



老龄大鼠视网膜：从功能到结构

发布时间：2018-06-25 09:21:11 分享到：

摘要：大鼠视网膜，年龄导致功能下降和特定神经元群体的丢失。研究了大鼠视网膜。独立于年龄（21天-22个月），视网膜电图和视网膜面积及其层数在白化病中较小。在功能上，老化导致两个品系的视锥和视杆介导反应的损失。解剖上，细胞密度随着年龄的增长而降低，因为视网膜随时间呈线性增长；在神经节细胞层中没有观察到细胞丢失；只有在色素沉着的大鼠中，发现锥体感光细胞减少。两品系的老年动物上丘有胶质细胞增生，视网膜神经节细胞支配的区域减少。总之，这项工作为进一步研究衰老与神经退行性视网膜疾病提供了基础。

关键词：黑素蛋白 光受体 光学相干断层扫描 小胶质细胞 顺向轴突运输

简介：衰老是一个多因素的过程，通过累积的改变来影响整个机体。人年老导致视力下降，对比敏感度低，暗适应受损。已经描述了A波和B波的视网膜电图振幅随正常老化而下降。这种功能下降可以通过眼睛的光学元件的结构变化，也可以由老年患者观察到的视网膜细胞的损失来解释。由于褪黑激素分泌的变化，在衰老过程中昼夜节律也发生了变化，但是否涉及控制昼夜节律的视网膜神经节细胞的亚群仍然未被探索。虽然最近已经描述了这些神经元在衰老过程中呈现形态变化。与年龄相关的细胞功能障碍和损失被归因于线粒体损伤、内源性多巴胺活性缺陷和/或恒定的副作用。衰老是几种人类眼科疾病的主要危险因素之一，如青光眼、老年性黄斑变性或糖尿病。由于年龄和这些疾病结合在一起，很难将给定的衰退归因于正常的衰老或一种特定的疾病。研究受控制环境下实验动物衰老的影响，将为衰老引起的功能和解剖损伤提供有价值的信息。在啮齿类动物中，年龄引起形态学改变和/或RGCs和感光细胞的丢失，包括第三种哺乳动物光感受器，表达黑色素蛋白的本质光敏RGCs。白化病是由部分或全部缺乏色素沉着引起的遗传性疾病。在发育过程中，视网膜色素上皮的黑色素相关蛋白调节视网膜成熟。在白化病动物中，中央视网膜发育不全，在棒状群体中有特定的缺陷。白化大鼠和小鼠的同侧视网膜神经节细胞（RGCs）数量减少，导致视网膜脱离投射的缺陷。在外视网膜中，圆锥感光体的分布有差异。在功能上，白化病会导致视力减退、视动眼球震颤、视觉辨别障碍和视网膜电图反应降低。白化病也更容易受到某些侮辱或病理，如光照、缺血或高血压。此外，在白化大鼠中，黑色素蛋白+RGCs比色素细胞更易追踪。尽管他们的视觉系统不发达，白化大鼠最常用于研究。老化是否影响相同的白化和色素性视网膜？为了回答这个问题，分析衰老对大鼠视网膜的功能和解剖效应，我们对21天到22月龄的白化鼠和非白化鼠进行了视网膜电图记录和体内和体外解剖分析视网膜及其主要视网膜病变区域。

材料和方法：体重、麻醉与安乐死：所有动物称重，计算麻醉剂量，并记录他们的身体发育。当进行视网膜电图、光学相干断层扫描或玻璃体注射顺行示踪剂时，用甲苯噻嗪（10毫克/千克体重）和氯胺酮（60毫克/千克）腹腔注射（i.p.）对动物进行麻醉。麻醉期间，眼部涂抹眼膏，防止角膜干燥。大剂量戊巴比妥钠过量麻醉处死大鼠。

光学相干断层扫描成像：术前，在光学显微镜下检查眼睛，以确认角膜、晶状体和眼底是否完整。2、6、15、22月龄动物（n=4只/大鼠/时间点和品系）视网膜在SD-OCT下进行成像。视网膜的厚度和神经纤维层的厚度用2个以视神经（ON）头为中心的扫描模式进行测量：圆形（或乳头状）半径为500μm的B型扫描，31等距水平半径为1500μm的光栅扫描。

视网膜电图：双眼视网膜电图（ERG）同时记录（4-6只动物/品系/时间点）。简言之，在暗适应后，动物在昏暗的红光下进行记录。麻醉后，瞳孔如前所述扩张，体温保持在37.5°C，放置于加热垫上。局部使用2%甲基纤维素用于预防脱水，最大限度地提高角膜和电极之间的电导率。参比电极位于口中，接地电极位于尾部，光刺激强度在6.23~0.58 log Cd*s/m²之间进行视杆和混合反应。明适应5分钟后，观察锥细胞反应特性，照明达到稳定的明视响应水平。0.58 log Cd*s/m²混合视杆和锥介导的反应（混合A和B波），2.03 log Cd*s/m²光闪烁的锥介导反应（明视B波）。

