

文章编号:1000-5404(2014)07-0645-05

论著

视神经损伤后 SDF-1 及其受体 CXCR4 在大鼠视网膜中的分布和表达规律

叶茂, 李依孺, 徐海伟, 何建荣, 彭艳丽, 吴楠, 王一 (400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军眼科中心, 视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室)

[摘要] **目的** 观察 Long Evans 大鼠视神经损伤后不同时间基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 及其受体 CXCR4 在视网膜中的分布及表达变化。**方法** 将 21 只成年 Long Evans 大鼠分为正常组和视神经损伤后 1、3、5、7、15 d 及 30 d 组, 每组 3 只, 采用免疫荧光染色和免疫印迹法 (Western blot) 检测各组大鼠视网膜 SDF-1、CXCR4 的分布及表达变化。**结果** 免疫荧光染色发现视神经钳夹伤大鼠 SDF-1 主要定位表达于视网膜内、外界膜之间的星形胶质细胞及 Müller 细胞, 并与 GFAP 共表达, SDF-1 阳性细胞数量随视神经损伤时间延长先增多后减少, 伤后 5 d 达高峰。CXCR4 主要表达于视网膜神经节细胞层、外核层及内核层; Western blot 证实视网膜 SDF-1 的水平随视神经损伤出现先升高后降低的趋势, 与正常组相比, 视神经损伤组第 1、3、5、7 天水平显著升高 ($P < 0.05$)。而 CXCR4 的表达在视神经损伤后各时间点无明显改变 ($P > 0.05$)。**结论** 视神经损伤后, 视网膜星形胶质细胞及 Müller 细胞中的 SDF-1 表达先增强后减弱, 且与视神经损伤后胶质活化相关。

[关键词] SDF-1; CXCR4; 视网膜; 星形胶质细胞; Müller 细胞; 视神经损伤

[中图分类号] R339.146; R341; R774.6 **[文献标志码]** A

Distribution and expression profile of SDF-1 and its receptor CXCR4 in rat retinas after optic nerve injury

Ye Mao, Li Yiru, Xu Haiwei, He Jianrong, Peng Yanli, Wu Nan, Wang Yi (Center of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Visual Damage and Regeneration & Restoration, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To observe the distributions and expression profiles of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 in the retinas during repair period after partial optic nerve injury in Long Evans rats. **Methods** A total of 21 adult rats were randomly and equally divided into 7 groups, normal group, the injury group, and the groups in 1, 3, 5, 7, 15 and 30 d after optic nerve crushing. Immunofluorescence assay and Western blotting was applied to detect the location and the quantity of SDF-1 and CXCR4 expression in the retina. **Results** Immunofluorescence staining revealed that the expression of SDF-1 was co-localized in the activated GFAP-positive astrocytes and Müller cells between the pre-retinal and post-retinal membrane. The amount of SDF-1 positive cells were in a trend of increasing to decreasing with the injury time prolonging, and reached a summit in 5 d after injury. CXCR4 staining was mainly present in the ganglion cell layer, inner nuclear layer and outer nuclear layer of the retina. Western blotting revealed that the expression of SDF-1 protein was increased at the first day and then decreased at the 7th day after injury. The expression of SDF-1 in 1, 3, 5 and 7 d after optic nerve injuring was increased significantly than normal group ($P < 0.05$). While, the expression of CXCR4 protein had no change after injury ($P > 0.05$). **Conclusion** The quantity of SDF-1 is increased first and then decreased in the astrocytes and Müller cells after optic nerve injuring, which is related to the activation of glial cells after injury.

[Key words] stromal cell-derived factor-1; CXCR4; retina; astrocytes; Müller cells; optic nerve injury

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901645, 81270996). Corresponding author: Wang Yi, Tel: 86-23-68754401, E-mail: wangyie@yahoo.com.cn; Wu Nan, Tel: 86-23-68754401, E-mail: zxhwnzzl@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30901645, 81270996)

[通信作者] 王一, 电话: (023)68754401, E-mail: wangyie@yahoo.com.cn; 吴楠, 电话: (023)68754401, E-mail: zxhwnzzl@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1435.018.html>(2014-01-02)

