论著

文章编号:1000-5404(2008)19-1814-04

混合晶体蛋白对大鼠视神经损伤后轴突再生作用的研究

刘志敏[1],王 一[1],黄志华[2],曾玉晓[1],何 利[2],任 蕾[1] ([1]第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038;[2]解放军第266医院眼科,河北 承德 067000)

摘 要:目的 观察混合晶状体蛋白对LongEvans大鼠视神经损伤后轴突再生作用。**方法** 大鼠双眼均行视神经钳夹,右眼为玻璃体腔注射晶状体蛋白眼,左眼为等渗盐水对照眼,WGA顺行示踪及F-VEP检查观察轴突再生情况和功能恢复情况。电镜评价轴突再生情况。**结果** 玻璃体腔注射晶状体蛋白眼有更多轴突纤维尽快通过损伤区,晶状体蛋白能够促进F-VEP振幅恢复,电镜观察晶状体蛋白组于损伤点后5 mm仍有较多的再生轴突。**结论** 视神经钳夹伤后玻璃体腔注射可溶性混合晶状体蛋白能够促进轴突再生,并且能够部分的改善视功能。

关键词:晶状体蛋白;轴突;视神经;钳夹伤

中图法分类号:R338.12;R339.146;R341 **文献标识码**:A

Effects of mixed crystallin on axonal regeneration following optic nerve injury

LIU Zhi-min[1], WANG Yi[1], HUANG Zhi-hua[2], ZENG Yu-xiao[1], HE Li[2], REN Lei[1] ([1]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Ophthalmology, No. 266 Hospital of PLA, Chengde Hebei 067000, China)

Abstract: Objective To investigate the regeneration of axons after the incomplete optic nerve injury *in vivo* treated by intravitreous injection of mixed crystallin. Methods Long Evans rats aged 3 months were subjected to the optic nerve clamping of both eyes, and the right eyes underwent intravitreous injection of mixed crystallin while the left eyes injected with isotonic saline served as controls. After injury, wheat germ agglutinin (WGA) anterograde tracing and electron microscopy were applied to evaluate axonal regeneration of retinal gangloin cells. F-VEP was performed before the injury and every time point after injury. Results Treatment with intravitreous injection of mixed crystallin resulted in more axonal fiber tracts regenerating and traversing the injured optic nerves. The amplitude of F-VEP in crystallin-treated group showed obvious recovery on 4 – 8 weeks after the injury, compared with the control group ($P < 0.01$). Conclusion Intravitreous injection of mixed crystallin can clear the path for axons to sprout, improve the regeneration of the axons and partly restore the visual function.

Key words: crystallin; axon; optic nerve injury; clamp injury

视神经(optic nerve,ON)损伤是一种严重损害视功能的眼外伤,迄今仍缺乏有效的治疗手段。因此,视神经损伤后促进轴突再生已成为当前神经科学的热点,近年来研究显示,晶状体损伤可保护视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)存活和促进轴突再生[1-4]。王艳华等[5]研究表明,在离体培养的大鼠RGCs的实验中,可溶性晶状体蛋白有促进RGCs的存活和突起生长的作用。本实验旨在大鼠活体内验证晶状体蛋白对视神经损伤后的轴突再生作用。从而探索视神经损伤的修复及再生的可行方法。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

约3月龄的成年Long Evans大鼠25只,体质量(250±20)g,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。按伤后1、2、4、8周分组各组4只大鼠,行麦芽凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)顺行示踪评价轴突再生;按伤后4、8、12周分组3只大鼠,行电镜评价轴突再生,双眼均行视神经钳夹,右眼为玻璃体腔注射晶状体蛋白眼,左为等渗盐水对照眼。

作者简介:刘志敏,女,河北省承德市人,硕士,主治医师,主要从事视神经损伤及再生方面的研究。电话:(0314)5980628,E-mail:liuzhimin1998@yahoo.com.cn

通信作者:王 一,电话:(023)68754401,E-mail:wangyi@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-12-26;修回日期:2008-01-08

