论著

文章编号:1000-5404(2010)10-1012-04

RCS大鼠视网膜变性过程中α亚型神经节细胞树突形态学变化

王凌妍,王 一,阴正勤 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心)

[摘要] **目的** 研究皇家外科学院大鼠(royal college of surgeon rat,RCS)视网膜变性过程中α亚型视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)树突形态学变化规律。**方法** 按照视网膜色素变性发展的不同阶段,选取出生后21、30、60、90 d的RCS-P$^+$大鼠(RCS组)与RCS-rdy$^+$大鼠(对照组)各3只,采用DiI示踪标记方法观察RCS组α亚型视网膜神经节细胞的树突在视网膜变性过程中形态学变化的规律。**结果** RCS组各天龄间、对照组大鼠发育过程中各天龄间、RCS组与对照组相对应天龄段间一、二级分支数目之间比较无显著差异($P>0.05$)。RCS组大鼠视网膜变性过程中,α亚型RGCs树突一级分支直径60 d组较21 d组变细[(2.02±0.17) μm *vs* (2.66±0.11) μm,$P<0.01$],RCS组与对照组大鼠α亚型RGCs树突一级分支直径比较,21 d增粗[(2.66±0.11) μm *vs* (2.23±0.10)μm,$P<0.01$]。RCS组90 d(15.44±1.50)较21 d(26.91±3.01)、30 d(27.20±1.99)α亚型RGCs细胞树突分支频率显著减少($P<0.01$,$P<0.05$)。对照组大鼠发育过程中α亚型RGCs树突分支频率比较,60 d(28.67±2.78)较21 d(16.09±1.71)、30 d(17.75±1.79),90 d(26.18±2.48)较21 d组有显著增加($P<0.01$,$P<0.05$),其余各组间没有明显差异($P>0.05$)。RCS组与对照组大鼠α亚型RGCs树突分支频率相对应21、30、60、90 d组间比较均有显著差异($P<0.05$)。**结论** RCS大鼠视网膜色素变性过程中,视网膜α亚型RGCs树突分支频率在早期增多,但随着病变的发展到中、晚期树突终末分支显著减少,提示在视网膜变性过程中α亚型RGCs树突的信息传递功能可能发生了变化。

[关键词] 视网膜变性;视网膜神经节细胞;树突;大鼠

[中图法分类号] R774.13; R329.24; R338.12 **[文献标志码]** A

Dendrite morphological characteristics during degenerative process of retinal ganglion cells in royal college surgeons rats

Wang Lingyan, Wang Yi, Ying Zhenqin (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To study the morphological diversity of retinal ganglion cells (RGCs) in the pathological development of retinitis pigmentosa in royal college of surgeon (RCS) rats. **Methods** The retinal whole mount preparations of RCS-P$^+$ and RCS-rdy$^+$ rats in 21, 30, 60 and 90 d were stained by DiI to study the morphological diversity of retinal ganglion cells. **Results** In the pathological development of the retina of the RCS rats, the amount of first and second level of dendrite branching, the diameter of first level of dendrite branching, and the frequency of dendrite branching of α subgroup of retinal ganglion cells had no significant difference with each other ($P>0.05$). The diameter of dendrite branching at the first level of α subtype of RGCs was markedly increased by 0.44 μm on the 60th day compared with on the 21st day during the degenerative process of RCS-P$^+$ rats(2.02±0.17 *vs* 2.66±0.11 μm, $P<0.01$). Moreover, the diameter of of those dendrite branching at the first level was markedly increased by 0.43 μm compared with RCS-rdy$^+$ rats on the 21st day(2.66±0.11 *vs* 2.23±0.10 μm, $P<0.01$). The frequency of dendrite branching of α subtype of RGCs was significantly decreased on the 90th day (15.44±1.50) compared with that at the 21st (26.91±3.01, $P<0.01$) and 30th days (27.20±1.99, $P<0.05$) respectively during the degenerative process of RCS-P$^+$ rats. In contrast, the frequency of dendrite branching of α subtype of RGCs was increased significantly in the 60th day (28.67±2.78) than in the 21st (16.09±1.71) and 30th days(17.75±1.79) ($P<0.01$), and in the 90th (26.18±2.48) day than in the 21st day ($P<0.05$) during the development of RCS-P$^+$ rats.