视神经损伤后视网膜神经节细胞(retinal ganglial cells, RGCs)死亡,视功能性单位减少构成的不可逆视觉受损,是致盲的重要因素之一,目前仍无有效的治疗方法。基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)属于 α 趋化因子家族, CXCR4是其唯一的特异性受体,广泛表达于各种组织和器官, SDF-1通过与CXCR4结合从而发挥生物学作用。近年来更证实SDF-1/CXCR4参与了心肌、神经、肝脏、肾脏的损伤修复^[1-4]。Li等^[5]发现,受损的视网膜SDF-1表达上调。既往研究发现视神经损伤后影响其再生修复的机制主要包括:①RGCs的凋亡;②视神经损伤后的微环境抑制RGCs的再生;③视神经损伤后胶质瘢痕抑制再生^[6]。而微环境及瘢痕的抑制均与神经损伤后胶质细胞的活化密切相关。视神经损伤后SDF-1的分泌是否与胶质细胞活化有关,与哪种胶质细胞相关,并且SDF-1在视神经修复中是否发挥作用,怎样发挥作用?目前尚不清楚。

本研究建立了Long Evans大鼠视神经部分损伤模型,采用免疫荧光染色和Western blot对视神经钳夹伤后视网膜中SDF-1及CXCR4进行定位和定量检测,以了解视神经损伤后SDF-1及其受体CXCR4在视网膜中的分布及表达规律,为研究其在视神经损伤后再生修复中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

2月龄Long Evans大鼠,雄性,体质量150~200g(美国Taeotie公司引进,第三军医大学野战外科研究所实验动物中心培育),喂养环境为光照时间8:00-20:00,室温控制在18~22℃,给予足够的食物和水。分别分为正常组,视神经损伤后1、3、5、7、15、30d组,每组3只。

1.2 试剂及仪器

中号无创血管夹(上海金钟),眼科手术显微镜(NSKLTLD),荧光显微镜(日本奥林巴斯),激光共聚焦显微镜,Western blot试剂盒(碧云天),兔抗SDF-1(Santa Cruz),兔抗CXCR4(武汉博士德),羊抗GFAP抗体(Santa Cruz)。

1.3 视神经损伤模型的建立

参照李灿等^[7]方法制备Long Evans大鼠视神经不完全损伤(夹挫伤)动物模型。10%水合氯醛腹腔注射(0.5 mL/100 g)麻醉大鼠并侧卧位固定于手术台上,术眼局部清洁消毒,剪开术眼上穹隆结膜约120°,避开涡静脉,钝性分离,暴露视神经,在球后2 mm处,避开血管,用中号无创血管夹夹持视神经10 s,术眼瞳孔散大,眼底无缺血,缝合球结膜,抗生素眼膏涂布。

1.4 视网膜组织标本的收集

1.4.1 免疫荧光染色视网膜标本的收集 正常组及视神经夹伤后1、3、5、7、15、30d组分别取3只大鼠右眼,腹腔注射麻醉,4%多聚甲醛心脏灌注固定后,取出右眼球,剪去角膜、晶状体和玻璃体后4%多聚甲醛中固定2 h,蔗糖溶液梯度脱水,包埋,-20℃冰箱冷冻,标本按10 μm的厚度进行冰冻切片,防脱载玻片贴片后置-80℃冰箱中保存。

1.4.2 Western blot标本的收集 正常组及视神经夹伤后1、3、5、7、15、30d组分别取3只大鼠左眼。动物麻醉后,快速取下左眼眼球,在显微镜下,取出整个视网膜。取下的视网膜迅速放入编号的离心管中,封口并置于-80℃冰箱中保存,整个操作过程均在冰上进行。

1.5 免疫荧光染色及激光共聚焦定位

选取过视神经平面的切片分别行SDF-1、GFAP共表达和CXCR4免疫荧光染色,PBS漂洗,0.1% Triton X-100通透10 min,封闭后分别与含有山羊抗GFAP(1:200),兔抗SDF-1(1:100),兔抗CXCR4(1:100)的一抗工作液孵育,4℃过夜;PBS漂洗后与驴抗山羊Cy3(1:800,碧云天),驴抗兔FITC(1:100,碧云天),山羊抗兔FITC(1:100,碧云天),常温孵育2 h;PBS漂洗后与DAPI常温孵育5 min;PBS漂洗后,抗荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦对SDF-1、GFAP、CXCR4表达定位检查。采用ImageJ软件对SDF-1和GFAP荧光强度相对灰度值进行半定量测量。