1.2　大鼠视神经钳夹伤模型制作

实验大鼠麻醉成功后,手术显微镜下剪开大鼠上穹隆结膜约 120°,避开涡静脉,钝性分离暴露视神经长 3～4 mm,用中号无创血管夹在球后 2 mm 处钳夹视神经 10 s。术后载玻片轻压角膜,镜下观察眼底,无缺血及晶状体损伤者纳入实验。对照组只暴露视神经,不做钳夹。

1.3　玻璃体腔注射

晶状体蛋白由本实验室自行提取冻干保存,实验前配制成所需浓度[5]。在视神经钳夹伤后即刻、伤后 1、2、4 周进行玻璃体腔注射,注射部位为距视乳头 2 mm 的巩膜壁,方向垂直于视神经。其中右眼注入 1×10^{-4} g/L 混合晶状体蛋白溶液 5 μl,左眼注入等渗盐水 5 μl。

1.4　WGA 顺行示踪标记视网膜神经节细胞轴突

按 Weibel 等[6]的方法行玻璃体腔注射 WGA 顺行示踪标记视网膜神经节细胞轴突。步骤如下:损伤后各取材时间点前 2 d 实验鼠速眠新(1.0 ml/kg)肌肉注射麻醉,玻璃体注射 5 μl 2.5% 的 WGA。在取材时间点,将大鼠用 4% 多聚甲醛灌注固定后,取出视神经标本置于 4% 多聚甲醛溶液(含 20% 蔗糖)中,4℃ 固定 10 h,OCT 包埋,切片厚 10 μm。室温吹干 20 min后滴加一抗(一抗稀释液中含 3% BSA,0.3% Triton X-100,0.01 mol/L PBS)Goat-anti WGA(1∶200),4℃孵育过夜,用0.01 mol/L的 PBS 漂洗3 次。然后滴加二抗 FITC-Rabbit anti Goat(1∶64),37℃孵育 2 h,用 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 3 次,注意避光。再用 75% 缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察,拍照。

1.5　透射电镜观察轴突的再生

标本取材和处理:动物麻醉之后,开胸,经左心室插管至升主动脉,依次用 0.9% 等渗盐水及 0.5% 多聚甲醛 +2.5% 戊二醛 250 ml 灌注 1 h,取出视神经标本,分成 3 段,球后 0.5 mm 至损伤区后 0.5 mm 为第 1 段,损伤区后 0.5 ～2.5 mm 为第 2 段,损伤区以远 2.5～ 5.5 mm 为第 3 段。在各段近段用 10/0 缝线结扎标记以标示方向,随后将以上 3 段分别置于 3% 戊二醛固定液中固定 24 h,1% 锇酸后固定,环氧树脂包埋,每段取远端作横切片。

1.6　F-VEP 检测

采用 Roland 多焦视觉电生理系统,在视神经损伤后即刻、伤后 1、2、4、8 周取材之前行 F-VEP 检查。动物麻醉后,用特制支架固定,采用银针电极,记录电极插入大鼠枕骨粗隆骨膜下,参考电极插入两眼正中皮下,地电极插入耳尖皮下。采用全视野刺激球白色闪光刺激,背景无色,刺激频率为 1 Hz,闪光强度为 -5 dB,每次采样时间为 300 ms,波形叠加 30 次,记录稳定波形,每只动物记录 3 次,间隔 10 min。每只动物振幅(μV)数据取 3 次平均值。