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2007CB512203)

[通信作者] 王 一, E-mail: wangyieye@yahoo.com.cn

In addition, there were also differences in frequency of dendrite branching of α subtype of RGCs between RCS-P$^+$ and RCS-rdy$^+$ rats on the 21st, 30th , 60th, and 90th days respectively. **Conclusion** In the pathological development of retinitis pigmentosa, frequency of dendrite branching of α subgroup of RGCs is increased significantly in the early stage, while the frequency of dendrite branching is decreased during middle and late stage. Our research suggests that the process of α subgroup of retinal ganglion cells may have changed in the retinal degeneration of dendrites of the information transmission function.

[Key words] retinal degeneration; retinal ganglion cells; dendrites; rats

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2007CB512203). Corresponding author: Wang Yi, E-mail: wangyieye@yahoo.com.cn

皇家外科学院(royal college surgeons, RCS)大鼠是遗传性视网膜色素变性疾病的经典动物模型,其病理特征为感光细胞进行性变性,并且随病程进展致使包括视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)在内的各级神经元功能障碍[1]。视网膜神经节细胞是视网膜内唯一向高级视觉中枢投射的神经元,既往的研究发现,在 RCS 大鼠视网膜变性的病理过程中,随着光感受器细胞的缺失, RCS 大鼠在生后 5 周龄时 RGCs 数量即出现明显减少,7 周龄细胞数量减少达高峰,其中尤以 α 亚型神经节细胞数量减少最为明显[2]。但是在视网膜变性的不同时期,α 亚型神经节细胞形态,特别是反应 RGC 传导功能的树突形态发生了怎样的改变尚不清楚。由于 α 亚型是 RGCs 中胞体最大,也是在视网膜变性病过程中对损伤最为敏感的细胞亚群,研究 α 亚型 RGCs 在视网膜变性过程中形态学变化规律, 可为视网膜变性过程中组织病理发展演变规律提供新的认识,并为视网膜移植研究提供一定的依据。本研究采用全视网膜铺片后行 DiI 荧光染色方法,对视网膜的第 3 级神经元神经节细胞形态进行观察,从单个细胞水平研究神经节细胞树突形态学变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验选用的实验组 RCS-P$^+$ 大鼠(RCS 组)及正常对照 RCS-rdy$^+$ 大鼠(对照组)视网膜均有色素。选取 2 种大鼠 21、30、60、90 d 各 3 只,体质量 150 ~ 250 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,符合国家医用动物实验标准,标准号为清洁级。

1.2 实验方法

1.2.1 视网膜平铺片的制备和处理 腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉处死大鼠。取出大鼠双侧眼球, 迅速置于 4% 多聚甲醛固定液中,室温固定 10 min 后,解剖显微镜下沿角巩膜缘剪除角膜,去除晶状体,完整剥离视网膜,尽量剥离玻璃体。将剥离好之视网膜沿视网膜上、下、颞、鼻 4 个方向向心剪开,平铺于干净载玻片上。

1.2.2 全视网膜铺片 DiI 染色 将固定好的视网膜平铺于干净的载玻片上,并使神经节细胞层向上。用滤纸吸去视网膜周边多余水分后,用干净的注射器针头在各象限距视乳头 3 mm 处划一小口并埋入 1 颗 DiI 颗粒。将视网膜浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中,避光 37 ℃固定 6 d。

1.2.3 图像分析 荧光显微镜下观察视网膜铺片 4 个象限中染色结果是否清晰,结果能否纳入分析。激光共聚焦显微镜 200 倍镜下选取染色清晰细胞,400 倍镜下拍照,激光共聚焦显微镜操作系统自带的分析软件 LSM Image 对神经节细胞形态进行三维重构,并测量胞体直径,选取胞体横径≥14 μm 的细胞进行分析,测量 1 级分支数目及 2 级分支数目,1 级分支直径及树突分支频率。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 10.1 统计软件,对实验数据均数比较采用单因素方差分析,组间均数比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 全视网膜铺片 DiI 染色和荧光显微镜观察结果

