

bFGF 对兔眼视网膜挫伤 Müller 细胞 Vimentin 表达的影响

朱丽 谢伯林 宋艳萍 邓海波 孔祥斌

Effect of bFGF on the expression of Vimentin in retinal Müller cells in experimental retina blunt trauma

Zhu Li, Xie Bolin, Song Yanping, Deng Haibo, Kong Xiangbin. Department of Ophthalmology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan 430070, China

Abstract Objective Reactive gliosis which can promote the recovery of retina function at early stage of trauma, and basic fibroblast growth factor (bFGF) can activate Müller cells to accelerate healing of blunt trauma. Present study was to investigate the effect bFGF on Vimentin expression in Müller cells in experimental rabbit retinal blunt trauma. **Methods** An animal model of retinal blunt trauma was established in 24 rabbits by contusion of 3 J with a free falling iron bar. The model rabbits were divided into bFGF group, normal saline control group, trauma group and 2 normal rabbits were as control group. 10 μ L of bFGF (2 μ g) was intravitreously injected in bFGF group and the equal volume of normal saline was used in the normal saline control group after 3 days of retinal blunt trauma at a 2-day interval. The experimental rabbits were sacrificed and eyeballs were enucleated in 3 hours, 1 day, 3 days, 7 days and 14 days to evaluate the Vimentin expression in Müller cells by immunocytochemistry. **Results** The expression of Vimentin in Müller cells was increased markedly whatever in the intensity or quantity and showed a time-dependent manner in both bFGF group and normal saline group. The statistically significance differences were seen in Vimentin expression between bFGF group and normal saline group in 1 day, 3 days, 7 days and 14 days after retinal blunt trauma ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** bFGF can enhance the expression of Vimentin in Müller cells and activate Müller cells to accelerate repairing of retinal blunt trauma.

Key words bFGF; Müller cells; Vimentin

摘要 目的 研究碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对兔视网膜挫伤后 Müller 细胞的影响。**方法** 26 只白兔通过 3 J 能量自由落体的方式制作兔眼挫伤性视网膜病变模型,随机分为 bFGF 实验组、生理盐水对照组、单纯挫伤组、正常对照组。其中正常对照组 2 只(4 只眼),单纯挫伤组 4 只(8 只眼),bFGF 实验组和生理盐水对照组各 10 只(20 只眼)。bFGF 实验组每 2 d 玻璃体内注射 bFGF 2 μ g (10 μ L),生理盐水对照组注射生理盐水 10 μ L。采用免疫组织化学染色检测视网膜挫伤后 3 h, 1, 3, 7, 14 d 各时间点 Müller 细胞波形蛋白(Vimentin)的表达。**结果** bFGF 实验组视网膜 Müller 细胞 Vimentin 的表达高于生理盐水对照组,且呈上升趋势,两组比较各时段差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** bFGF 可以增强视网膜 Müller 细胞 Vimentin 的阳性表达,加速 Müller 细胞的活化,促进损伤修复。

关键词 碱性成纤维细胞生长因子; Müller 细胞; Vimentin

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)01-0032-03

视网膜挫伤可引起严重的视觉功能障碍^[1], Müller 细胞是视网膜中的主要神经胶质细胞。研究发现视网膜损伤后早期 Müller 细胞即出现反应性胶质化,对损伤后的恢复具有重要作用^[2]。Müller 细胞反

应性胶质化以细胞增生和肥大特征,表现为在视网膜 Müller 细胞特异性表达的 10 nm 的中间丝(intermediate filaments, Ifs)表达增加,而胶质细胞纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和波形蛋白(Vimentin)是 Ifs 的主要成分^[3]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种多功能生物活性物质,可促进神经元存活和轴突的再生,

作者单位:430070 武汉,广州军区武汉总医院眼科(朱丽、宋艳萍);650032 昆明,成都军区昆明总医院眼科(谢伯林、邓海波、孔祥斌)
通讯作者:朱丽(Email: zhuli5@medmail.com.cn)

