 实验分组

造模成功 1 周后, 采用随机数字表法将 24 只兔分为 vNGF 治疗组和平衡盐液对照组, 两组间的眼压值差异无统计学意义。分别于眼压缓慢升高 2 周后右眼玻璃体腔内注入 vNGF 25 μg (0.025 mL) 和 0.025 mL 平衡盐液。3 d 后重复给药 1 次, 共 2 次。

1.4 取材及标本制作

分别于玻璃体腔最后一次给药后第 5 d、第 10 d 取材, 每次 12 只兔, 每组各取 6 只。耳缘静脉注射 10 mL 空气, 栓塞致死, 立即完整摘除眼球, 并在 12 点钟方位角膜缘缝线标记, 中性甲醛固定 24 h, 75% 乙醇梯度脱

水, 平行于视神经纵行剖开眼球, 二甲苯透明、浸蜡、包埋, 平行于眼球剖面通过视神经做 5 μm 常规石蜡连续切片, 常规苏木精-伊红染色, 光镜下观察兔视网膜各层组织结构情况。

1.5 免疫组织化学染色检测 MBP

切片脱蜡、水化。PBS 缓冲液洗 2 次; 乙醇脱水, 高压煮沸抗原修复; PBS 缓冲液洗 5 min, 滴加正常山羊血清封闭液; 滴加一抗 (MBP 单克隆鼠抗), 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h; PBS 缓冲液洗 3 次, 滴加生物素化二抗, 20 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min; PBS 缓冲液洗 3 次, DAB 显色, 镜下控制反应时间, 蒸馏水洗, 苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 脱水、透明、封片、显微镜下观察。

1.6 阅片与图像分析

切片标本由专人进行光镜组织学检查。应用图像分析系统 ($\times 400$) 测量每张标本自视神经两旁 1.5 mm 起, 每侧选择 2 个 (共 4 个) 高倍视野, 计数 RGCs 数。每只眼的连续 4 张切片的平均值作为细胞密度值。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学分析。记数 RGCs 数目, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间 RGCs 数目的比较采用独立样本的 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验期间兔眼压情况

前房注入复方卡波姆溶液后, 眼压缓慢升高, 1 周后均超过 22 mmHg, 峰值眼压为 46~55 mmHg, 平均 (32.93 ± 6.33) mmHg, 并维持到实验结束 (图 1)。注药后结膜充血、水肿, 角膜雾状混浊, 18 只眼前房可见渗出。7~10 d 后充血减轻, 渗出吸收, 角膜透明。

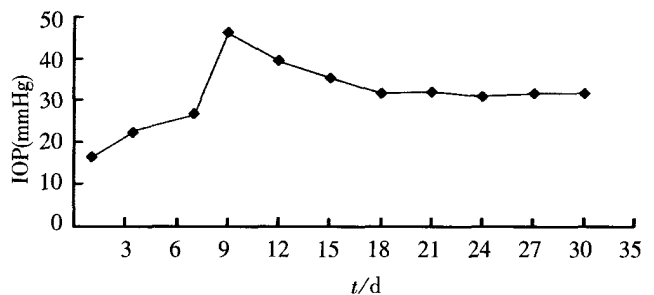


图 1 实验期间兔眼压情况

Fig. 1 The IOP status during the experimental period

2.2 两组 RGCs 数目的比较

兔眼视网膜和人眼视网膜形态相似, 节细胞也为单层, 但数目少, 细胞大小不一, 呈椭圆形, 边界清楚。

高眼压组视网膜各层组织呈现不同程度的损伤。vNGF 治疗组和平衡盐液对照组视网膜均变薄,各层结构仍可见,RGCs 数目减少;但 vNGF 组 RGCs 的数目较多,二者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1,图 2~5)。

表 1 vNGF 治疗组和平衡盐液对照组 RGCs 计数($\bar{x} \pm s$, 个/视野)
Table 1 RGCs counts of vNGF group and balance salt group($\bar{x} \pm s$, cells/field)