RCS 组大鼠 21 d 龄段获得完整视网膜铺片 6 个,30、60 d 各 5 个,90 d 4 个,共获得 48 个形态清晰的 α 亚型视网膜神经节细胞。对照组大鼠 21、30、60 d 段获得完整视网膜铺片各 5 个,90 d 4 个,共获得 52 个形态清晰的 α 亚型视网膜神经节细胞。LEICA DM TRET 显微镜观察,所有视网膜铺片 DiI 染色获得的视网膜神经节细胞形态清晰(图 1),图像满足形态学研究要求。

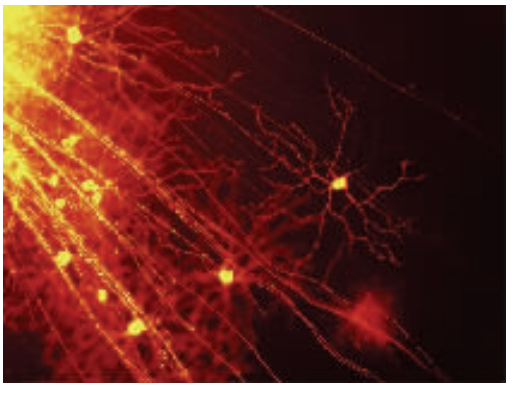


图 1 荧光显微镜下视网膜神经节细胞 DiI 染色观察 (×200)

2.2 图像分析结果

2.2.1 α亚型视网膜神经节细胞1、2级分支数目比较 RCS组各天龄间、对照组大鼠发育过程中各天龄间、RCS组与对照组大鼠相对应天龄段间1、2级分支数目之间比较无显著差异($P>0.05$)。见表1、2。

表1 2组大鼠不同天龄α亚型神经节细胞1级分支数目($n=90$, $\bar{x}\pm s$)

组别	21 d	30 d	60 d	90 d
RCS组	4.17±0.41	3.56±0.20	3.78±0.43	3.50±0.56
对照组	3.25±0.37	3.18±0.40	3.88±0.64	3.88±0.48

表2 2组大鼠不同天龄α亚型神经节细胞2级分支数目($n=90$, $\bar{x}\pm s$)

组别	21 d	30 d	60 d	90 d
RCS组	8.58±0.85	7.69±0.46	7.89±0.90	7.33±1.09
对照组	7.00±0.74	6.73±0.79	8.00±1.25	7.88±0.97

2.2.2 α亚型视网膜神经节细胞1级分支直径比较 RCS组60 d较21 d一级分支直径显著变细($P<0.05$)。对照组大鼠发育过程中,各天龄段之间相比较未见显著差异($P>0.05$)。而RCS大鼠与对照组大鼠相对应21 d之间相比较有非常显著差异($P<0.01$),其余各组间未见显著差异($P>0.05$)。见表3。

表3 2组大鼠不同天龄α亚型视网膜神经节细胞1级分支直径(μm,$n=90$, $\bar{x}\pm s$)

组别	21 d	30 d	60 d	90 d
RCS组	2.66±0.11[a]	2.41±0.11	2.02±0.17[b]	2.31±0.36
对照组	2.23±0.10	2.05±0.15	2.18±0.18	2.55±0.20

a: $P<0.01$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与21 d比较

2.2.3 神经节细胞树突分支频率 RCS组与对照组大鼠不同天龄α亚型视网膜神经节细胞树突分支频率见表4。RCS组90 d较21、30 d分别有显著差异($P<0.01$,$P<0.05$)。对照组大鼠发育过程中,60 d较21、30 d,90 d较21 d有显著差异($P<0.05$,$P<0.05$)。RCS组与对照组大鼠相对应21、30、60、90 d之间相比较均有显著差异($P<0.05$)。

表4 RCS和对照组大鼠不同天龄α亚型神经节细胞树突分支频率($n=90$, $\bar{x}\pm s$)

