文章编号:1000-5404(2005)08-0749-04

论著

RCS大鼠病变发育过程中视网膜神经节细胞形态学变化的研究

张辰星,阴正勤,许红霞,王仕军,姚军平 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 研究皇家外科学院大鼠(royal college of surgeon rat, RCS)病变发育过程中视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)形态学变化。**方法** 取RCS大鼠、RCS-rdy$^+$大鼠3、5、7、9、11周龄视网膜,固定后行视网膜平铺片,甲酚紫染色,使用LEICA DM TRET显微镜及自带的LEICA Q WIN系统软件,观察视网膜神经节细胞层细胞数量总数及RGCs亚群数量上的变化。**结果** RCS大鼠病变发育过程中,其节细胞层中细胞横径≥12 μm的细胞在数量上,7、9、11周龄段相较与3周龄段出现显著减少($P<0.01$)。相同周龄段上的视网膜节细胞层中,RCS大鼠与RCS-rdy$^+$大鼠在横径≥12 μm的细胞数量上相互比较,可见RCS大鼠从5周龄段开始相较于RCS-rdy$^+$大鼠出现显著减少($P<0.05$),7、9、11周龄段相较与RCS-rdy$^+$大鼠减少更为显著($P<0.01$)。但是节细胞层细胞总数及横径≥9 μm的细胞数量上,RCS大鼠自身发育前后对照以及与RCS-rdy$^+$大鼠相比较没有显著差异。**结论** RCS大鼠视网膜色素变性过程中,随着光感受器细胞的变性和缺失,虽然视网膜节细胞层细胞在整体数量上没有明显变化,但是RCS大鼠视网膜病变发育早期,其节细胞层中胞体横径≥12 μm的RGCs在数量上开始出现明显缺失。

关键词: RCS大鼠;视网膜;神经节细胞
中图法分类号: R322.91; R329.24; R774.13 **文献标识码**: A

Study on morphological characteristics in the development of the retinal ganglion cells of RCS rats

ZHANG Chen-xing, YIN Zheng-qin, XU Hong-xia, WANG Shi-jun, YAO Jun-ping (Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the morphological diversity of retinal ganglion cells in the pathological development of retinitis pigmentosa in royal college of surgeon (RCS) rats. **Methods** The retinal whole mount preparations of RCS and RCS-rdy$^+$ rats of 3, 5, 7, 9, 11 weeks were stained by cresyl violet to count the number of the different subpopulation of the RGCs and the number of all the cell of the entoretina. **Results** In the development of the retina of the RCS rats, there was significant difference of the amount of the cell diameter more than 12 μm in the ganglion cell layer between the postnatal 3 weeks and the postnatal 7, 9, 11 weeks. There was also significant difference of the amount of the cell diameter more than 12 μm in the ganglion cell layer between RCS and the RCS-rdy$^+$ rats of different ages. But there was no significant difference between all the cell of the entoretina and the cell diameter more than 9 μm. **Conclusion** In the pathological development of retinitis pigmentosa, accompanied with the loss of the sensory retinal neuron, some kind of the subpopulation of the retinal ganglion cells have lost, although the amount of all the cell of entoretina was stable.

Key words: royal college of surgeon rat; retina; ganglionic cells

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一组导致进行性感光细胞变性和视觉障碍的遗传病征候群,是致盲的重要疾病。既往的研究认为,在视网膜的变性过程中,当色素细胞及光感受器细胞发生变性和缺失后,其视网膜内层神经元仍然能够长期保持相当数量的正常细胞结构和突触连接[1]。尤其在黄斑区,即使是在变性晚期仍有相当数量的神经节细胞存活并维持正常的突触结构[2]。Marc等[3]人为将视网膜色素变性分为3个阶段,并认为随着光感受器细胞开始出

基金项目:国家自然科学基金资助项目(302704577)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (302704577)
作者简介:张辰星(1977-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事视觉发育基础方面的研究。电话:(023)68754403
通讯作者:阴正勤,电话:(023)68754401,E-mail:Zqyin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-01-26;修回日期:2005-03-17

现变性和缺失，节细胞早期即出现死亡。但是随着异位细胞的迁入，星型胶质细胞的增生，这种节细胞数量上的缺失被掩盖以致难以发现，故而观测到的轻微的节细胞数量上的改变可能都意味着比较严重的节细胞数量缺失。神经节细胞是视网膜内惟一向高级视觉中枢投射的神经元，研究其在视网膜变性疾病中在形态学和数量上的变化，可以为阐明视网膜变性的机制奠定基础，并为将来的视网膜移植研究提供一定的依据。

