论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1040-03

急性高眼压后大鼠视网膜突触囊泡素的表达变化

陈 旦,王 慧,童建斌,曾乐平,蒋丽珠,周 瑾,黄菊芳,罗学港 (中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系,长沙 410013)

摘 要:目的 研究急性高眼压后大鼠视网膜突触囊泡素(synaptophysin, SYN)的表达变化。方法 SD大鼠左眼眼压升高至闪光视网膜电图b波消失并维持60 min,右眼为正常对照,动物存活1、3、7、14、21 d后处死,冰冻切片行SYN免疫组织化学及原位杂交检测。结果 正常情况下SYN蛋白分布于视网膜内、外网层,外网层染色较深,急性高眼压后SYN阳性产物除外网层分布外,还出现于外核层的内侧部分,存活7 d时,阳性产物在外网层及外核层的分布范围最宽,至14 d时又恢复至与正常相似的分布模式。SYN mRNA阳性产物主要分布存在于内核层与节细胞层的神经元胞体,急性高眼压后1、3、7 d时内核层SYN mRNA阳性细胞数逐渐增多,均高于正常水平,14 d时又恢复至正常水平。结论 急性高眼压后大鼠视网膜SYN的表达先增强后减弱,且出现空间分布的改变,提示急性高眼压损伤后视网膜内突触溃变前可能存在突触功能增强的时期。

关键词:突触囊泡素 突触 突触发生 溃变 急性高眼压
中图法分类号:R322.9;R339.146;R775.02 文献标识码:A

Expression of synaptophysin in rat retina following acute high intraocular pressure

CHEN Dan, WANG Hui, TONG Jian-bin, ZENG Le-ping, JIANG Li-zhu, ZHOU Jin, HUANG Ju-fang, LUO Xue-gang (Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha Hunan 410013, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of synaptophysin (SYN) in rat retina following acute high intraocular pressure (HIOP). Methods The intraocular pressure of all left eyes was increased until b wave of flash electroretinogragh (fERG) disappeared and such pressure maintained for 60 min. All right eyes served as normal control. The animals, totally 60 SD rats, were sacrificed respectively on day 1, 3, 7, 14 or 21 following operation, with 12 rats on each sacrifice day, half for immunohistochemistry and half for *in situ* hybridization to detect the expression of SYN. Results In normal condition, SYN was mainly located in the outer plexiform layer (OPL) and the inner plexiform layer (IPL). SYN positive products were extended to the inner part of the outer nuclear layer (ONL) after HIOP. There was the widest distribution of SYN in the OPL and ONL on the 7th day after HIOP. On the 14th day, the distribution of SYN was similar to that of the normal control. By *in situ* hybridization, SYN positive neurons were mainly located in the inner nuclear layer (INL) and the ganglion cell layer (GCL). The number of SYN mRNA positive cells in the INL was increased following HIOP and reached its peak on the 7th day, then decreased to normal level at the 14th day. Conclusion In rat retina, SYN expression was first up-regulated, then down-regulated, accompanied with spatial redistribution following HIOP, indicating that instead of synaptic degeneration, the synaptic function is first enhanced at the early stage following HIOP.

Key words: synaptophysin; synapse; synaptogenesis; degeneration; acute intraocular high pressure

正常大鼠视网膜神经元之间具有复杂的纵向与横向突触联系。突触密集的视网膜内网层和外网层是视觉信息传递的关键区域,该区域突触数量和结构的变化均可影响视觉功能[1]。研究该区域的突触变化对以视功能破坏为代表的青光眼、糖尿病视网膜病变等的研究具有重要意义。我们在长期的急性高眼压损伤修复研究中发现,急性高眼压后视网膜节细胞进行性减少,内层视网膜厚度变薄[2],但我们过去的研究主要集中于视网膜节细胞的损伤机制和保护措施,并未对视网膜内外网层突触形态及功能的改变情况进行系统观察。本实验通过观察大鼠视网膜内突触囊泡素(synaptophysin, SYN)的表达变化,初步研究了急性高眼压损伤后视网膜内突触的变化情况。

基金项目:国家自然科学基金(30570979, 30671100)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570979, 30671100)
作者简介:陈 旦,女,湖南省长沙市人,博士研究生,主要从事视觉神经生物学方面的研究,发表论文8篇。电话:(0731)2650421, E-mail: dannychen0101@gmail.com
通信作者:黄菊芳,电话:(0731)8836045
收稿日期:2007-07-17 修回日期:2008-03-25