1.7　统计学处理方法

应用 SPSS 10.0 统计软件,对 F-VEP 结果进行统计学分析,组间比较用配对样本 t 检验。

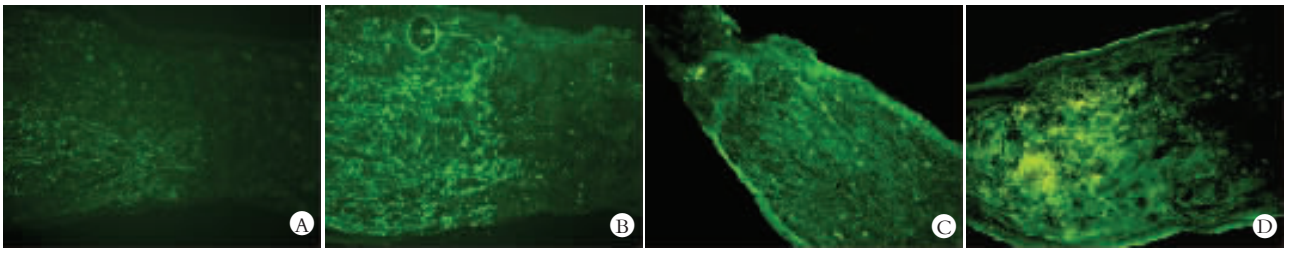
2　结果

2.1　WGA 顺行示踪技术观察 RGCs 轴突的再生

正常视神经显示均匀密集纵行排列的 WGA 染色的轴突。损伤后 1 周可见损伤近端大量的 WGA 染色的视神经纤维,在损伤处(约 500 μm 宽)WGA 染色的等渗盐水对照组轴突密度骤然下降,损伤远段未见 WGA 染色的轴突,轴突末端在损伤近端边缘处团集、扭曲,有的发生 90°甚至 180°的方向改变,几乎未见轴突长入损伤区(图 1A);损伤后 2 周轴突末端开始伸展,可见少许轴突长入损伤区中。玻璃体腔注射晶状体蛋白作用组在伤后 1 周轴突末端即开始伸展,少许轴突长入损伤区中(图 1B),伤后 2 周即有较多轴突长入损伤区,再生纤维表现为直径较细,再生的路径较扭曲。损伤后 4～8 周,玻璃体腔注射晶状体蛋白组在损伤区远端标记到的轴突纤维数量较多,再生的纤维数目增多,排列整齐,常常聚集成束穿行于胶质细胞之间(图 1C)。而等渗盐水对照组损伤区有更明显的胶质增生,通过损伤区的纤维较少,多孤立存在,偶有束状排列,则排列紊乱 (图 1D)。