皇家外科学院大鼠 RCS 为遗传性视网膜色素变性的经典动物模型，该鼠患有一种因视网膜色素上皮细胞吞噬视细胞外节膜盘能力的缺陷，致使视细胞碎屑堆积，最终导致光感受器细胞进行性变性为特征的常染色体隐性遗传病。其发病机制和转归与人类有相似点。本研究，对 RCS 大鼠视网膜变性进程中神经节细胞进行数量上的分析，为进一步阐述视网膜色素变性病变过程及发病机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生后 RCS 及正常对照 RCS-rdy$^+$ 大鼠，前者为变性鼠，后者为正常对照鼠。两种大鼠均无色素沉着。两种大鼠 3、5、7、9、11 周龄段各 3 只，雌雄不限，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供，符合国家医用动物实验标准，标准号为清洁级。

1.2 材料及器械

麻醉液：20% 乌拉坦；固定液：4 g 多聚甲醛 + 30 g 蔗糖/0.1 mol/L PB(pH 7.2)100 ml；染色剂：甲酚紫液浓度 1%，甲酚紫 1 g/100 ml 蒸馏水；甲酚紫由 SIGMA 公司提供；载玻片：玻片浓硫酸浸泡 24 h 以，生理盐水漂洗，乙醇漂洗晾干后，多聚赖氨酸包埋；显微镜：型号 LEICA DM TRET；分析软件 LEICA Q WIN，运行环境 WIN98。

1.3 方法

1.3.1 视网膜平铺片的制备和处理 20% 乌拉坦按照 5 ml/kg腹腔注射麻醉大鼠。取出大鼠双侧眼球，显微镜下沿角巩膜缘剪除角膜，去除晶体虹膜及玻璃体组织。迅速置于固定液中，恒温 4 ℃固定 48 h 后，解剖显微镜下完整剥离完整视网膜，尽量剥离玻璃体，去除脉络膜组织及色素上皮层。剥离好之视网膜于 0.1 mol/L PB(pH 7.2)液中漂洗。视网膜上、下、颞、鼻 4 个方向向心剪开，平铺于多聚赖氨酸处理之玻片。常温下甲酚紫液染色 30 min。显微镜下观察显色后，0.1 mol/L PB(pH 7.2)小心洗去多余甲酚紫。乙醇、二甲苯梯度脱水去脂后，中性树脂封片。

1.3.2 电脑处理图像并分类细胞计数 LEICA DM TRET 倒置显微镜下(物镜 × 20，目镜 × 10)，在视网膜铺片 4 个象限中的每个象限各取 3 个取景框，使用 LEICA Q WIN 操作软件将图像输入与 LEICA DM TRET 显微镜相连的电脑。使用 LEICA DM TRET 显微镜操作系统中自带的细胞计数软件，每个取景框选取 3 个单位面积计数框(单位面积计数框以 μm^2 计)，在选定的单位面积计数框中，按照细胞横径 ≥12 μm、≥9 μm 及全部细胞 3 种标准分别计数。以均数估算整个视网膜平铺片单位面积细胞数量[$(\bar{x} \pm s)/mm^2$]。

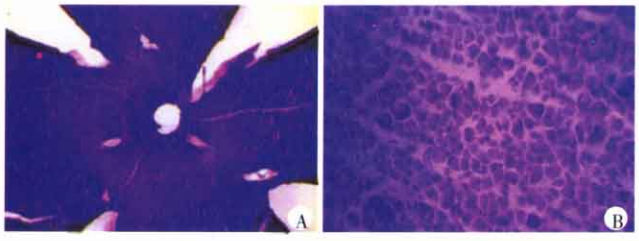
1.4 统计方法

采用 SPSS 10.1 软件包，两组以上均数比较采用单因素方差分析，两组间均数比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 视网膜平铺片甲酚紫染色和 LEICA DM TRET 处理图像

RCS 大鼠 3 周龄段获得完整视网膜铺片 4 个，5、7、9、11 周龄段各 5 个。RCS-rdy$^+$ 大鼠 3、7、9 周龄段获得完整视网膜铺片各 5 个，5 周龄段 3 个，11 周龄段获得 4 个。所有视网膜铺片甲酚紫染色后很好的显示了视网膜节细胞层所有细胞(图 1)，经过 LEICA DM TRET 显微镜输入电脑后的图像满足计数要求。用软件 LEICA Q WIN 本身自带的计数系统，选取单位面积计数框(μm^2)，测量胞体横径，按照细胞横径 ≥12 μm、≥9 μm 及全部细胞 3 种标准，分别计数框内满足不同标准的细胞数量(图 2)。以各计数框所得细胞数量均值作为单个视网膜单位面积内细胞数量[$(\bar{x} \pm s)/mm^2$]。



