# 基因转染的虹膜色素上皮细胞移植后 RCS 鼠视网膜 BDNF 表达观察

张英瑜[1],高朋芬[1,2],杨丽霞[1,2] (1. 福建医科大学福州总医院临床医学院;2. 南京军区福州总医院眼科,福建 福州 350025)

[摘 要] **目的** 探讨脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)基因转染的虹膜色素上皮细胞(AAV-BDNF-IPE)移植入皇家外科学院(royal college of surgeons,RCS)大鼠视网膜下腔后,不同时期视网膜组织 BDNF 表达变化。**方法** 通过外路途径将 BDNF 基因转染的虹膜色素上皮细胞移植到 RCS 大鼠视网膜下腔,术后 3、5、7、9、11 周分别取 RCS 大鼠手术眼及对照组动物眼视网膜组织,用酶联免疫吸附法(Elisa)检测视网膜组织中 BDNF 的表达水平,比较分析这些数据。**结果** 对照组 RCS 大鼠出生后 3 周龄时视网膜组织中 BDNF 仍保持较高水平,其后迅速降低,其中 3 周龄组与其它周龄组比较,$P<0.01$;手术组 RCS 大鼠术时、术后 3、5、7、9、11 周各组间两两比较,BDNF 表达无显著差异($P>0.05$);出生后 6 周龄直到 14 周龄的不同时期,AAV-BDNF-IPE 移植手术组 RCS 大鼠视网膜 BDNF 表达水平均明显高于对照组(其中 6 周龄组 $P<0.05$,其它各周龄组 $P<0.01$)。**结论** BDNF 基因转染的虹膜色素上皮细胞在 RCS 大鼠视网膜下腔移植后,视网膜组织中 BDNF 可以持续稳定高水平表达,这为临床开发新的神经营养因子给药方式提供了实验依据。

[关键词] 脑源性神经营养因子;虹膜色素上皮细胞;视网膜色素变性;酶联免疫吸附法

[中图分类号] RR339.146;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)04-0370-03

## Retinal BDNF expressions in RCS rats after transplantation of gene transfected iris pigment epithelium

ZHANG Ying-yu, GAO Peng-fen, YANG Li-xia (Department of Ophthalmology, Clinical Medical College, Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University, Fujian Fuzhou 350025, China)

**Abstract: Objective** To investigate the retinal brain derived neurotrophic factor(BDNF) expressions in different phases of royal college of surgeons(RCS) rats after BDNF transfected iris pigment epithelium(AAV-BDNF-IPE) being transplanted into the subretinal space of RCS rat. **Methods** AAV-BDNF-IPEs were transplanted into the subretinal space of RCS rats. BDNF expressions in retinal tissue of intact RCS rats and surgery RCS rats were detected by enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) at 3,5,7,9and 11 weeks after surgery. **Results** BDNF expressions in retinal tissue of intact RCS rats were still high at postnatal 3w and were sharply decreased into low level later; retinal BDNF expression of intact RCS rats at postnatal 3w were much higher than those at other postnatal weeks, $P<0.01$. There was no difference in BDNF expressions of surgery RCS rats during surgery and at 3,5,7,9and 11 weeks after surgery, $P>0.05$. BDNF expression in retinal tissue of surgery RCS rats were significantly higher than those in intact rats at postnatal 6,8,10,12 and 14 weeks, ($P<0.05$ at postnatal 6w and $P<0.01$ at postnatal 8,10,12 and 14 weeks, respectively). **Conclusion** AAV-BDNF-IPE transplantation into the subretinal space of RCS rats can continuously improve the expression of BDNF in retinal tissue, which exerts a protective effect on the congenital retinal degeneration of RCS rats.

