

# 兔眼钝挫伤后视网膜 Müller 细胞 GFAP 表达的变化

邓海波<sup>1</sup>, 谢伯林<sup>2</sup>, 朱 丽<sup>2</sup>, 孔祥斌<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(335000) 中国江西省鹰潭市人民医院眼科;  
<sup>2</sup>(650032) 中国云南省昆明市, 成都军区昆明总医院眼科  
作者简介: 邓海波, 毕业于昆明医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼底病、眼外伤。

通讯作者: 邓海波. bohaideng@126.com

收稿日期: 2012-04-16 修回日期: 2012-08-06

## Expression of GFAP in Müller cells after mild blunt ocular trauma in rabbits

Hai-Bo Deng<sup>1</sup>, Bo-Lin Xie<sup>2</sup>, Li Zhu<sup>2</sup>, Xiang-Bin Kong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Yingtan, Yingtan 335000, Jiangxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Kunming General Hospital of Chengdu Command, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Hai-Bo Deng. Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Yingtan, Yingtan 335000, Jiangxi Province, China. bohaideng@126.com

Received: 2012-04-16 Accepted: 2012-08-06

### Abstract

• AIM: To observe the expression of Glia fibrillary acidic protein (GFAP) in Müller cells on mild blunt ocular trauma in rabbits.

• METHODS: Twenty rabbits (40 eyes) were randomly divided into two groups: normal control group, contusion group. The rabbit retina was injured by 3J energy contusion caused by a free falling iron bar hitting the cornea. The eyes were enucleated at different time and made as paraffin sections for GFAP immunohistochemistry staining. The positive rate and gray scale value of retinal GFAP expression were measured with computer image analysis system, and analyzed statistically with package of SPSS 12.0 for Windows.

• RESULTS: There was little brown positive GFAP stain in internal limiting membrane in normal control group. The GFAP stain strengthened at the first day after contusion. As times went by, the GFAP stain went through internal limiting membrane to nerve fiber layer, ganglionic layer, inner plexiform, outer nuclear layer and neuroepithelial layer, statistical analysis of average gray scale and positive area ratio of GFAP also presented that there was statistical significance between normal control group and contusion group ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: The intensity of GFAP expression continues to grow up gradually after ocular contusion.

Müller cells gliosis have recovery function in the early stage after ocular contusion.

• KEYWORDS: ocular contusion; Müller cells; Glia fibrillary acidic protein; rabbit

Citation: Deng HB, Xie BL, Zhu L, et al. Expression of GFAP in Müller cells after mild blunt ocular trauma in rabbits. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(9): 1647-1649

### 摘要

目的: 探讨眼球钝挫伤后视网膜 Müller 细胞表达 GFAP 的变化规律。

方法: 20 只兔子 40 眼随机分为正常对照组、挫伤组, 以 3J 能量自由落体的方式制作兔眼挫伤性视网膜病变模型, 于不同时段将动物麻醉致死, 摘除眼球, 制成病理切片用于 GFAP 免疫组织化学染色。图像分析系统测量视网膜 GFAP 表达阳性率与灰度值, 并应用 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析。

结果: 挫伤组和正常对照组视网膜内界膜下可见少许棕色阳性 GFAP 着色。挫伤组伤后 1d, GFAP 的阳性表达开始加强, 随伤后时间的推移, GFAP 的免疫染色已从内界膜向神经纤维层、节细胞层、内丛状层、外核层, 直至神经上皮层下发展, 并呈现着色加深的强阳性表达。GFAP 表达的平均灰度值的统计学分析结果也显示: 挫伤组和正常对照组存在统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

结论: 眼球钝挫伤后视网膜 Müller 细胞 GFAP 的表达持续增强, 早期 Müller 细胞反应性胶质化对视网膜损伤有修复作用。

关键词: 眼挫伤; 视网膜 Müller 细胞; GFAP; 兔

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.09.11

引用: 邓海波, 谢伯林, 朱丽, 等. 兔眼钝挫伤后视网膜 Müller 细胞 GFAP 表达的变化. *国际眼科杂志* 2012;12(9): 1647-1649