A：LM × 40；B：LM × 200

图 1 甲酚紫染色下的视网膜平铺片

Fig 1 Whole mount retina stained by the cresyl violet

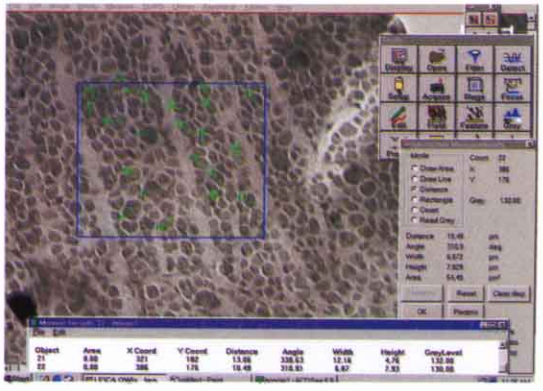


图 2 单位面积取景框中计数

Fig 2 The cell count in a unit area

2.2　计数结果

2.2.1　计数节细胞层所有细胞数量　RCS-rdy$^+$、RCS 大鼠视网膜节细胞层各周龄段所有细胞数量(表 1)。RCS 大鼠各周龄段之间比较可见，5 周龄节细胞层细胞总数相较于 3 周龄有显著减少($P<0.05$)，为 3 周龄段的 86.0%。同时 5 周龄节细胞层细胞总数与 9 周龄节细胞总数相比也有显著减少($P<0.05$)，为 9 周龄段细胞总数的 87.8%。其余各组间没有明显差异。RCS-rdy$^+$ 大鼠发育过程中，各周龄段之间相比较没有显著差异。而 RCS-rdy$^+$、RCS 大鼠相对应周龄段之间相比较没有显著差异($P>0.05$)。

表 1　RCS 和 RCS-rdy$^+$ 大鼠不同周龄段视网膜节细胞层单位面积细胞总数[$(\bar{x}\pm s)$/mm^2]

Tab 1　All cell number of retinal ganglion cell layer in different ages of RCS and RCS-rdy$^+$ [$(\bar{x}\pm s)$/mm^2]

Group	3 weeks	5 weeks	7 weeks	9 weeks	11 weeks
RCS	5955 ± 543	5123 ± 80*	5637 ± 511	5836 ± 148$^\triangle$	5530 ± 201
RCS-rdy$^+$	5847 ± 100	5394 ± 179	5276 ± 156	5635 ± 543	5555 ± 55

*: $P<0.05$, *vs* 3 weeks; $\triangle$: $P<0.05$, *vs* 5 weeks

2.2.2　计数　节细胞层细胞横径≥9 μm 细胞数量　RCS-rdy$^+$，RCS 大鼠视网膜节细胞层各周龄段细胞横径≥9 μm 数量。RCS 大鼠各周龄段之间比较没有明显差异($P>0.05$)。RCS-rdy$^+$ 大鼠发育过程中各周龄段之间相比较没有显著差异。而 RCS-rdy$^+$、RCS 大鼠相对应周龄段之间相比较没有显著差异。

2.2.3　计数节细胞层细胞横径≥12 μm 细胞数量　RCS-rdy$^+$、RCS 大鼠视网膜节细胞层各周龄段细胞横径≥12 μm 数量(表 2)。RCS 大鼠各周龄段之间比较可见，从 7 周龄段开始，各周龄段细胞数量相较于第 3 周有显著减少。7、9、11 周龄 RCS 大鼠细胞数量分别相当于 3 周龄段的 71.3%，67.4%，58.0%。从第 7 周开始数量减少显著($P<0.01$)。而与 5 周龄段相比较，其 9 周龄段开始显著减少，数量为 5 周龄段的 76.8%($P<0.05$)，11 周龄段减少更为明显，数量只有 5 周龄段的 66.1%($P<0.01$)。而 7、9、11 周龄段之间相互比较没有显著差异。RCS 大鼠与 RCS-rdy$^+$ 大鼠相对应周龄段之间相比较可见，从第 5 周龄段开始出现显著减少($P<0.05$)，为 RCS-rdy$^+$ 5 周龄段的 86.2%。从 7 周龄段开始，RCS 细胞数量相较于 RCS-rdy$^+$ 同周龄段减少更为显著($P<0.01$)。其 7、9、11 周龄段分别为 RCS-rdy$^+$ 同周龄段数量的 70.7%、69.4%、62.3%。RCS-rdy$^+$ 大鼠发育过程中各周龄段之间相比较没有显著差异。