视网膜脱离：通过顺行追踪确定视网膜脱离。5μL的1%霍乱毒素β亚单位稀释在蒸馏水中被注入双眼3天后处死动物（n=3/品系/年龄）。安乐死后，动物用生理盐水灌流，然后用多聚甲醛4%（PFA）灌注。眼球摘除1h内固定，脑4度固定。

视网膜和脑横切面：在增加蔗糖的梯度之前，将大脑和扁平支架冷冻保存在最佳切割温度下。获得横跨视神经的背腹侧段（14μm），并对大脑进行冠状切片。在DAPI染色后对切片视网膜进行分析，以确定层厚度。

免疫组织荧光：对视网膜或脑切片进行免疫检测，为了分析视网膜RGCs和锥感光器。BRN3A和黑色素蛋白免疫识别以检测所有RGCs。用DAPI扫描视网膜，用抗褪色培养基将玻片固定在载玻片上并拍照。对这些视网膜进行拆分、洗涤，并进行S-和L/M-视蛋白免疫检测，将其安装在玻片侧面上，然后拍摄。在大脑冠状切片上，CTB标记的RGC终末和上丘上的小胶质细胞和大胶质细胞，对主要啮齿动物视网膜病变区进行免疫检测。

内外核层细胞总数的估计：在核层中，核是紧密堆积的，这就推断出每个年龄层中每个细胞的总数量。（1）视网膜表面；（2）每个视网膜层每层的平均行数；（3）每个核层的平均核半径（直径/2）。细胞数=视网膜核区（πr²）×核列平均数。计算视网膜面积、视网膜神经纤维层（RNFL）、丛状和核层，使用每一个给定年龄的平均厚度，并乘以相应视网膜的总面积。核层的厚度由它们的平均直径乘以它们的垂直直径计算。视网膜厚度和RNFL的厚度是SD-OCT体积扫描中获得。



结果：视网膜功能：首先，我们使用视网膜电图，视杆，视锥和混合反应的视网膜电图分析。视杆和锥介导的B波反应，是由双极和Müller细胞响应于感光体输入引起的。在A波中观察到视杆和视锥对ERG的直接贡献。混合反应来自刺激两种感光体的光强度。而视锥或杆介导的反应分别记录明视或暗刺激。在两种大鼠中，ERG振幅随年龄的增加而降低，并且在相同年龄，白化大鼠幅度比非白化大鼠减少。两个品系21日龄动物所有波振幅比2月龄动物小，所有波的潜伏期比2月龄长。在2月龄的动物中观察到最高的波幅。年龄导致视网膜功能的损失，杆和锥信号和对光的响应较慢，仅在白化病株中达到统计学意义。色素性动物在所有年龄段的体重明显低于白化大鼠。随着身体的生长，视网膜面积增大。尽管体重不同，但除21天和22个月外，品系间的视网膜区域间差异无统计学意义。观察体重增加时，除白化鼠15个月和22个月外，每个年龄段视网膜区域的生长都是显著的。

体内和体外视网膜厚度分析：使用SD-OCT的体内成像显示，视网膜和RNFL在中心向着周围变薄。在相同年龄的动物中，视网膜和RNFL在白化大鼠中明显变薄。在老化过程中，视网膜和RNFL在两个品系中都有明显的变薄。为了进一步研究这一细化，在体内分析的视网膜随后被交叉切片并用DAPI染色，以量化核层中的核行数，并测量两个丛状层的厚度。切片从背腹至腹象限获得包含整个视网膜背腹长度的横截面。与SD-OCT分析一致，在老化过程中出现视网膜变薄。在相同的应变条件下，对于两者，观察到随着年龄的增长，视网膜有统计学显著的逐渐变薄。核行和丛状层厚度的最大丢失发生在21天和2个月之间，这是视网膜区域生长最长的时期。

视网膜体积在老化过程中可能保持不变。因此，我们计算了视网膜及其层的体积。使用从视网膜和RNFL的体内SD-OCT图像测量的厚度计算体积，而其余层的厚度在多聚甲醛固定后进行体外测量，这可能导致组织收缩。在白化鼠视网膜及其所有层的体积都比非白化大鼠低。

外核和内核层中细胞总数的推断：年龄相关的核层变薄可能是细胞或密度损失的反映。在同一层内的品系或年龄之间的平均细胞核大小（面积或直径）没有差异。在ONL中，核小于内核层（INL）和几乎圆形，而在INL中，核稍微拉长，垂直直径明显小于水平直径。在22月龄白化大鼠，两个核层有细胞损失。老化不会导致移位或原位RGCS的丢失。

结论：视网膜随着年龄的增长而线性地影响细胞密度和视网膜厚度。对于功能研究，非白化大鼠似乎比白化大鼠更适合，因为他们对光的反应更好。本研究提供的基线能更好地了解与衰老相关的病理模型，如青光眼、老年性黄斑变性或糖尿病。

来源：Neurobiology of Aging Volume 61, January 2018, Pages 146-168

联系我们 | 人才招聘

© 版权所有 中国实验动物学会 京ICP备14047746号 京公网安备11010502026480

地址：北京市朝阳区潘家园南里5号（100021） 电话：010 - 67776816 传真：010 - 67781534 E-mail: calas@cast.org.cn

技术支持：山东瘦课网教育科技股份有限公司

| 站长统计