Group	RGCs counts in different time	
	5th d	10th d
vNGF	19.25 ± 2.60	16.84 ± 1.52
Balance salt solution	12.88 ± 1.46	7.63 ± 1.72
<i>t</i>	4.78	8.77
<i>P</i>	0.00	0.00

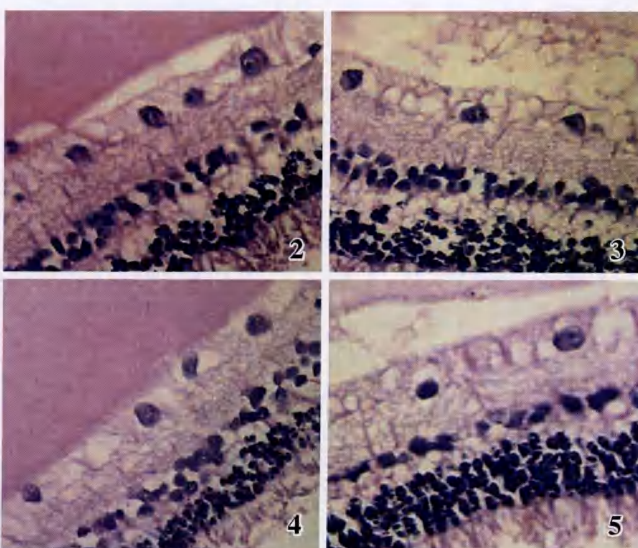


图 2 vNGF 组第 5 d 视网膜染色(HE × 400) 图 3 平衡盐液组第 5 d 视网膜染色(HE × 400) 图 4 vNGF 组第 10 d 视网膜染色(HE × 400) 图 5 平衡盐液组第 10 d 视网膜染色(HE × 400)

Fig.2 Retina staining in vNGF group in the 5th day(HE × 400)
Fig.3 Retina staining in balance salt solution group in the 5th day(HE × 400) Fig.4 Retina staining in vNGF group in the 10th day(HE × 400) Fig.5 Retina staining in balance salt solution group in the 10th day(HE × 400)

2.3 免疫组织化学染色结果

最后 1 次注药 5 d 时两组 RGCs 的胞浆均可见 MBP 阳性表达,呈棕色,平衡盐液对照组为强阳性;10 d 时平衡盐液对照组 MBP 仍表达明显,vNGF 治疗组无变化(图 6~9)。

3 讨论

随着对青光眼视神经损害机制研究的深入,青光眼视神经保护的概念被越来越多的人接受。青光眼视

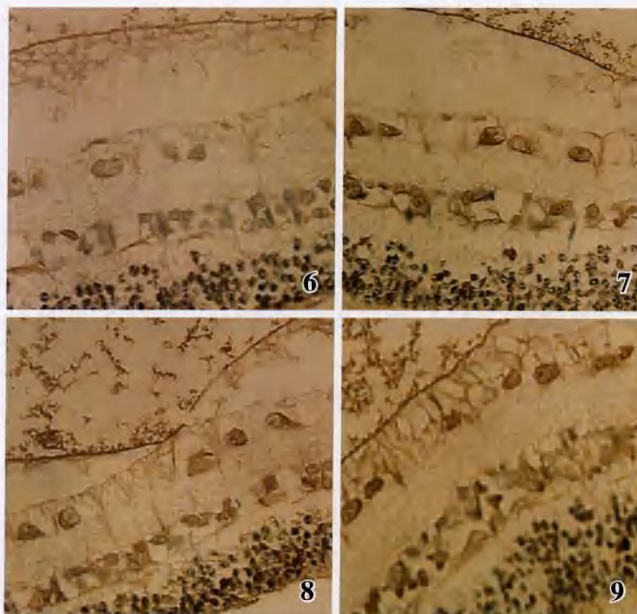


图 6 vNGF 组第 5 d 视网膜 MBP 免疫组织化学染色 图 7 平衡盐液组第 5 d 视网膜 MBP 免疫组织化学染色 图 8 vNGF 组第 10 d 视网膜 MBP 免疫组织化学染色(× 400) 图 9 平衡盐液组第 10 d 视网膜 MBP 免疫组织化学染色(× 400)