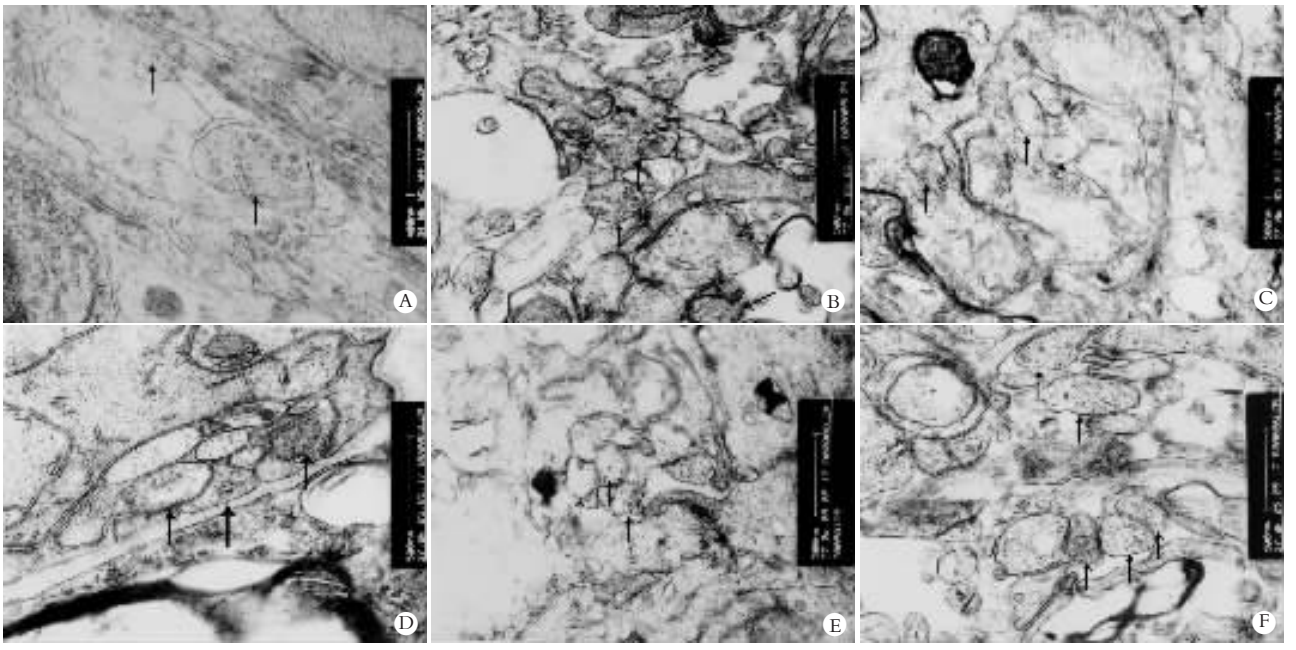
2.2　电镜观察 RGCs 轴突的再生

损伤 4 周以后,远端部分髓鞘变性,板层样结构扭曲,松解;部分变性的轴突神经丝和微管等细胞器退化,有的完全退化只剩下空的髓鞘壳;可见大量胶质细胞的增生,晶状体蛋白组胶质增生相对轻微;在星形胶质细胞突起之间或变性髓鞘周围可见单个或丛状分布的再生无髓神经纤维,他们呈圆形外观,直径往往较小,为 0.1～0.2 μm(也有少数直径较大约 1 μm),常 2～10 个成簇包裹在星形胶质细胞突起之间,细胞质呈电子密度透明,可见神经丝和微管等细胞器,与星形胶质细胞突起内致密的中间丝容易区分。在伤后 4～12 周,等渗盐水对照组在损伤点后 0.5 mm 处发现稀少再生无髓鞘纤维,而晶状体蛋白组伤后 4 周于损伤点后 0.5 mm 处发现较多再生无髓鞘纤维,8～12 周于损伤点后 5.5 mm 均发现新生的无髓鞘纤维,呈丛状分布 (图 2)。



A:损伤后 1 周等渗盐水对照组;B:晶状体蛋白组;C:视神经损伤后 4 周等渗盐水对照组;D:晶状体蛋白组

图 1　视神经损伤后视神经 WGA 染色　(免疫荧光 ×200)



A：损伤 4 周对照组；B：损伤后 4 周玻璃体腔注射晶状体蛋白眼；C：损伤后 8 周对照组；D：损伤后 8 周璃体腔注射晶状体蛋白眼；E：损伤 12 周对照组；F：损伤 12 周璃体腔注射晶状体蛋白眼 ↑：再生的轴突

图 2 视神经损伤后再生轴突电镜观察 （×34 000）

2.3 F-VEP 变化

视神经损伤后即刻，F-VEP 振幅显著降低。伤后 1～2 周玻璃体腔注射晶状体蛋白组与对照组比较无显著差异（$P>0.05$）；4 周以后玻璃体腔注射晶状体蛋白组振幅明显恢复较对照组差异显著（$P<0.05$），8 周以后两组间差异非常显著（$P<0.01$）（表 1）。8 周时对照组恢复至损伤前的 31.0%，而晶状体蛋白组恢复至 49.9%。

表 1 晶状体蛋白组与对照组 F-VEP 振幅变化（μV，$\bar{x}\pm s$）

组 别	损伤前	损伤即刻	1 周	2 周	4 周	8 周
晶状体蛋白组	73.46±16.46	10.38±2.28	13.58±2.18	21.4±3.34	29.54±4.69[a]	36.68±4.80[b]
对照组	72.34±11.21	10.10±2.07	11.90±3.10	17.82±2.59	18.32±2.50	22.40±2.55

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

3 讨论

王艳华等[5]在体外培养 RGCs 的研究提示可溶性晶状体蛋白是一种晶状体来源的“神经保护物质”，有促进 RGCs 突起生长的作用，混合晶状体蛋白在动物活体内是否也具有促进轴突再生作用，尚少见报道。