1　材料与方法

1.1 实验动物

成年健康 SD 大鼠 60 只（体质量 200 ~ 250 g），购自中南大学实验动物学部，雌雄不限，双眼等大，角膜透明，瞳孔规则。将动物随机数字表法分成 1、3、7、14、21 d 5 组，每组 12 只（其中 6 只动物行免疫组织化学检测，另 6 只行原位杂交检测）。左眼为实验眼，右眼设为正常对照。

1.2　高眼压动物模型制备

高眼压动物模型制备参照文献[2]，主要步骤为：大鼠预先暗适应 2 h，暗红光下腹腔注射 2% 戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉后，头部固定于立体定位仪上，左眼前房注入生理盐水加压至闪光视网膜电图（fERG）b 波消失的临界眼内压[（103.5 ± 7.3）mmHg，1 mmHg = 0.133 kPa]，此时可见动物左眼虹膜苍白，角膜浑浊、外突，瞳孔散大，并维持此眼内压 60 min。然后将眼压缓慢降至加压前水平，动物分别存活 1、3、7、14、21 d 后处死。

1.3　免疫组织化学染色

实验动物达存活时间点后，用 4% 多聚甲醛经左心室灌注固定，取双眼眼球，去角膜、晶状体和玻璃体后，4% 多聚甲醛后固定 2 h，取视杯用梯度蔗糖浸泡沉底，-20 ℃ 三顿恒低温切片机切片，片厚 20 μm。取带视神经的视网膜横切片贴片。取视网膜冰冻切片按 ABC 法行免疫组织化学染色。一抗为小鼠抗 SYN（Chemicon，1∶1 000）单克隆抗体，4 ℃ 冰箱过夜，二抗为生物素标记的羊抗小鼠 IgG（Sigma，1∶200），37 ℃ 孵育 1 h，ABC 复合物（Vector，1∶200）37℃ 孵育 1 h，在 0.05% DAB（Sigma）和 0.03% H_2O_2 反应液中显色。梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4　原位杂交

实验动物达存活时间点后，用 4% 多聚甲醛经左心室灌注固定，取双眼眼球，去角膜、晶状体和玻璃体后，4% 多聚甲醛后固定 2 h，取视杯用灭菌的 30% 蔗糖浸泡沉底，-20℃ 三顿恒低温切片机切片，片厚 20 μm。取带视神经的视网膜横切片贴片。干片后切片按原位杂交检测试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司）操作程序进行原位杂交检测。3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶处理 1 min 以暴露 mRNA 核酸片段，灭菌的 1% 多聚甲醛室温后固定 10 min，预杂交液 38℃ 3 h，地高辛标记的针对 SYN 的寡核苷酸探针 38 ℃ 过夜，生物素化小鼠抗地高辛室温孵育 2 h，SABC 室温孵育 30 min，生物素化过氧化物酶室温孵育 30 min，0.05% DAB（Sigma）和 0.03% H_2O_2 反应液显色。梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。预杂交后不加探针作为阴性对照。

1.5　数据收集和处理

每只动物取 2 张切片，每张切片采用 Nikon Coolpix950 数码相机在 Motic 显微镜 40 倍物镜下以视神经为中心对称取 6 个部位（3 个部位/侧，12 个部位/动物）摄片，所摄照片输入计算机后采用 Motic 高清晰彩色图像测量系统测定相应部位视网膜外网层 SYN 免疫组织化学染色平均灰度值（平均灰度值 = 所测部位被分割成 N 个小区的灰度值总和/N，其值大小与染色深浅呈负相关）0 - 160 范围内阳性产物面积；标记内核层 SYN mRNA 原位杂交染色平均灰度值 0 - 150 阳性细胞，结合原图片计数内核层阳性细胞数。数据通过 SPSS 13.0 软件对各组间均数进行单因素方差分析（one way-ANOVA）。