**Keywords**: brain derived neurotrophic factor; iris pigment epithelial cells; retinitis pigmentosa; enzyme linked immunosorbent assay

遗传性视网膜变性是一组以进行性光感受器细胞及色素上皮细胞功能丧失为共同表现的疾病。目前为止,这些疾病尚无有效治疗方法。全世界有数百万人因此永久致盲,危害性极大。临床上迫切需要有效措施以改善和维护 RPE 功能,防止感光细胞变性及凋亡,这是多年来全世界范围内一大热点和难点。目前发现脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)能促进培养的人和牛的 RPE 细胞分化,通过自分泌或通过胶质细胞调节视网膜变性中感光细胞的生存,使视网膜细胞存活[1-3]。本实验以遗传性视网膜色素细胞变性的皇家外科学院(royal college of surgeons,RCS)大鼠作为视网膜色素变性的动物模型,将 BDNF 基因转染的虹膜色素上皮细胞(AAV-BDNF-IPE)移植到 RCS 大鼠视网膜下腔,观察移植术后不同时期视网膜组织 BDNF 的表达水平和变化,以期为临床上视网膜色素变性性疾病治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

出生后 18~22 d 的 RCS 大鼠 48 只(上海公共卫生中心动物房提供),雌雄不拘,自由饮食,室温饲养。实验动物分 2 组,第 1 组为对照组(A 组)动物 24 只,分为出生后 3 周龄、6 周龄、

[基金项目] 福建省青年科技人才项目基金资助,项目编号 2006F3104

[作者简介] 张英瑜(1985-),男,医师,硕士,主要从事视网膜色素变性方面的研究。E-mail:pengfengao@yahoo.com.cn

[通讯作者] 杨丽霞,主任医师,教授,E-mail:ylx0915.fj@hotmail.com

[收稿日期] 2011-02-09 [修回日期] 2011-03-26

8 周龄、10 周龄、12 周龄、14 周龄，每周龄 4 只，取双眼眼球；第 2 组为手术移植组（B 组）共 24 只，分别于 A 组相应时间点即手术当天、术后 3、5、7、9、11 周取双眼球。主要试剂和仪器为 BDNF Elisa 试剂盒（北京博科生物公司），BIO-RAD Novapath TM 酶标仪，5 mL 玻璃匀浆器，Biofuge Primo R 离心机。

### 1.2 方法

1.2.1 AAV-BDNF-IPE 制备见文献[4]。

1.2.2 视网膜下腔移植 动物用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（60 mg/kg）成功后，利用微量注射器套以 30G 针头，将 2 μl AAV-BDNF-IPE（$4\times10^4$个）植入颞上方视网膜下腔。术后涂抗生素眼膏。术后用双目间接检眼镜观察眼底，摈弃大量玻璃体积血、大范围视网膜脱离的眼球。成功的视网膜下腔移植眼底镜下表现为注射部位局部视网膜丘样隆起。

1.2.3 对照组及手术组动物分别于相应时间点取双眼球 动物处死时间控制在下午 2:00 ~ 3:00，以颈椎脱臼术处死后 5 s内摘出眼球，生理盐水冲洗后，显微镜下取出视网膜组织，将视网膜放入 5 mL 玻璃匀浆器中，手工匀浆后 4 ℃离心，吸取上清液置于 -80 ℃冰箱保存，待检。采用酶联免疫吸附试验法（Elisa）测定 BDNF。按试剂盒说明书操作。

### 1.3 统计学方法

根据 Elisa 实验测得的 OD 值，利用 Elisa 数据处理软件做标准曲线的曲线估计，根据所得的拟和曲线方程计算出 BDNF 的浓度值，检测结果均以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理，用重复测量设计资料的方差分析及 $t$ 检验比较差别，检验水准取 $\alpha = 0.05$，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

根据 BDNF 标准浓度所获得的标准曲线，见图 1。

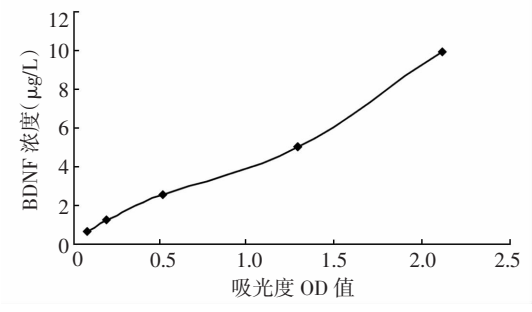



**图 1 BDNF 标准浓度所获得的标准曲线**

经直线回归分析得出直线回归方程：$y = 0.182\ 7 + 0.991\ 0x$，$y$ 为 BDNF 浓度值，$x$ 为吸光度 A 值。按此直线回归方程计算出视网膜中 BDNF 表达，见表 1。