Fig.6 The immunohistochemical positive staining for MBP in the 5th day in RGCs of vNGF group(× 400) Fig.7 The immunohistochemical positive staining for MBP shows stronger brown colour than vNGF group in the 5th day in RGCs of balance salt solution group(× 400) Fig.8 No obvious change was seen in the immunohistochemical staining in the 10th day in RGCs of vNGF group(× 400) Fig.9 The immunohistochemical positive staining for MBP still presented stronger brown colour in the 10th day in RGCs of balance salt solution group(× 400)

神经保护有两个目的:(1)挽救和修复受损的视网膜神经细胞;(2)保护尚正常的视网膜神经细胞免受细胞毒性刺激^[5]。目前,寻找神经修复与再生的有效手段已成为现代神经生物领域的热点。

vNGF 生物作用极广,可在脑毛细血管内壁上特异性受体的介导下,使 NGF 穿越血脑屏障到达脑组织,给神经元提供有效的营养,抑制神经元退变,促进病变组织的修复与再生,且可促进周围受损神经运动和感觉功能的恢复^[6]。研究认为 NGF 对 RGCs 具有一定的保护作用^[7-8]。在视神经轴突损伤的早期,给予 NGF 对类似疾病的治疗有促进作用^[9]。

MBP 是目前所知的构成中枢神经系统髓鞘的唯一结构蛋白,有髓鞘的“管理分子”之称^[10]。在少突胶质细胞内以共价键结合于髓磷脂浆膜面^[11],同时也与细胞骨架微管、微丝相连^[12]。MBP 具有多种功能,生理状态下其含量很低,只有在神经组织变性发生脱髓鞘改变时才会显著升高,故 MBP 含量的变化能特异性地反映脱髓鞘损害程度,进而反映神经组织的病程程

度^[13]。

我们通过将 vNGF 和平衡盐液分别直接注射入玻璃体腔内,观察到第 5 d 和第 10 d 治疗组 RGCs 数目无明显变化,MBP 免疫组织化学表达稳定;而平衡盐液对照组 RGCs 数目继续减少,MBP 表达持续呈现强阳性,两者相比,差异有统计学意义。视神经受到损伤后,RGCs 轴突受损,轴浆流运输受到阻滞,RGCs 失去靶细胞分泌的逆行性神经营养因子的营养,导致细胞凋亡发生^[14]。轴突受损越严重,髓鞘脱落越多,MBP 表达越明显,结果 RGCs 数目越少。通过 vNGF 干预后,MBP 表达稳定,RGCs 数目无明显变化,而对照组 MBP 表达仍明显,RGCs 数目减少。在少突胶质细胞的细胞骨架形成过程中,MBP 对微管形成和稳定有调节作用^[15-18],而微管是轴浆流运输的主要物质基础。推测 vNGF 通过减轻轴突损伤,减少髓鞘的脱落,使轴浆流恢复,保护细胞骨架的完整,从而促进了 RGCs 损伤后的修复。

综上所述,本实验通过将 vNGF 直接注射入玻璃体腔内,观察了 MBP 含量的变化及 RGCs 数目的变化,从髓鞘变化的角度探讨了 vNGF 对 RGCs 损伤的修复作用,为进一步研究视神经的再生提供实验基础,对视神经损伤的临床治疗有一定的指导意义。

参考文献

- Schober MS, Chidlow G, Wood JP, et al. Bioenergetic-base neuroprotection and glaucoma[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2008, 36(4): 377-385
- Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(17): 1945-1961
- 唐秀武,刘金华,王瑛,等. 蛇毒神经生长因子对大鼠视神经夹伤保护的电镜观察[J]. 眼科新进展, 2006, 26(5): 328-330
- 徐岩,陈祖基,宋洁贞. 复方卡波姆诱发的兔高血压模型与其它兔高血压模型的比较研究[J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(3): 172-175