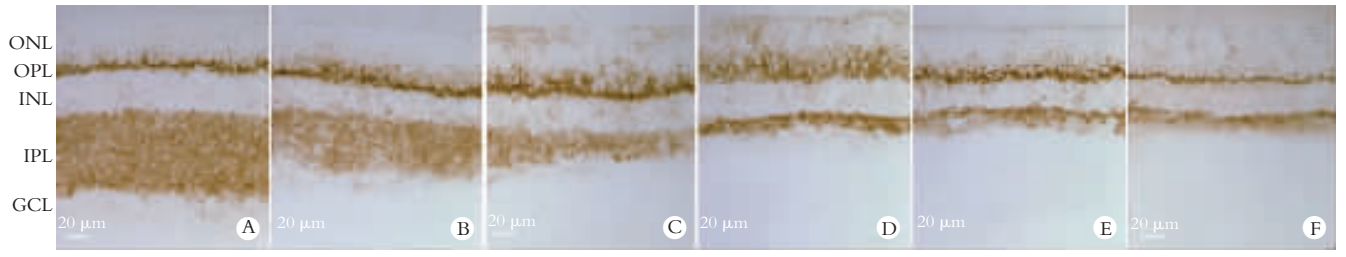
2　结果

2.1　急性高眼压后视网膜内 SYN 蛋白空间分布改变

正常对照组 SYN 蛋白的免疫阳性产物主要分布于视网膜外网层（outer plexiform layer，OPL）和内网层（inner plexiform layer，IPL），OPL 染色较深（图 1）。急性高眼压后 SYN 蛋白在 OPL 的分布发生改变，急性高眼压后 1、3、7 d，SYN 阳性产物除了分布于 OPL 外，还出现于外核层（outer neuclear layer，ONL）的内侧部分，且分布范围逐渐增宽，7 d 时最宽，视野下阳性产物面积为（11 035.8 ± 435.6）μm^2，显著高于正常水平（8 442.8 ± 469.4）μm^2（$P < 0.05$）；至 14 d 时，SYN 阳性产物又主要分布于 OPL，阳性产物面积为（7 573.2 ± 480.4）μm^2，与正常相似（$P > 0.05$）；21 d 时，SYN 在 OPL 的分布变窄，阳性产物面积为（4 689.8 ± 353.9）μm^2，低于正常水平（$P < 0.05$）（图 1）。急性高眼压后，SYN 始终在 IPL 的全层分布，但 IPL 随存活时间的延长逐渐变薄（图 1）。

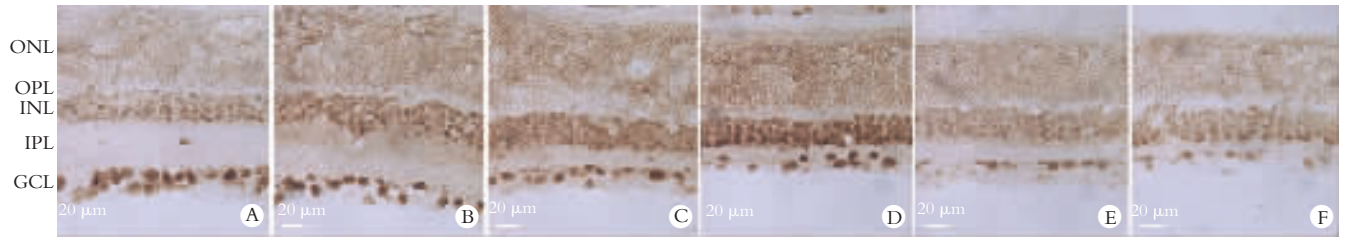
2.2　急性高眼压后视网膜内 SYN mRNA 的表达变化

原位杂交结果显示，正常情况下 SYN mRNA 阳性产物主要位于节细胞层（ganglion cell layer，GCL）与内核层（inner neuclear layer，INL）的神经元胞体，GCL 层细胞染色较深。急性高眼压后 1、3、7d 时 INL 的 SYN mRNA 阳性细胞数逐渐增多，视野下分别为（110.1 ± 2.3），（138.1 ± 3.7），（148.5 ± 12.8）个，均高于正常水平（84.3 ± 2.2）个（$P < 0.05$），14 d 和 21 d 时阳性细胞数下降，分别为（84.5 ± 2.0）个和（80.2 ± 3.5）个，与正常相似（$P > 0.05$）（图 2）。GCL 层细胞数目随急性高眼压后动物存活时间的延长而减少，此层 SYN mRNA 阳性细胞数也随之减少（图 2）。



A：正常对照组；B：1 d 组；C：3 d 组；D：7 d 组；E：14 d 组；F：21 d 组　　GCL：节细胞层；IPL：内网层；INL：内核层；OPL：外网层；ONL：外核层

图 1　急性高眼压后不同存活时间点大鼠视网膜 synaptophysin 蛋白的免疫组织化学染色



A：正常对照组；B：1 d 组；C：3 d 组；D：7 d 组；E：14 d 组；F：21 d 组　GCL：节细胞层；IPL：内网层；INL：内核层；OPL：外网层；ONL：外核层