### 0 引言

眼钝挫伤是常见的眼外伤, 由机械性外力所致, 可引起眼内多种结构的改变。眼球钝挫伤引起的视网膜脉络膜病变是眼外伤后视力丧失的主要原因之一<sup>[1]</sup>, 然而, 由于眼后节损伤的复杂性, 早期常被忽视, 耽误治疗时机。而研究表明, 由于 Müller 细胞具有对视网膜神经元细胞支持和保护作用, 它在视网膜损伤后早期就有明显的病理改变。胶质细胞酸性蛋白 (Glia fibrillary acidic protein, GFAP) 的过度表达被认为是病理条件下星型胶质细胞发生反应性胶质化的标记<sup>[2]</sup>。本课题旨在通过兔眼钝挫伤动物模型, 应用免疫组织化学法来探讨轻度眼钝挫伤后视网膜 Müller 细胞表达 GFAP 的变化规律及其与视网膜病理变化的关系, 为进一步研究 Müller 细胞在视网膜损伤中的作用机制奠定基础。

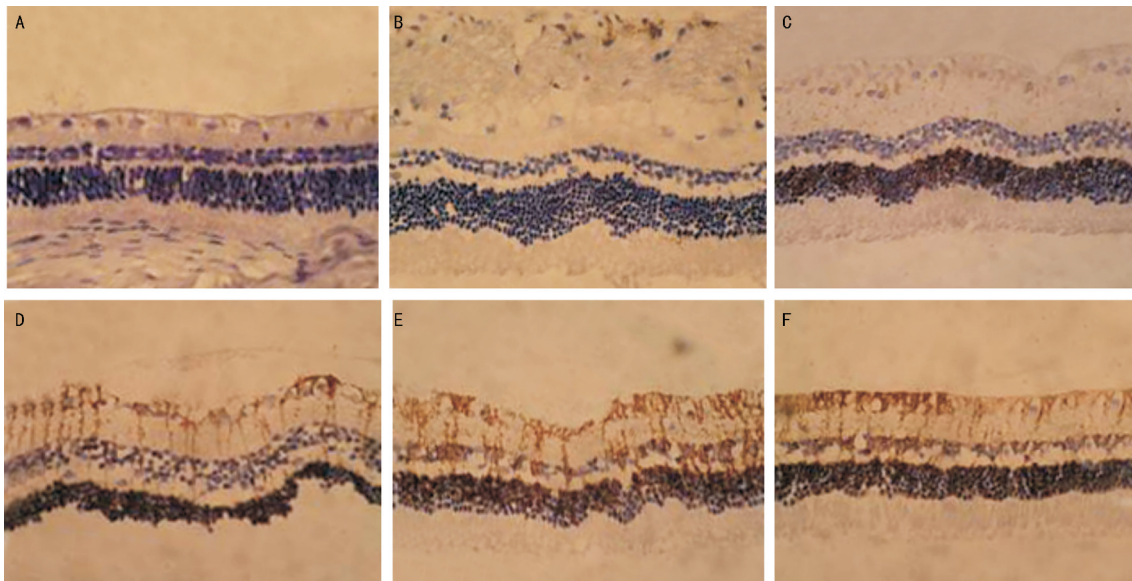


图1 各组不同时间点兔视网膜中 GFAP 蛋白的表达变化(SABC×400) A:正常对照组;B:挫伤组 3h;C:挫伤组 1d;D:挫伤组 3d;E:挫伤组 7d;F:挫伤组 14d。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 采用成都军区昆明总医院动物科提供的健康日本大耳白兔 20 只 40 眼,雌雄兼用,体质量 1.5~2.5kg,外眼及眼底检查均正常。铁棒 1 根,直径 13mm,质量 130g,钝端;透明玻璃管 1 根,直径 15mm,长 90cm。鼠过氧化物酶-抗显色 Envision<sup>TM</sup> 系统(丹麦 Dako 公司,1:50),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** 健康日本大耳白兔 20 只 40 眼随机分为伤后 1/8, 1, 3, 7, 14d 共 5 组,每组 4 只 8 眼,任意致伤 1 眼为挫伤眼,另 1 眼为自身对照眼。白兔以 30g/L 戊巴比妥钠按 1mL/kg 体质量自耳缘静脉注射麻醉后,将其头部置于垂直固定的玻璃管下方,兔角膜中央与玻璃管内径中央相重合,以钝端铁棒自玻璃管上端(距角膜高度 90cm)垂直落下以自由落体方式打击角膜中央,致伤能量为 3J ( $E = mg \cdot h$ ),伤后氯霉素滴眼液点眼。分别于伤后 1/8, 1, 3, 7, 14d 将兔麻醉致死摘除眼球,10% 中性福尔马林固定,切去眼前节和玻璃体,从视乳头的颞侧 2mm 处垂直切开眼球,常规乙醇脱水,石蜡包埋,作经线方向的垂直切片,5 $\mu$ m 厚切片用于 HE 染色和 GFAP 免疫组织化学染色。正常兔视网膜为正常对照,阴性对照以正常羊血清代替兔抗牛 GFAP 抗体对损伤的兔视网膜组织切片染色。每只眼球取 3 张切片,每张切片于 400 倍高倍镜下随机选 5 个视野,采用计算机图像分析仪对 GFAP 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以代表 GFAP 阳性染色强度。