有利于损伤的修复^[4]。有研究证实玻璃体腔中注射 bFGF 能够到达视网膜表面与相关受体结合,促进视网膜神经组织损伤再修复^[5]。我们采用免疫组织化学染色研究 bFGF 对视网膜挫伤后 Müller 细胞 Vimentin 表达变化的影响,探讨 bFGF 对视网膜挫伤的影响作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年日本大耳白兔 26 只(52 只眼),雌雄兼用,体重 1.5 ~ 2.5 kg,外眼及眼底散瞳检查均正常。采用随机数字表法随机分为 4 组:bFGF 实验组、生理盐水对照组、单纯挫伤组、正常对照组。其中正常对照组 2 只(4 只眼);单纯挫伤组 4 只(8 只眼);bFGF 实验组和生理盐水对照组各 10 只(20 只眼);bFGF 实验组和生理盐水对照组又根据伤后 3 h, 1、3、7、14 d 分成 5 个小组,每小组 2 只(4 只眼)。

1.1.2 主要试剂 bFGF(2 000 Au/瓶,批号 20040101,北京双鹭药业有限公司);Vimentin 抗体(1:50,丹麦 Dako 公司);Envision(丹麦 Dako 公司);SP 免疫组织化学染色试剂盒、DAB(二氨基联苯胺)显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 采用文献[6]的方法,通过用 3 J 能量自由落体的铁球撞击眼球的方式制作兔视网膜挫伤模型。在双眼建立视网膜挫伤模型后采用 50 μ L 微量注射器于任意一侧眼颞上方角膜缘后 4 mm 向玻璃体腔内注入 bFGF 2 μ g(10 μ L) 作为 bFGF 实验组,同法另一侧眼玻璃体腔内注射生理盐水 10 μ L,作为生理盐水对照组。因 bFGF 在玻璃体腔中逐渐代谢,约 48 h 后失去其生物活性,故在伤后 3、7、14 d 组中 bFGF 实验组每 2 d 同法同剂量重复注射 1 次^[7]。

1.2.2 检测样品制备及免疫组织化

学染色 各组分别于伤后 3 h, 1、3、7、14 d 将兔麻醉致死摘除眼球,放入 10% 甲醛溶液中固定 48 h 后充分水洗,常规逐级 75% 乙醇脱水,切去眼前节和玻璃体,从视盘颞侧 2 mm 处垂直切开眼球,石蜡包埋,做径线方向的垂直 5 μ m 厚的切片。切片脱蜡、水化, PBS 液漂洗 3 次,胰蛋白酶消化法抗原修复, H₂O₂ 作用 10 min, PBS 液漂洗 3 次,滴加稀释的一抗(浓缩型鼠抗人 Vimentin 抗体), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;阴性对照采用 PBS 液代替一抗, PBS 液漂洗,滴加 Envision 1 滴,显色, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 液漂洗, SABC 法染色, DAB 显色,在显微镜下控制显色程度,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,光学显微镜下观察结果。

1.2.3 结果判定 每只眼球取 3 张切片,每张切片于 400 倍显微镜下随机选取 5 个视野,采用计算机图像分析仪对 Vimentin 阳性染色的平均灰度值进行测量,求其平均值代表该切片的测量值为 Vimentin 阳性染色强度。

1.3 统计学方法

计量资料所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计学分析。对挫伤后不同时间点各组 Vimentin 的总体比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

正常兔视网膜 Vimentin 弱阳性表达,主要位于 Müller 细胞的胞体,形成垂直于视网膜长轴的丝状浅棕色染色,终足处着色较深, Müller 细胞的形态大致呈