表 2　RCS 大鼠和 RCS-rdy$^+$ 大鼠不同周龄段节细胞层细胞横径≥12 μm 的单位面积细胞数[$(\bar{x}\pm s)$/mm^2]

Tab 2　Cell number of retinal ganglion cells (diameter≥12 μm) in different ages of RCS and RCS-rdy$^+$ [$(\bar{x}\pm s)$/mm^2]

Group	3 weeks	5 weeks	7 weeks	9 weeks	11 weeks
RCS	1257 ± 262	1103 ± 42*	896 ± 93$^{\#\triangle}$	847 ± 32$^{\#\blacktriangle\triangle}$	729 ± 63$^{\#\blacktriangle\triangle}$
RCS-rdy$^+$	1255 ± 81	1279 ± 62	1267 ± 60	1220 ± 132	1171 ± 23

#: $P<0.05$, *vs* 3 weeks; ▲: $P<0.05$, *vs* 5 weeks;

*: $P<0.05$, *vs* RCS-rdy$^+$; $\triangle$: $P<0.01$, *vs* RCS-rdy$^+$

3　讨论

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa，RP)是一种遗传性进行性视网膜退行性病变，RP 发病率为1/3 500～1/4 000，好发于青壮年。以光感受器细胞死亡为主要病理特征，目前认为该病的发生是由于 RPE 对感光细胞脱落的外节膜盘吞噬功能下降，致使其在视网膜外层堆积，结构紊乱，最终至感光细胞变性死亡[4]。在视网膜色素变性的过程中，可以人为的分为 3 个阶段：第 1 阶段、视杆细胞变性及死亡；第 2 阶段、视锥细胞开始变性及死亡，同时出现神经层视网膜细胞的迁移，Muller 细胞增生，胶质瘢痕开始形成，出现双极细胞以及神经节细胞的死亡；第 3 阶段、视网膜全层细胞包括神经节细胞都出现不可逆的损失和变构，新生血管及色素上皮细胞移行进入视网膜，形成新的突触连接，出现微神经瘤，胶质瘢痕包埋残存的视网膜等[3]。从第 2 阶段开始，节细胞就在形态学上开始出现改变。

RCS 大鼠在生后 2 周睁眼，视网膜光感受器细胞即开始发生变性。故我们选用生后第 3 周开始的 Rcs 大鼠观测其神经节细胞数量上的变化。在本研究中，计数全部视网膜内层细胞，RCS 大鼠和对照组相比较并没有显著差异，但是在 RCS 大鼠发育变性过程中，5 周龄段出现一个较为显著的缺失现象。不能排除是本研究过程中出现的误差，另外的解释是在 RCS 大鼠病变发育过程中其 5 周龄段节细胞层某种细胞出现较为明显的数量缺失，但后来随着异位神经元的迁入和胶质细胞的增生，掩盖了这种现象。正常对照 RCS-rdy$^+$ 大鼠没有这个现象，是否这是 RCS 大鼠发育阶段所特有的，以及究竟是哪种细胞的缺失导致了这种现象还需要进一步的实验验证。RCS 大鼠其他周龄段之间相互比较没有显著差异，可能是因为变性过程中如 Muller 细胞的增生，外层神经元和异位细胞迁入[3]，掩盖了本身内层神经元数量上的变化。而甲酚紫染色是一种非特异性染色，在正常视网膜内层神经元着染中有相当数量是无长突细胞，区别这二者主要依靠 RGCs 胞体大，而无长突细胞胞体小，核圆且深染来鉴别[5]，故在甲酚紫着染下计数视网膜内层全部细胞不能够客观的反映节细胞数量上的变化。

1974 年 Boycott 等[6]研究了猫的视网膜神经节细胞，根据细胞的形态将其分为 3 类：α、β 和 γ 细胞。Tootle 对猫视网膜神经节细胞进行进一步的研究，详细区分了 3 种细胞：α 细胞胞体最大，β 细胞胞体较小，γ 细胞胞体与 β 细胞大小接近[7]。但是对神经节细胞各

