

脑源性神经营养因子在形觉剥夺弱视大鼠视皮层的表达

李 曦, 何湘珍

作者单位: (421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院眼科

作者简介: 李曦, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障、青光眼。

通讯作者: 何湘珍, 本科, 教授, 主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼. lixi. weifang@163. com

收稿日期: 2010-09-28 修回日期: 2010-11-18

Expression of brain-derived neurotrophic factor in visual cortex of monocular form deprivation amblyopia rats

Xi Li, Xiang-Zhen He

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Xiang-Zhen He. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. lixi. weifang@163. com

Received: 2010-09-28 Accepted: 2010-11-18

Abstract

• AIM: To observe and research the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in visual cortex of normal and monocular form deprivation amblyopia rats.

• METHODS: Model of monocular form deprivation amblyopia was established in SD rats by eyelid suture. Then the visual cortex was extracted and performed morphological analysis depending on Nissl's dyeing, the expression of BDNF in visual cortex of P14, P21, P45, P120 MD rats was analyzed by immunohistochemistry SABC technique and computer graphics.

• RESULTS: Compared with the normal group, the number of neurons in visual cortex of MD rats was slightly reduced, neurons volume decreased, nuclear staining deepened. Expression of BDNF in normal visual cortex was consistent with visual development, P14-P21 the expression increased gradually, P21 reached peak, P45 decreased and P120 showed low expression, there was obvious statistical significance between P14 group and P21 group ($P < 0.01$), and there was statistical significance between P45 group and P120 group ($P < 0.05$); the BDNF kept low expression in visual cortex of MD amblyopia group, there was significant difference compared with the normal group ($P < 0.01$).

• CONCLUSION: The expression of BDNF in visual cortex is consistent with the development of visual, it participates in formed synaptic styling in critical period of visual development, it is the molecular basis for amblyopia formation.

• KEYWORDS: brain-derived neurotrophic factor; form deprivation; amblyopia; SD rats; plasticity

Li X, He XZ. Expression of brain-derived neurotrophic factor in visual cortex of monocular form deprivation amblyopia rats. *Cuqi Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):49-50

摘要

目的: 研究视觉发育期脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 在正常和剥夺弱视大鼠模型视皮层表达变化规律。

方法: SD 大鼠眼睑缝合行视觉剥夺, 取大脑视皮层行尼氏染色进行形态学分析, 用免疫组织化学 SABC 技术染色和计算机图形分析 BDNF 在 P14, P21, P45, P120, MD 鼠同侧视皮层 17 区的表达。

结果: 与正常组比较 MD 弱视大鼠视皮层神经元数目略减少, 细胞突起数目未见明显减少, 但神经元体积不一致, 神经元体积变小、细胞核着色加深。BDNF 在正常视皮层表达变化同视觉发育期一致, P14 ~ P21 表达渐强, P21 表达高峰, P45 表达降低, P120 呈低表达, P14 与 P21 组间差异有非常显著统计学意义 ($P < 0.01$), P14 与 P45 组间差异无显著统计学意义 ($P > 0.05$), P45 与 P120 组间差异有显著统计学意义 ($P < 0.05$); BDNF 在 MD 弱视组视皮层呈持续低表达, 与正常组比较具有非常显著的差异性 ($P < 0.01$)。

结论: BDNF 在视皮层的表达变化同视觉发育期相一致, 其参与视觉发育关键期突触塑形, 为弱视形成的分子学基础之一。

关键词: 脑源性神经营养因子; 形觉剥夺; 弱视; SD 大鼠; 可塑性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.017

李曦, 何湘珍. 脑源性神经营养因子在形觉剥夺弱视大鼠视皮层的表达. 国际眼科杂志 2011;11(1):49-50

0 引言

弱视是在视觉发育敏感期异常视觉经验所导致的, 一种从视网膜节细胞开始至视中枢的视觉传导系统及中枢全领域的功能及形态学异常引起的以空间视力损害为特征的临床症候群^[1,2]。视觉发育关键期, 即突触可塑期, 多种因子参与。BDNF 广泛存在于脑组织中, 在神经系统发生、发育过程中能够促进细胞的增殖、生长、分化、存活及功能表达, 影响突触可塑性^[3]。我们以大鼠做为实验动物。正常大鼠视觉发育可塑期为出生后 14d (Postnatal day14, P14) ~ 45d, 其中生后 14 ~ 15d 为鼠类视觉发育的关键期^[4]。应用甲酚紫 (Nissl) 染色观察形觉剥夺弱视大鼠与正常大鼠视皮层神经元形态学特征, 应用免疫组化染色方法检测形觉剥夺弱视大鼠与正常大鼠视皮层神经元内 BDNF 表达情况, 探讨视觉剥夺弱视大鼠视皮层内可能发生的形态学改变及 BDNF 在弱视与正常大鼠视皮层内的表达规律, 以期对弱视发病机制及临床治疗提供参考文献。

1 材料和方法

1.1 材料 选用刚出生健康、无眼疾的SD大鼠17只(所有动物均购自南华大学动物实验中心),雌雄不限。将所有动物随机分为5组:P14($n=3$),P21($n=3$),P45($n=3$),P120($n=3$),MD(monocular deprived,单眼剥夺)($n=5$)。参考相关国家实验动物管理办法,控制动物饲养房内光线的工作照度200~300Lx,动物照度30Lx左右,两种照度昼夜明暗交替时间约为12h/12h(8:00~20:00)。MD组大鼠出生后14d,在100g/L水合氯醛3mL/kg ip麻醉下,自内眦至外眦剪除右眼上下眼睑缘各1mm组织,上下眼睑创面间断褥式缝合密闭眼睑。放回继续饲养,术后检查眼睑情况2次/d,发生伤口感染或缝线抓脱导致眼睑闭合不严密而漏光的大鼠弃用。饲养至出生后45d。