- 葛坚. 青光眼防治工作中面临的问题与挑战[J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(6): 321-324
- 雷丹青,李晓旸,舒雨雁. 中华眼镜蛇毒神经生长因子的研究[J]. 广西医学, 1997, 4(1): 48-52
- Hamburger V. The history of the discovery of the never growth factor[J]. J Neurobiol, 1993, 24(7): 893-897
- Lambiase A, Centofanti M, Micera A, et al. Nerve growth factor (NGF) reduces and NGF antibody exacerbates retinal damage induced in rabbit by experimental ocular hypertension [J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 1997, 235(12): 780-785
- 王晓英. 视网膜中神经生长因子及其受体作用研究新进展[J]. 眼科新进展, 2004, 24(4): 320-322
- Moscarello MA. Myelin basic protein, the "executive" molecule of the myelin membrane. // Juurlink BHJ, eds. Cell Biology and Pathology of Myelin: Evolving Biological Concepts and Therapeutic Approaches[M]. New York: Plenum, 1997: 13-25
- Zahs KR, Bigomia V, Deschepper CF. Characterization of "plasma proteins" secreted by cultured rat macroglial cells[J]. Glia, 1993, 7(2): 121-133
- Dyer CA, Benjamins JA. Organization of oligodendroglial membrane sheets. I: Association of myelin basic protein and 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase with cytoskeleton [J]. J Neurosci Res, 1989, 24: 201-211
- Omana-Zapata I, Khabbaz MA, Hunter JC, et al. QX-314 inhibits ectopic nerve activity associated neuropathic pain[J]. Brain Res, 1997, 771(2): 228-237
- 林丁,陈琛. 青光眼的视网膜神经节细胞损伤及其保护[J]. 中华眼科杂志, 2005, 41: 1144-1148
- Dyer CA, Philibotte TM, Billings-Gagliardi S, et al. Cytoskeleton in myelin-basic-protein-deficient shiverer oligodendrocytes [J]. Dev Neurosci, 1995, 17: 53-62
- Dyer CA, Philibotte T, Wolf MK, et al. Regulation of cytoskeleton by myelin components: studies on shiverer oligodendrocytes carrying an Mbp transgene [J]. Dev Neurosci, 1997, 19: 395-409
- Galiano MR, Andrieux A, Deloulme JC, et al. Myelin basic protein functions as a microtubule stabilizing protein in differentiated oligodendrocytes [J]. J Neurosci Res, 2006, 84: 534-541
- Harauz G, Musse AA. A tale of two citrullines-structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease [J]. Neurochem Res, 2007, 32(2): 137-158

(收稿:2008-09-10 修回:2008-11-10)

(本文编辑:胡纯钢 刘艳)

· 病例报告 ·

颅内静脉窦血栓形成误诊一例

魏为 唐罗生 朱小华

患者,男,60岁。因双眼视力下降伴阵发性头痛1个月于2008年6月首次就诊于我院眼科。既往身体健康。眼科检查:视力右眼0.2,左眼0.3;双眼前节未见明显异常,双眼底视盘水肿(图1)。荧光素眼底血管造影(FFA)结果提示为缺血性视盘病变(图2);中心视野不规则向心性缩小(图3)。头部MRI鞍区平扫加增强扫描未见明显异常。胸片、血沉检查正常。

初步诊断:(1)双眼视神经炎?(2)双眼缺血性视盘病变?给予甲基强的松龙500mg冲击治疗3d,全身应用营养视神经、扩张微血管药物。治疗后症状稍缓解,7月份患者在外院住院治疗,仍给予糖皮质激素及相关辅助治疗。患者视力进行性下降,于8月下旬至我院复诊。视力右眼指数/20cm,左眼0.05,双眼底视盘水肿同前。建议患者就诊于神经内科,MRI检查提示轻度脑白质变性,双侧海马异常强化灶,建议追踪复查。再次头颅MRI增强扫描发现上矢状窦、窦汇内可见长条状充盈缺