组别	21 d	30 d	60 d	90 d
RCS组	26.91±3.01[ab]	27.20±1.99[ab]	19.33±2.36[b]	15.44±1.50[b]
对照组	16.09±1.71	17.75±1.79	28.67±2.78	26.18±2.48

a: $P<0.05$,与90 d比较;b: $P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一类以进行性感光细胞和色素上皮细胞功能障碍为特征的遗传性疾病。随着视网膜变性病程的发展,视网膜内所有细胞,包括光感受器细胞、双极细胞、节细胞、无长突细胞、水平细胞、Müller细胞、神经胶质细胞等在分子水平、细胞和组织水平结构和功能发生改变[1,3,11,12]。随着视网膜色素上皮细胞及光感受器细胞的替代、移植治疗成为拯救视网膜变性疾病的主要策略,对RP疾病的研究多集中于视网膜的1、2级神经元即光感受器细胞、双极细胞等形态功能的研究,对于神经节细胞的形态学研究多集中于对其细胞数量及细胞分布的研究,未细化至细胞亚型及其突触形态的研究。视网膜神经节细胞是视网膜内的3级神经元,视网膜发育中第1个产生的神经元,其树突主要与双极细胞联系,也可通过无长突细胞横向联系;其轴突延伸形成视神经,是视觉传输系统的重要组成部分。研究视网膜变性过程中视网膜神经节细胞突触形态的变化对视网膜变性过程中组织病理发展演变规律提供新的认识,为今后的视网膜移植等治疗提供理论基础。

既往对视网膜神经节细胞研究,根据细胞的形态将其分为3类:α、β和γ细胞[4,13,14],并将神经节细胞分为大(胞体横径≥14 μm)、中(胞体横径在11~14 μm)、小(胞体横径在6~10 μm),分别对应α、β和γ 3种亚型[5]。张晨星等[2]发现,RCS大鼠视网膜变性过程中,神经节细胞数量在5周龄时出现显著减少,7周龄开始,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。在这种以视网膜感光细胞进行性减少进而导致的视网膜的各级神经元的慢性病变过程中,胞体直径较大的神经节细胞较胞体直径小的神经节细胞对损伤更为敏感。因此,本研究选用胞体横径≥14 μm的α亚型视网膜神经节细胞作为观察对象。视网膜神经节细胞的树突是接受神经信号传入的主要部位,树突的形态发生对突触信号的输入、处理以及神经环路的形成起重要作用。为充分显示视网膜神经节细胞的胞体及树突形态,本研究采用全视网膜铺片后DiI示踪染色技术,根据RGCs细胞体和树突野的大小以及树突分支的特点来对RGCs进行分类[6]。神经节细胞树突表面可见许多棘状突起称为树突棘是形成突触的部位。树突具有接受刺激并将冲动传入细胞体的功能,而树突的分支和树突棘可以扩大神经元接受刺激的表面积。因此,观察RCS大鼠视网膜变性过程中α亚型神经节细胞树突直径,1、2级分支树目,树突分支频率,可以直接反映了树突形态学变化。

RCS大鼠在生后15 d睁眼,视网膜光感受器在大鼠睁眼后即开始发生变性,且神经节细胞是视网膜中最先发育的神经元,21 d时已基本发育成熟,既往的研究认为视网膜变性疾病分为早、中、晚3期,即对应在RCS大鼠30、60、90 d[3]。因此,我们选用生后21、