1.2 方法 MD组至生后45d,及P14,P21,P45,P120组大鼠深度麻醉后,先用生理盐水经左心室主动冲洗,40g/L的多聚甲醛灌注固定后,断头取脑,4℃40g/L多聚甲醛固定24h,依据《大鼠大脑立体定位图谱》^[5]切取各组大鼠脑组织视皮层17区,以流动水冲洗24h,然后常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。所有蜡块均连续切片,每张切片厚约4 μ m,贴于经APES处理过的玻片上,4℃保存待实验。切片依次脱蜡至水后,置入5g/L的甲酚紫染色15~30min,清水漂洗3~5min后,再分别依次脱水透明后,盖上盖玻片。在Olympus显微镜下,观察视皮层神经元的形态和分布。免疫组化染色采用亲合素-生物素-过氧化物酶法(ABC法)。I抗为兔抗大鼠多克隆抗体(1:200),II抗为生物素标记山羊抗兔IgG,III抗为辣根酶标记的链霉卵白素,DAB显色,复染、封片,镜检。阴性对照以PBS液代替I抗,阳性对照片由公司提供。BDNF阳性神经元为胞浆、胞核显色,但以胞质边缘显色较深,胞质突起也可见明显的显色^[6]。每只动物取四张切片,每张切片随机选取视皮层17区不重叠的2个视野进行分析。在Olympus显微镜10倍物镜下观察并拍照,所收集的图像用Motic images advanced 3.2图像分析系统测定视皮层内BDNF免疫阳性产物的平均吸光度值。

统计学分析:实验数据用SPSS 17.0统计软件对组间进行单因素方差分析和析因分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

正常对照组P45大鼠视皮层Nissl染色可见神经元大小一致,有明显的胞质突起。MD弱视组大鼠视皮层神经元数目略减少,胞质突起数目未见明显减少,但神经元体积不一致,神经元体积变小,细胞核着色加深。BDNF免疫阳性细胞在正常视皮层(除I层外)广泛表达,第3,5层的含量最高,呈棕黄色阳性着色。在不同发育期表达量不同,P14,P21高表达,P45呈低表达,P120呈低表达,P14与P21组间差异有非常显著统计学意义($P < 0.01$),P14

与P45组间差异无显著统计学意义($P > 0.05$),P45与P120组间差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。BDNF免疫阳性产物在MD弱视组也表达,但较正常对照组P45表达明显减少,差异有显著性($P < 0.01$)。

3 讨论

正常大鼠视皮层Nissl染色可见神经元大小一致,有明显的胞质突起。弱视组大鼠视皮层神经元数目略减少,胞质突起数目未见明显减少,但神经元体积不一致,神经元体积变小,细胞核着色加深。弱视视皮层神经元表现出凋亡现象。BDNF作为神经营养素家族中的重要一员,广泛分布于脑组织中,在CNS的发育过程中,可以支持神经元存活、分化、生长和突触形成,维持神经元正常生理功能,调节神经递质释放,参与神经的可塑性,调节长时程增强和增强记忆力^[7]。BDNF与其特异性受体TrkB结合,通过一系列酶促反应发挥生理学作用,可加强胆碱能、多巴胺能、5-羟色胺能及含神经肽等多种神经元的功能^[8]。BDNF在各个发育期正常大鼠视皮层均有表达,但各期表达水平有差异:视觉发育关键期初期、高峰期呈高表达,关键期末、成年期呈低表达,BDNF在视皮层的表达水平规律与视觉发育可塑性时程一致,表明BDNF参与视皮层发育;既往研究表明BDNF参与突触塑形,推测其参与视皮层发育机制可能是通过影响关键期视皮层突触可塑性。BDNF在弱视大鼠视皮层也表达,但表达水平比正常对照组明显降低,这与其他一些研究结果相符,观察敏感期内、末不同时限单眼剥夺幼猫视皮层脑源性神经营养因子的可塑性变化,发现敏感期内所致的单眼剥夺幼猫视皮层中BDNF免疫阳性反应浓度和细胞数密度与正常对照组相比显著下降。形觉剥夺导致双眼竞争,同侧视皮层BDNF低表达,同侧视皮层发育受抑制,再次证明BDNF参与视觉视皮层发育,参与弱视形成,但具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- 1 王双勇. 弱视的发病机理研究. 眼科新进展 2007;27(12):953-955
- 2 刘虎. 弱视神经机制的研究进展. 眼科新进展 2003;23(5):369-372
- 3 侯莉娟,乔德才. 脑源性神经营养因子的研究现状. 中国康复医学杂志 2005;20(12):940-942
- 4 周清,陈剑,刘珏,等. 视觉发育可塑性关键期后弱视大鼠视皮层c-fos的表达. 广东医学 2007;28(10):1594-1596
- 5 Paxinos G, Watson(著),诸葛启钊(译). 大鼠脑立体定位图谱. 北京:人民出版社 2005:109-112
- 6 巴迎春,王廷华,潘兴华. NGF、BDNF和NT-3在正常成年大鼠主要脑区表达的免疫组织化学研究. 解剖学研究 2006;28(3):165-167
- 7 Huang EJ, Reinhardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:677-736
- 8 Mössner R, Daniel S, Albert D, et al. Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not nerve growth factor(NGF). *Neurochem Int* 2000;36(3):197-202