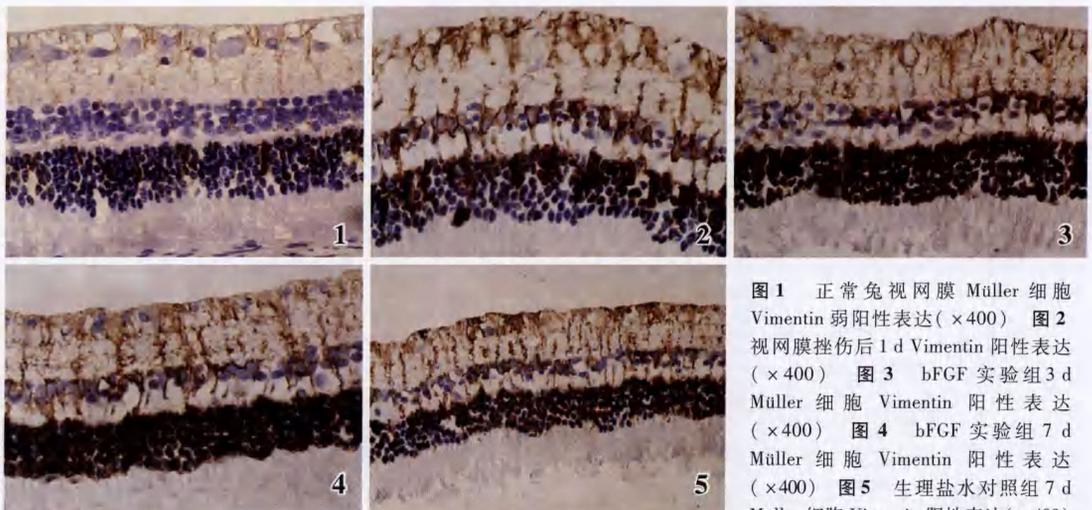


Fig. 1 Weak antivimentin labeling in the Müller cell was seen in normal rabbit retina **Fig. 2** Positive antivimentin labeling in the Müller cell was seen in the Müller cells on 1 day in trauma group **Fig. 3** Positive antivimentin labeling was found in Müller cells on the 3rd day in bFGF group **Fig. 4** On the 7th day after trauma, antivimentin heavy labeling in Müller cell extended into all layers of retina in bFGF group **Fig. 5** Positive antivimentin labeling was found in Müller cells on the 7th day in normal saline group

图 1 正常兔视网膜 Müller 细胞 Vimentin 弱阳性表达($\times 400$) **图 2** 视网膜挫伤后 1 d Vimentin 阳性表达($\times 400$) **图 3** bFGF 实验组 3 d Müller 细胞 Vimentin 阳性表达($\times 400$) **图 4** bFGF 实验组 7 d Müller 细胞 Vimentin 阳性表达($\times 400$) **图 5** 生理盐水对照组 7 d Müller 细胞 Vimentin 阳性表达($\times 400$)

现(图1)。视网膜挫伤后1 d Vimentin 的阳性表达开始增强(图2),7 d 时表达最强,14 d 时略有下降,但仍处于一个较高水平。bFGF 实验组和生理盐水对照组显示视网膜挫伤后 Müller 细胞的 Vimentin 表达增强,生理盐水对照组 Vimentin 表达变化与单纯挫伤组相比差异无统计学意义。bFGF 实验组 Vimentin 表达高于生理盐水对照组,且一直到14 d 仍呈现上升趋势。bFGF 实验组3 d 时可见自内界膜至外界膜垂直于视网膜的条索状、斑块状棕色 Vimentin 阳性染色(图3)。bFGF 实验组7 d 时可见贯穿视网膜全层的浓密的深棕色 Vimentin 阳性染色,并可在内丛状层见到一些突起相互交织形成网状(图4),生理盐水对照组视网膜挫伤后7 d 视网膜 Vimentin 的阳性表达最强(图5)。视网膜挫伤后3 h bFGF 实验组与生理盐水对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各时间点 bFGF 实验组与生理盐水对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

控神经元内环境的稳定,发挥神经保护作用,从而起到修复作用。与此同时,Müller 细胞还可分泌多种活性物质,激活视网膜内的小胶质细胞等免疫细胞,参与相应的病理损伤和修复过程^[12]。

本研究观察到兔眼视网膜挫伤后1 d Vimentin 的阳性表达开始增强,随着伤后时间的推移表达进一步增强,随着视网膜挫伤时间的延长,Vimentin 的免疫染色范围也逐渐向外扩展,Müller 细胞数量增多,细胞胞体体积增大,突起增多、延长,并呈现着色加深的强阳性表达,说明反应性胶质化中 Müller 细胞的功能活跃,合成增加。生理盐水对照组 Vimentin 表达变化与单纯挫伤组相比差异无统计学意义,说明生理盐水对视网膜挫伤后 Müller 细胞的 Vimentin 表达无影响。bFGF 治疗组视网膜 Müller 细胞 Vimentin 的表达均明显高于生理盐水对照组,说明 bFGF 对视网膜挫伤后 Müller 细胞的 Vimentin 的表达具有上调作用,可加速 Müller 细胞的活化,促进损伤修复。本研究为研究外源性 bFGF 对视网膜损伤的治疗作用机制提供了理论基础。