A 组中，我们比较了出生后 3 周龄至 14 周龄未手术组 RCS 大鼠视网膜组织中 BDNF 表达变化，发现出生后 3 周龄 RCS 大鼠视网膜组织中 BDNF 仍保持较高水平，其后随发育迅速降低，出生后 6 周龄直到成年，一直保持稳定低水平表达，其中 3 周龄组与其它周龄组比较，$P<0.01$。

**表 1 组间不同时期大鼠视网膜 BDNF 表达比较（$\bar{x}\pm s$，μg/L）**

| 时间 | A 组 | B 组 | $t$ 值 | $P$ 值 |
|---|---|---|---|---|
| 术时（3 周龄） | 4.35 ± 0.04 | 5.11 ± 1.01 | 1.022 | 0.331 |
| 术后 3W（6 周龄） | 2.46 ± 0.02 | 4.46 ± 0.87 | 3.124 | 0.011 |
| 术后 5W（8 周龄） | 1.90 ± 0.01 | 4.98 ± 0.57 | 7.354 | < 0.01 |
| 术后 7W（10 周龄） | 2.09 ± 0.01 | 4.54 ± 0.57 | 5.822 | < 0.01 |
| 术后 9W（12 周龄） | 2.14 ± 0.03 | 5.09 ± 0.73 | 5.538 | < 0.01 |
| 术后 11W（14 周龄） | 1.36 ± 0.02 | 4.57 ± 0.65 | 6.748 | < 0.01 |

B 组中，术时、术后 3、5、7、9、11 周各组间两两比较，BDNF 表达无显著差异（$P>0.05$），提示 RCS 大鼠视网膜下腔移植 AAV-BDNF-IPE 术后，视网膜组织中 BDNF 可以持续稳定表达，直到动物成年。

AAV-BDNF-IPE 移植术后 3、5、7、9、11 周不同时期，移植手术组 RCS 大鼠视网膜 BDNF 表达水平均明显高于对照组（其中 6 周龄组 $P<0.05$，其它各周龄组 $P<0.01$）。另外，经广义线性模型分析，组别对 BDNF 的表达量有显著影响，$F=109.733$，$P<0.01$；术后时间对 BDNF 的表达量也有显著影响，$F=4.802$，$P<0.01$；组别与术后时间之间存在交互作用，$F=2.834$，$P<0.05$。

## 3 讨论

本研究发现，出生后 3 周龄 RCS 大鼠视网膜组织中 BDNF 仍保持较高水平，其后随发育迅速降低，出生后 6 周龄直到成年，一直保持稳定低水平表达，其中 3 周龄组与其它周龄组比较，$P<0.01$。Keegan 等[5]将出生后 5 ~ 7 d 的雪旺细胞（Schwann cells，此期为高分泌 BDNF 状态）植入 rho（-/-）变性小鼠视网膜下，发现实验组视网膜内视乳头周围放射状毛细血管网（Radial Peripapillary Capillaries，RPCs）有 6 ~ 7 层，约 800 μm，而对照组视网膜内仅有 1 ~ 2 层 RPCs，推测 rho（-/-）变性小鼠生后早期 BDNF 低表达可能是视网膜色素变性形成的关键因素，而补充 BDNF 可以延缓或改善视网膜色素变性。同样，我们的实验结果提示 RCS 鼠出生后 6 周龄直到成年视网膜组织中 BDNF 低表达可能是视网膜色素变性形成的关键因素。

在 AAV-BDNF-IPE 移植组中，术时、术后 3、5、7、9、11 周各组间两两比较，BDNF 表达无显著差异（$P>0.05$），表明 RCS 大鼠视网膜下腔移植 AAV-BDNF-IPE 术后，视网膜组织中 BDNF 可以持续稳定表达，直到动物成年。AAV-BDNF-IPE 移植术后 3、5、7、9、11 周不同时期，移植手术组 RCS 大鼠视网膜 BDNF 表达水平均明显高于对照组。本研究借助分子生物学、基因工程手段，将 BDNF 基因转染的 IPE 细胞移植于视网膜下腔并使 BDNF 在视网膜组织中持久高效表