30、60、90 d的RCS大鼠观察α亚型神经节细胞形态上的变化。本实验中,全视网膜铺片DiI染色行激光共聚焦扫描结果显示,RCS大鼠与对照组大鼠α亚型神经节细胞1级分支直径比较,21 d RCS大鼠组α亚型神经节细胞1级分支直径出现显著增加($P<0.05$),由于1级分支是从胞体发出的树突,也是最粗大树突分支,因此在视网膜变性中α亚型神经节细胞1级分支直径显著增粗推测可能是在视网膜变性疾病的早期,α亚型神经节细胞在的1种代偿性变化。分析α亚型神经节细胞树突分支频率发现,在早期21、30 d,RCS大鼠α亚型神经节细胞树突分支频率较对照组大鼠有显著增加($P<0.05$),而在60、90 d,RCS大鼠α亚型神经节细胞树突分支频率较对照组大鼠有显著减少($P<0.05$)。对照组大鼠α亚型神经节细胞树突分支频率组内比较结果发现,树突分支频率在60 d较21、30 d出现显著增加,90 d较21 d有显著增加,而90 d与30、60 d比较无显著差异。因此,我们推测在大鼠发育过程中,α亚型神经节细胞为了与周围神经元形成突触联系,树突分支频率呈递增的趋势,在90 d增长基本稳定,而在RCS大鼠视网膜变性早期,随着上级神经元数量的减少,为了接受上级神经元的信息传递并与周围神经元形成突触联系,α亚型神经节细胞伸出更多的树突,与周围的神经元形成突触联系维持其功能,在视网膜变性的中晚期,即60、90 d,随着视网膜各级神经元的进行性减少,同时神经节细胞数量也大量减少,由于上级神元大量缺失使神经信息传入减少,视网膜内残留的α亚型神经节细胞树突运输功能减弱,树突分支出现大量丢失,分支数目显著减少。视网膜神经节细胞的树突是接受神经信号传入的主要部位,树突的形态发生对突触信号的输入、处理以及神经环路的形成起重要作用。Pavlidis等[9]对大鼠青光眼模型的研究发现,为适应慢性眼压升高的变化,神经节细胞的树突形态会发生改变,随着病变发展树突分支数目较正常大鼠显著减少。Meyer-Rüsenberg等[10]对高血压和糖尿病的动物模型的研究发现,在病变晚期神经节细胞树突分支频率与正常大鼠比较显著减少。以上报道与本实验中观察到得α亚型神经节细胞树突变化趋势一致,提示了在视网膜的慢性变性过程中,可能由于视网膜的神经信号通路发生了改变,使视网膜神经节细胞树突均发生了形态学的改变。

本研究提示,在RCS大鼠视网膜变性过程中,随着上级神经元的减少和结构功能改变,视网膜α亚型神经节细胞树突形态和数量均发生了显著改变,但是这种形态学上的改变是否由于信息传入受阻激活了某种信号通路,从而导致神经节细胞数量的减少、树突形态及分支频率减少,且α亚型神经节细胞树突的信息传递功能是否发生了改变还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, *et al*. Early remodeling in an inducible animal model of retinal degeneration[J]. Neuroscience, 2009, 160(2): 517-529.

[2] 张辰星, 阴正勤, 许红霞, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(8): 749-752.

[3] Fisher S K, Lewis G P, Linberg K A, *et al*. Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment[J]. Prog Retin Eye Res, 2005, 24(3): 395-431.

[4] 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.

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

[6] 尹小磊, 叶剑. DiI在人体神经解剖学中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2005, 12(4): 244-246.

[7] Behrend M R, Ahuja A K, Humayun M S, *et al*. Selective labeling of retinal ganglion cells with calcium indicators by retrograde loading in vitro[J]. J Neurosci Methods, 2009, 179(2): 166-172.

[8] Lee E S, Lee J Y, Jeon C J. Types and density of calretinin-containing retinal ganglion cells in mouse[J]. Neurosci Res, 2010, 66(2): 141-150.

[9] Pavlidis M, Stupp T, Naskar R, *et al*. Retinal ganglion cells resistant to advanced glaucoma: a postmortem study of human retinas with the carbocyanine dye DiI[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(12): 5196-5205.

[10] Meyer-Rusenberg B, Pavlidis M, Stupp T, *et al*. Pathological changes in human retinal ganglion cells associated with diabetic and hypertensive retinopathy[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007, 245(7): 1009-1018.

[11] Kolomiets B, Dubus E, Simonutti M, *et al*. Late histological and functional changes in the P23H rat retina after photoreceptor loss[J]. Neurobiol Dis, 2010, 38(1): 47-58.

[12] 蹇骞,徐海伟,谢汉平,等. RCS大鼠自然病程中视网膜边缘生发区细胞增殖及Shh/Ptc信号途径改变的观察[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 997-1001.

[13] Coombs J, van- der-List D, Wang G Y, *et al*. Morphological properties of mouse retinal ganglion cells[J]. Neuroscience, 2006, 140(1): 123-136.

[14] Milosevic N T, Ristanovic D, Jelinek H F, *et al*. Quantitative analysis of dendritic morphology of the alpha and delta retinal ganglion cells in the rat: a cell classification study[J]. J Theor Biol, 2009, 259(1): 142-150.

(**收稿**:2010-01-27;**修回**:2010-02-28)

(编辑 吴培红)