表1 各组兔视网膜 Müller 细胞 Vimentin 平均灰度值($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The mean gray scale value of Vimentin in retinal Müller cells in different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	Vimentin expression in different time				
	3 h	1 d	3 d	7 d	14 d
Normal	80.13 ± 10.18	78.91 ± 9.82	80.00 ± 11.40	81.48 ± 7.49	80.86 ± 13.32
Trauma	81.46 ± 7.05	86.20 ± 10.53 ^b	98.60 ± 12.90 ^c	103.40 ± 8.49 ^c	100.92 ± 11.22 ^c
Normal saline	81.39 ± 10.22	86.11 ± 11.08 ^b	98.13 ± 10.55 ^c	107.20 ± 10.24 ^c	104.08 ± 9.13 ^c
bFGF	82.27 ± 9.63	97.97 ± 10.70 ^c	115.09 ± 13.74 ^e	121.58 ± 12.49 ^e	127.65 ± 10.35 ^f
F	18.247	14.931	15.565	24.121	29.692
P	0.831	0.014	0.022	0.000	0.00

^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs normal group, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs normal saline group

3 讨论

bFGF 具有多种生物学功能:促进多种细胞的分裂增生,诱导细胞的分化;对内皮细胞、星形胶质细胞等有趋化作用;具有神经营养因子的作用,可促使神经元存活和轴突的再生,有利于损伤的修复^[8-9]。Pettmann 等^[10]的研究还证实 bFGF 可诱发视网膜再生,bFGF 在视网膜的发育、生长和修复中起着重要作用。Müller 细胞是视网膜中特有的和最主要的胶质细胞,贯穿整个视网膜全层,在视网膜的病理、生理过程中起着重要的作用。在视网膜损伤中 Müller 细胞对损伤呈高反应性,即出现反应性胶质化,Müller 细胞反应性胶质化以细胞增生和肥大其特征,GFAP 和 Vimentin 表达增加^[11]。Müller 细胞的胶质化增生填补了神经元坏死的空间,维持了残存神经细胞的生存,调

参考文献

- 1 宋绣雯,王元芳,尤毅.眼挫伤的组织损害(附204例报告)[J].眼外伤职业眼病杂志,1996,13(2):127-129
- 2 刘大维,谢伯林,周继红,等.兔眼冲击伤后视网膜损伤的病理学变化[J].创伤外科杂志,2001,3(4):272-274
- 3 Mack AF, Germer A, Janke C, et al. Müller cells in the teleost retina: consequence of continous growth[J]. Glia, 1998, 22(3): 306-313
- 4 Blanco RE, Lopez-Roca A, Svoto J, et al. Basic fibroblast growth factor applied to the optic never after injury increase long-term cell survival in the frog retina[J]. J Comp Neurol, 2000, 423(4): 646-658
- 5 Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasimura D, et al. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor[J]. Nature, 1990, 347: 83-86
- 6 窦宏亮,宋琛.眼球钝挫伤后视网膜组织及超微结构的变化[J].眼外伤职业眼病杂志,1993,15(1):8-10
- 7 Borhani H. Vitreoretinal toxicity of basic fibroblast growth factor[J]. Int Ophthalmol, 1993, 17(4): 195-199
- 8 Zhao S, Thomquist SC, Barnstable CJ, et al. In vitro transdifferentiation of embryonic rat retinal pigment epithelium to neural retina[J]. Brain Res, 1995, 677(2): 300-310
- 9 袁洪峰,刘少章,贺翔鹤.碱性成纤维生长因子在视神经中的表达及在视神经损伤后的反应[J].眼科研究,2002,20(2):132-134
- 10 Pettmann B, Weibel M, Sensenbrenner M, et al. Purification of two astroglial growth factors from bovine brain[J]. FEBS Lett, 1985, 189(1): 102-108
- 11 Lewis CP, Matsumoto B, Fisher SK. Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachments[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36: 2404-2416
- 12 Wen R, Cheng T, Li Y, et al. Alpha 2-adrenergic agonists induce basic fibroblast growth factor expression in photoreceptors in vivo and ameliorate light damage[J]. J Neurosci, 1996, 16(19): 5986-5992

(收稿:2008-03-07 修回:2008-10-23)

(本文编辑:胡纯钢 刘艳)