图2　急性高眼压后不同存活时间点大鼠视网膜 synaptophysin mRNA 的原位杂交

3　讨论

SYN 是位于突触囊泡膜上的膜整合蛋白，参与突触囊泡的形成与细胞胞吐作用，与神经递质释放密切相关，可反映突触功能，在神经组织发育过程中 SYN 还是突触形成的标志并与突触可塑性关系密切[3-5]。本实验通过检测急性高眼压后大鼠视网膜内突触标志物 SYN 的表达变化，初步观察了视神经损伤后视网膜内部突触功能的变化情况。实验结果显示，急性高眼压后视网膜内 SYN 蛋白在外网层发生重新分布，阳性产物分布范围增宽，延伸至原本不表达 SYN 的外核层的内侧部分，急性高眼压后 7 d 时，分布范围最宽。14 d 时又变窄，回复至正常水平，而 21 d 时，SYN 的分布进一步变窄，低于正常水平。与此同时，急性高眼压后 1、3、7 d 视网膜内核层 SYN mRNA 阳性产物也逐渐增加，高于正常水平，其变化趋势与 SYN 蛋白阳性面积扩大趋势一致，提示视网膜神经元在基因转录水平增加了 SYN 合成，这可能是急性高眼压后早期 SYN 蛋白的表达增高的物质基础。而 14 d 及 21 d 时，SYN mRNA 阳性产物量减少，回复至正常水平。急性高眼压后早期视网膜内 SYN 的分布改变及合成增加提示，在该阶段视网膜内可能经历了一个突触功能增强或新突触发生的过程。

神经元轴突损伤后，除了发生远侧端 Waller 变性和近侧端逆行性溃变外，还可能出现跨突触变性，有研究显示，高眼压后除直接受损的视网膜节细胞外，外侧膝状体的神经元也会发生顺行性的跨突触溃变[6,7]。我们的实验观察到在急性高眼压损伤后早期，视网膜内神经元合成 SYN 增加，SYN 蛋白在 OPL 分布范围增宽，提示急性高眼压后视网膜内向节细胞传入信息的神经元的突触也发生了跨神经元的逆行性改变，但并非一开始就发生突触溃变，而是在急性高眼压后早期先出现功能增强，这种功能增强可能来源于突触活动增加或新突触发生。我们推测，因为急性高眼压损伤主要累及视网膜节细胞胞体及突起，早期视觉信号在视觉通路的第一级和第二级神经元间的传递仍畅通，传至节细胞时受阻，此时视网膜可能通过反应性增强突触活动或增加突触数量来维持正常的视觉信号传递。而且有研究显示，高眼压损伤后早期，视网膜可能通过增加自分泌或旁分泌保持神经营养因子的分泌水平，这也为突触功能蛋白合成增加提供了支持[8]。随着损伤时间的延长，视网膜神经元损伤进一步加重，同时，视网膜内神经营养因子水平下降[8]及早期的突触活动增强所导致的神经营养因子耗竭等，使神经元蛋白合成能力降低，我们的实验也观察到在急性高眼压损伤后 14 d 和 21 d SYN 蛋白合成下降。SYN 蛋白合成下降和分布范围变窄均提示突触溃变发生。综上所述，急性高眼压损伤可导致除节细胞死亡、内层视网膜变薄等神经元直接损伤外，还可以引发视网膜内逆行性的跨神经元突触溃变，但在这种溃变前可能存在突触功能增强的时期。

参考文献：

[1] Nag T C, Wadhwa S. Differential expression of syntaxin-1 and synaptophysin in the developing and adult human retina[J]. J Biosci, 2001, 26(2): 179-191.

[2] 熊　鲲，黄菊芳，童建斌，等. 急性大鼠眼高压诱导的不同缺血/再灌内层视网膜的变化[J]. 解剖学杂志，2005，28(1)：46-49.

[3] Dhingra N K, Ramamohan Y, Raju T R. Developmental expression of synaptophysin, synapsin I and syntaxin in the rat retina[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1997, 102(2): 267-273.

[4] Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, *et al*. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis?[J]. Bioessays, 2004, 26(4): 445-453.

[5] Davies H A, Kelly A, Dhanrajan T M, *et al*. Synaptophysin immunogold labelling of synapses decreases in dentate gyrus of the hippocampus of aged rats[J]. Brain Res, 2003, 986(1-2): 191-195.

[6] Yucel Y H, Gupta N, Zhang Q, *et al*. Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma[J]. Arch Ophthalmol, 2006, 124(2): 217-225.

[7] Gupta N, Ly T, Zhang Q, *et al*. Chronic ocular hypertension induces dendrite pathology in the lateral geniculate nucleus of the brain[J]. Exp Eye Res, 2007, 84(1): 176-184.

[8] Rudzinski M, Wong T P, Saragovi H U. Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension[J]. J Neurobiol, 2004, 58(3): 341-354.

（编辑　邓强庭）