统计学分析:实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有数据均采用 SPSS 12.0 for Windows 软件包进行单因素方差分析及 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HE 染色观察兔视网膜形态学变化** 正常对照组兔眼

视网膜染色均匀,形态结构正常,层次清楚,光感受器内外节排列整齐规则,分界清晰,内外核层排列紧密,细胞形态规整。挫伤组伤后 3h 视网膜组织全层水肿,内外核层结构排列紊乱,分界不清,细胞间隙稀疏,内外节可见空泡样变性。挫伤后 1d,水肿加重,尤以内层为主,内核层细胞间隙进一步增宽,内界膜部分区域破裂,神经纤维层及内丛状层极度稀疏。伤后 3d,水肿逐渐开始消退,脉络膜还残留血管扩张出血。伤后 7d,水肿大部分消退,出血吸收。伤后 14d,视网膜结构已基本恢复正常,外核层厚度未见明显改变,但内核层略变薄,神经节细胞数量减少。

## 2.2 免疫组织化学检测兔视网膜中 GFAP 蛋白的表达

正常兔视网膜及挫伤后不同时间点的视网膜标本的组织切片染色显示:正常兔视网膜内界膜下可见少许棕色阳性 GFAP 着色(图 1A),其余视网膜各层未见阳性 GFAP 着色;视网膜挫伤后 3h 的组织切片 GFAP 染色与正常兔视网膜相似,呈弱阳性表达且阳性部位多位于 Müller 细胞的终足区内界膜处(图 1B);伤后 1d,视网膜神经纤维层和节细胞层有增多的 GFAP 阳性染色,随伤后时间的推移,内丛状层、内核层、外丛状层可见稀疏的垂直于视网膜长轴分布的线条状 GFAP 阳性着色(图 1C,D)。伤后 7d,视网膜可见较密集的线条状 GFAP 染色贯穿于内、外界膜之间(图 1E)。伤后 14d,内、外界膜之间 GFAP 阳性染色进一步加深密集(图 1F),表明在观察时间内,视网膜内、外界膜之间的 GFAP 表达随时间延长逐渐增加。GFAP 表达更为密集,着色加深,阳性部位面积扩大,几近遍布整个胞浆。GFAP 表达阳性率和平均灰度值的统计学分析结果显示(表 1,2):挫伤组与正常对照组相比,除伤后 3h 无统计学差异,其余各时间段均存在显著的统计学差异( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

Müller 细胞是脊椎动物视网膜中特有和最主要的星

表1 各组兔视网膜 GFAP 表达灰度的比较  $\bar{x} \pm s$ 

时间	对照组	挫伤组	P
3h	62.05±10.82	69.71±9.29	>0.05
1d	61.84±12.18	73.19±6.89	<0.05
3d	63.75±11.74	89.96±8.28	<0.05
7d	63.52±9.12	101.14±5.68	<0.05
14d	62.71±9.69	105.79±4.58	<0.05

表2 各组兔视网膜 GFAP 表达阳性率(阳性面积/总面积)的比较  $\bar{x} \pm s$ 

时间	对照组	挫伤组	P
3h	5.25±1.57	5.83±1.43	>0.05
1d	6.11±1.96	6.10±0.93	<0.05
3d	5.63±1.21	14.62±1.91	<0.05
7d	5.13±1.55	26.23±3.06	<0.05
14d	5.38±1.54	27.95±3.26	<0.05