本实验室已经证实[5,8]，晶状体蛋白有较强 RGCs 保护作用。本实验中轴突的 WGA 顺行标记及电镜检查都显示：玻璃体腔注射晶状体蛋白组较等渗盐水对照组有更强的促进轴突再生的能力，同时保存了更多的神经轴突。这说明，在视神经急性损伤过程中保护更多的 RGCs 存活，为保存神经轴突和周突再生提供了有利的物质基础，晶状体蛋白可能通过增强 RGCs 对原发损伤及继发损伤的抵抗力，减轻轻微损伤和未损伤轴突的神经元继发变性、凋亡，缓解了神经组织变性速度，从而保存较多的神经纤维。

本实验结果显示在视神经钳夹伤后早期（1～2 周），即使不给处理因素，也有少许再生纤维能够够发芽长入损伤区，提示在损伤后早期 RGC 有旺盛的再生潜能。神经再生的微环境是影响再生的更重要的因素，再生的成功与否是神经元这种再生能力在漫长的再生过程中同周围恶劣环境抗衡的结果。损伤后早期再生的障碍主要来源于由活化的胶质细胞分泌的抑制性分子形成的化学屏障，而形成胶质瘢痕之后，损伤区的胶质瘢痕是阻碍轴突再生的物理屏障[9]。再生的纤维直径往往较小，为 0.1～0.2 μm（也有少数直径较大约 1 μm），常 2～10 个聚集，提示在再生纤维周围存在一个相对优越的微环境。在电镜检查中观察到尤其在损伤后 4～8 周，晶状体蛋白组有更多的再生轴突通过损伤区，每簇再生轴突数量明显多于等渗盐水对照组，8 周以后在夹伤点 5.5 mm 处仍发现较多的再生轴突，而对照组未发现再生轴突。这与 WGA 顺行标记结果一致：玻璃体腔注射晶状体蛋白能够帮助轴突尽快通过损伤区，并且促进更多的轴突再生，并且生长的更远。在证明晶状体蛋白能够促进轴突再生能力的同时，也许能够提示晶状体蛋白能够使局部微环境得到一定的改善。而晶状体蛋白是否在早期抑制胶质细胞分泌的抑制性分子，是否能够抑制胶质瘢痕的形成，还需要进一步研究。

促进轴突再生的最终目的就是最大可能的恢复视功能，F-VEP 能客观反映视神经损伤程度、神经传导功

能状态,可敏感地反映视神经损伤的程度[10],振幅表示完整轴突及其与靶区突触联系的数量。因此,在本实验中对振幅进行了统计学分析,伤后 4 周,振幅明显恢复,晶状体蛋白组振幅恢复好于对照组($P<0.05$),伤后 8 周,晶状体蛋白组振幅恢复至正常的 49.9%,显著高于对照组($P<0.01$)。提示视神经损伤后,晶状体蛋白能够改善视功能,可能是通过轴浆流恢复,减少继发损害,保存了相对多的轴突,促进再生纤维的延长。

我们虽然观察到玻璃体腔注射晶状体蛋白促进部分纤维的再生,但因神经损伤是一个复杂的过程,仍然不能解决轴突再生的难题,而我们毕竟观察到了再生作用的存在,可能为轴突再生研究提供一种比较有效的途径。

参考文献:

[1] Fischer D, Pavilidis M, Thanos S. Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 14(12): 3943 - 3954.

[2] Leon S, Yin Y, Nguyen J, *et al*. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve[J]. J Neurosci, 2000, 20(12): 4615 - 4626.

[3] Fischer D, Heiduschka P, Thanos S. Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats[J]. Exp Neurol, 2001, 172(2): 257 - 272.

[4] Lorber B, Berry M, Logan A, *et al*. Effect of lens lesion on neurite outgrowth of retinal ganglion cells *in vitro*[J]. Mol Cell Neurosci, 2002, 21(2): 301 - 311.