亚型之间在形态学上的区分并没有精确的研究报道。Rivera 等[8]将神经节细胞分为小(胞体横径在 6 ~ 10 μm),中(胞体横径在 11 ~ 14 μm),大(胞体横径≥14 μm),分别对应 α、β 和 γ 3 种亚型。本实验将横径在 9 μm 以上的神经元胞体认定为神经节细胞。并分类计数横径≥12 μm 的节细胞,将其划分为细胞横径最大的 α 亚型的神经节细胞。本实验中观察到,RCS 大鼠和对照组在横径 9 μm 以上的胞体计数上也没有显著差异,推测原因,其一是实验中选用时间段动物最大只有 11 周,内层神经元的改变虽在进行,但并没有到终末。节细胞或许仍然能够在总体数量上维持基本的正常。其二是其它非节细胞胞体被纳入计数中。因为在非特异性染色上区分无长突细胞和 β 和 γ 细胞亚群神经节细胞是困难的,尤其在密度高的地区[9]。

α 亚型的神经节细胞胞体横径是内层神经元中最大的,容易和异位迁徙的细胞以及无长突细胞相区分。本实验中对于横径≥12 μm 胞体进行计数发现 RCS 大鼠从 5 周龄段开始和对照组 RCS-rdy$^+$ 大鼠之间有显著差异,并且 RCS 大鼠变性过程中自身前后对照从 7 周龄段开始也出现显著差异。观测到的这种结果提示在视网膜变性疾病的过程中,早期节细胞虽然能够在整体数量上维持基本的一致,但是在亚型上已经开始出现明显的数量上变化。我们在实验中观察到,从出生后第 7 周开始,横径在 12 μm 以上的神经元胞体数量相对于出生后第 3 周就已经有相当显著的减少($P < 0.01$),减少在 30% 以上。推测此时视网膜内层神经元的功能应该有比较大的变化。Radner 等[10]在 rd 鼠的视网膜下腔移植视网膜片后发现在周龄较小 rd 鼠,移植后能够观察到光刺激下的神经冲动发放,而在周龄较大的 rd 鼠上,比如 8 周以上,光反应就无法记录得到。Rander 的研究所提示的时间点与本实验观测到的结果相近。结合本研究的结果,推测在 RCS 大鼠出生后第 7 周,节细胞层就很难维持应有的正常功能。但是存留的节细胞的是否发生形态和功能上的改变,以及发生什么样的改变,需要进一步的研究。

本研究提示,在 RCS 大鼠视网膜病变发育过程中,随着光感受器细胞的缺失,视网膜 α 亚型神经节细胞也在数量上出现明显的缺失,这种变化在生后第 7 周加剧。并推测此时 RCS 大鼠视网膜的功能受到严重的影响。但是这种数量上的改变与整体视网膜功能的变化之间的关系还需要进一步研究。并且视网膜神经节细胞其他亚型是否出现变化还需要进一步的验证。

参考文献:

[1] Santos A, Humayum M S, de Jnan E Jr, *et al*. Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis[J]. Arch Ophthalmol, 1997, 115(4): 511 - 515.

[2] Kim S Y, Sadda S, Pearlman J, *et al*. Morphometric analysis of the macula in eyes with disciform age-related macular degeneration[J]. Retina, 2002, 22(4): 471 - 477.

[3] Marc R E, Jones B W, Watt C B, *et al*. Neural remodeling in retinal degeneration[J]. Prog Retin Eye Res, 2003, 22(5): 607 - 655.

[4] Nelson R, Famiglietti E V Jr, Kolb H. Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina [J]. J Neurophysiol, 1978, 41: 472 - 483.

[5] Levkovitch-Verbin H, Qaigley H A, Kesrigan Baumrind L A, *et al*. Optic nerve transection in monkeys may result in secondary degeneration of retinal ganglion cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(5): 975 - 982.

[6] Boycott B B, Wassle H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina[J]. J Physiol, 1974, 240(2): 397 - 419.

[7] Toole J S. Early postnatal development of visual function in ganglion cells of the cat retina[J]. J Neurophysiol, 1993, 69(5): 1645 - 1660.

[8] Rivera N, Lugo N. Four retinal ganglion cell types that project to the superior colliculus in the thirteen-lined ground squirrel (spermophihis tridecemlin eatus)[J]. J Comp Neurol, 1998, 396(1): 105 - 120.

[9] 黄厚斌, 张卯年, 马志中. 改良大鼠视网膜节细胞逆行标记方法的建立[J]. 眼科新进展, 2004, 24(5): 341 - 344.

[10] Radner W, Sadda S R, Humayun M S, *et al*. Light-driven retinal ganglion cell responses in blind rd mice after neural retinal transplantation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(5): 1057 - 1065.

(编辑 薛国文)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》,本刊实行三位分节法(即从小数点算起,向左向右每 3 位分 1 节,节间留出一定空隙),废除千分撇分节法(如 2,431 改为 2 431)。年月日,页数,部队编号,仪表型号,标准号不用三位分节法。中文出现的数字,凡属计数数值,一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部