形胶质细胞<sup>[3]</sup>。Müller 细胞不仅起着支持和营养神经元的作用,还参与维持细胞外离子的稳定及参与谷氨酸盐循环、突触传递等作用。GFAP 是一种分子量为 50kD,直径 10nm、胶质细胞或胶质细胞来源的特有的中间丝蛋白,是构成胶质细胞支架的主要部分,常被作为胶质细胞的特征性标记物应用于免疫研究<sup>[4]</sup>。视网膜的各种疾病与损伤都会使 Müller 细胞发生特征性改变<sup>[5]</sup>,主要包括 Müller 细胞的神经胶质增生反应、细胞肿胀、细胞增生、细胞骨架蛋白 GFAP 和 Vimentin 等表达上升等<sup>[6,7]</sup>。其中 GFAP 过度表达被认为是病理条件下星型胶质细胞发生反应性胶质化的标记。过去人们认为胶质瘢痕妨碍神经轴突再生,现在认为至少在损伤的早期阶段,反应的星形细胞实际上具有修复功能,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,调控神经元内环境的稳定,发挥神经保护作用。

本实验观察到兔眼钝挫伤后 1d 视网膜 GFAP 开始表达增强,出现 GFAP 阳性的细胞数目增多,胞体增大,突起增长,GFAP 表达在视网膜挫伤后 7d 到达一个峰值,14d GFAP 表达与 7d 相差无几。同时我们观察到,随着 GFAP 表达的增强,兔眼视网膜损伤情况也逐渐改善,水肿渗出逐渐吸收,视网膜各层结构也慢慢恢复正常。这说明,在视网膜损伤的早期阶段,反应的星形细胞实际上具有修复功能,视网膜损伤后的修复可能与星形胶质细胞的活化有关,活化的 Müller 细胞提高了灭活兴奋性谷氨酸的能力,

提高了修补血-视网膜屏障及维持水电酸碱平衡的能力<sup>[8]</sup>。同时, Müller 还可象吞噬细胞一样,清除神经元变性坏死产生的碎片及代谢产物,避免这些物质对周围存活神经元产生毒性作用。此外,活化的 Müller 细胞还能合成和分泌多种细胞因子,如神经生长因子(NGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、细胞粘连分子(跨膜糖蛋白 CD4)、层粘连蛋白、纤维粘连蛋白及其它细胞外基质组成成分<sup>[9]</sup>,他们对维持神经元的生存、发育、再生和分化有重要作用<sup>[10]</sup>。这对视网膜的损伤后修复过程有着重要的作用。

本研究结果显示,视网膜挫伤后视网膜 Müller 细胞表达 GFAP 逐渐增强, Müller 细胞胶质化增生在视网膜损伤的早期具有修复作用。而在损伤后期,过度的胶质化的发生又可导致视网膜胶质瘢痕增生,影响视网膜神经细胞的再生和功能恢复,阻碍视网膜组织结构的修复<sup>[11]</sup>,对视网膜功能的恢复产生不利影响。因此,如何把这种胶质化限制在一个可控水平,是今后的一个研究方向。

#### 参考文献

- 1 李凤鸣. 眼科全书. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社 1996:3251
- 2 Kostyk SK, D'Amore PA, Herman IM, *et al.* Optic nerve injury alters basic fibroblast growth factor localization in the retina and optic tract. *J Neuroscience* 1994;14(3):1441-1449
- 3 Kuroiwa S, Katai N, Shibuki H, *et al.* Expression of cell cycle-related genes in dying cells in retinal ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(3):610-618
- 4 Sueishi K, Hata Y, Murata T, *et al.* Endothelial and glial cell interaction in diabetic retinopathy via the function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Pol J Pharmacol* 1996;48(3):307-316
- 5 苟琳, 张作明, 许汉鹏, 等. 缺氧条件对视网膜 Müller 细胞 VEGF 表达的影响. 第四军医大学学报 2001;22(1):3-5
- 6 Francke M, Fandé F. Electrophysiology of rabbit Müller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(5):1072-1079
- 7 朱丽, 谢伯林, 宋艳萍, 等. 兔视网膜挫伤后 Müller 细胞 Vimentin 表达的变化. 国际眼科杂志 2007;7(4):990-992
- 8 Sidorenko EL, Zelikman MK, Kaplina AV. Changes in eye tissues exposed to local action of infrasound. *Oftalmol Zh* 1988;(2):109-111
- 9 Hotta N, Koh N, Sakakibara F, *et al.* An aldose reductase inhibitor, TAT, prevents electroretinographic abnormalities and ADP-induced hyperaggregability in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Clin Invest* 1995;25(12):948-954
- 10 Schellini SA, Gregorio EA, Spadella CT, *et al.* Müller cells and diabetic retinopathy. *Braz J Med Biol Res* 1995;28(9):977-980
- 11 Schutte M, Werner P. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* 1998;246(1):53-56