[5] 王艳华,王　一. 晶体蛋白对离体培养的大鼠视网膜神经节细胞的作用[J]. 中华创伤杂志,2005,21(2):98 - 103.

[6] Weibel D, Kreutzberg G W, Schwab M E. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion - induced axonal die-back in young rat optic nerve[J]. Brain Res, 1995, 679(2): 249 - 254.

[7] Fukuda Y, Watanabe M, Sawai H, *et al*. Functional recovery of vision in regenerated optic nerve fibers[J]. Vision Res, 1998, 38(10): 1545 - 1553.

[8] 刘志敏,任　蕾,王　一,等. 混合晶状体蛋白对大鼠视神经损伤后视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(12): 926 - 929.

[9] Zhang Y, Winterbottom J K, Schachner M, *et al*. Tenascin-C expression and axonal sprouting following injury to the spinal dorsal columns in the adult rat[J]. J Neurosci Res, 1998, 49(4): 433 - 450.

[10] 蔡　莉,惠延年,郭守一. 严重视神经损伤后视觉诱发电位变化分析[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 1999, 21(5): 407 - 408.

(编辑　龙　亮)

文章编号:1000-5404(2008)19-1817-01

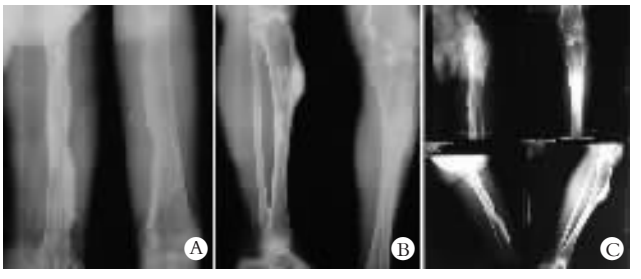
个案与短篇

左下肢蜡泪样骨病 1 例

宗兆文,沈　岳　(第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤科二病区,重庆 400042)

患者,男性,48 岁。2007 年 6 月因"左下肢疼痛、跛行伴左膝关节屈曲受限"就诊我院门诊。查体可见左大腿前侧大量浅表静脉曲张,左小腿中上 1/3 可见一大小约 3 cm × 2 cm 的突起。左下肢前侧全长可触及高低不平的骨性结节,质硬,无明显活动度,与周围组织无明显粘连。左侧髋关节被动活动度基本正常,侧膝关节伸直 0°,屈曲 70°。双侧踝关节活动度基本正常。院外 X 线平片可见:左侧股骨和胫骨中上端可见大量骨质增生和堆积,其边缘凹凸不平,呈波浪状,酷似蜡烛上的溶蜡下淌(图 1A,B)。

仔细追问病史发现患者自儿童时期开始便发现跛行、左下肢轻度疼痛、凸凹不平的骨性结节。建议患者行手术治疗,解决膝关节屈曲受限,但患者认为尚能满足日常生活而拒绝,遂给予观察,疼痛明显时给予口服止痛药。2008 年 5 月来我院复查,其症状、体征和 X 线平片的表现无显著改变(图 1C),同时检查脊椎和手、足部 X 线平片,未见类似病变。



A:左股骨正侧位片;B:左胫腓骨骨正侧位片;C:1 年后复查左下肢正侧位片

图 1　左下肢蜡泪样骨病的 X 线片表现

讨论

蜡泪样骨病,又称为蜡油骨病、烛泪样骨质增生等,是一种罕见的骨质硬化性疾病。1922 年首先由 Leri 和 Joanny 报道,其病因不清,无明显的遗传及家族病史。发病从儿童开始,青中年期患者多见,男女比例大致相等。

(下转 1827 页)

作者简介:宗兆文,男,江苏省铜山县人,博士,副研究员,主要从事脊髓损伤修复、放创复合伤组织修复和骨创伤方面的研究。E-mail: zongzhaowen2006@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-06-03;**修回日期**:2008-07-02