达,这为临床开发新的神经营养因子给药方式提供了实验依据[6-7]。

神经营养因子对多种视网膜变性疾病的治疗作用得到了肯定,这为其临床应用提供了基本条件。但目前使用的神经营养因子的分子量都较大,经全身系统给药后无法穿透血视网膜屏障,在视网膜局部达不到有效浓度,若加大剂量副作用则显著增加。Axokine 在美国进行 I 期临床验证全身给药时有激活体内潜伏疱疹病毒的报道[8]。反复玻璃体腔注射虽然可以得到较好的治疗效果,但反复注射可能会引起视网膜脱离、眼内炎等并发症,在临床使用中存在较大风险和推广上的困难。因此,开发新的安全的给药方式,使神经营养因子在局部发挥持久有效的作用,对于神经营养因子治疗视网膜变性疾病从动物实验过渡到临床具有重要意义。

[参考文献]

[1] Lawrence JM, Keegan DJ, Muir EM, et al. Transplantation of Schwrence cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(1): 267 - 274.

[2] Harada T, Harada C, Kohsaka S, et al. Microglia-Mller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light - induced retinal degeneration[J]. J Neurosci, 2002, 22(21): 9228 - 9236.

[3] Bringmann A, Reichenbach A. Role of Muller cells in retinal degenerations[J]. Front Biosci, 2001, 6: E72 - E92.

[4] Hojo M, Abe T, Sugano E. Photoreceptor protection by iris pigment epithelial transplantation transduced with AAV-mediated brain-derived neurotrophic factor gene[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(10): 3721 - 3726.

[5] Keegan DJ, Kenna P, Humphries MM, et al. Transplantation of syngeneic Schwann cells to the rhodopsin knock out [rho(-/-)] mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(8): 3526 - 3532.

[6] Bok D, Yasumura D, Matthes MT, et al. Effects of adenoassociated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation[J]. Exp Eye Res, 2002, 74(6): 719 - 735.

[7] Sieving PA, Caruso RC, Tao W, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(10): 3896 - 3901.

[8] Hauswirth WW, Beaufrere L. Ocular gene therapy: quo vadis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(10): 2821 - 2826.

(编辑:左艳芳)

## · 个案与短篇 ·

# 浅析采血质量的影响因素及其控制措施

**廖素英,陈丽勤** (第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038)

[关键词] 血液质量;影响因素;控制
[中图分类号] R331.1;R472.9 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2011)04-0372-01

采血是检验分析前质量控制中的重要一环,血液质量直接影响到检验结果的准确性,随着各种仪器在检验工作中的应用,检测技术日益提升,检验结果越来越准确。但仅仅依靠实验精密仪器也是不够的,采血前正确地分析影响血液质量的因素并采取相应措施是保证检验结果准确性最根本的保证。这些要素主要包括采血前患者的准备及采集过程中的注意事项,现报告如下。

## 1 影响检测结果的患者因素

影响检测结果的患者因素主要包括:①采血前病人的状态。如生理性波动、激动、兴奋、恐惧,可使血红蛋白、白细胞增高,剧烈运动后可造成许多检验结果的变化,如谷丙谷氨酸、谷草谷氨酸、乳酸脱氢酶一时升高。避免误差,提高检验质量,患者应在平静休息的状态下采集血液样本。②抽血前1d或者3 d进食高蛋白会导致 BUN、UA 等结果偏高,但对 Cr 影响不大[1]。如含不饱和脂肪酸食物可减低胆固醇含量,含咖啡因饮料可使血浆游离脂肪酸增加,继而使肾上腺素和脑组织释放儿茶酚胺增多。③采血时间。生化血样原则上必须空腹采血,患者应在采血前 3 d 控制高脂饮食。如果让患者空腹时间超过 16 h 后,因过度饥饿反而会使血清 ALB、TRF、GLU 含量下降,血清胆红素因清除率减少而上升。本抽血室曾通过不同形式的健康教育知识展板,让广大患者了解选择采血时间的重要性。④药物对生化检验结果的影响。药物的毒副作用还使肝、肾功能损害而引结果异常。如维生素 C 有较强的还原性,易与反应中的 $H_2O_2$ 起作用,可使 GLU、TC、TG、HDL-C 的测定结果偏低。⑤当女性处于妊娠阶段时,由于血容量增加导致血液稀释,使微量元素水平明显降低。妊娠是特殊的生理过程,临床医疗人员查看孕妇的检测结果时应充分考虑妊娠的影响。

(下转第 375 页)

[收稿日期] 2011-05-02 [修回日期] 2011-05-28