1.6 SDF-1及受体CXCR4蛋白表达水平的测定

采用Western blot法测定视神经部分损伤后大鼠视网膜组织SDF-1、GFAP及CXCR4蛋白表达水平,取收集视网膜组织提取细胞总蛋白,定量,将蛋白变性后进行电泳分离,转膜,封闭后与相应的一抗4℃过夜孵育(兔抗SDF-1,1:200,羊抗GFAP,1:500,兔抗CXCR4,1:200,GAPDH,1:500),孵育结束后以PBST充分洗涤,之后与相应的二抗室温孵育2 h,显影,洗片。实验条带采用Quantity One图像软件分析光密度值,以检测蛋白条带与同一泳道GAPDH条带光密度比值作为结果。

1.7 统计学处理

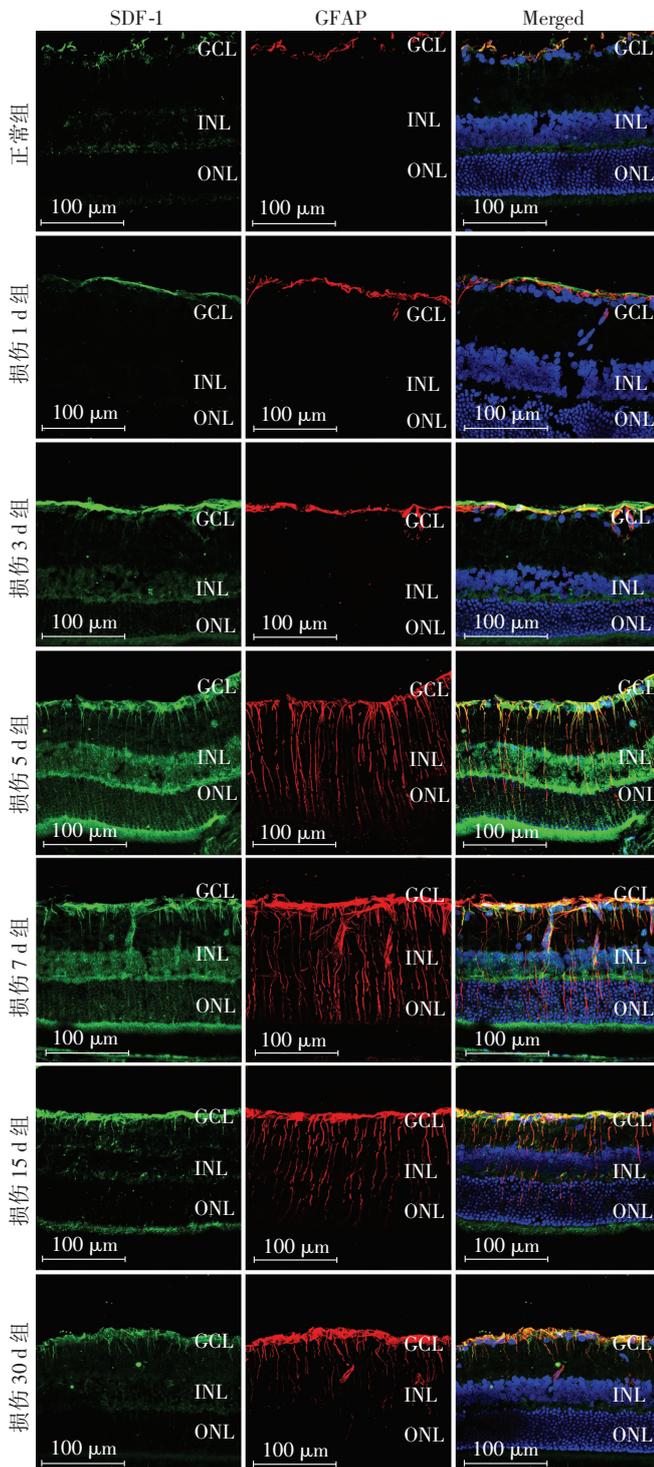
采用SPSS 16.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组总体均数比较采用单因素方差分析,并进行相关性分析。

2 结果

2.1 SDF-1及CXCR4在视神经部分损伤后大鼠视网膜中的定位表达

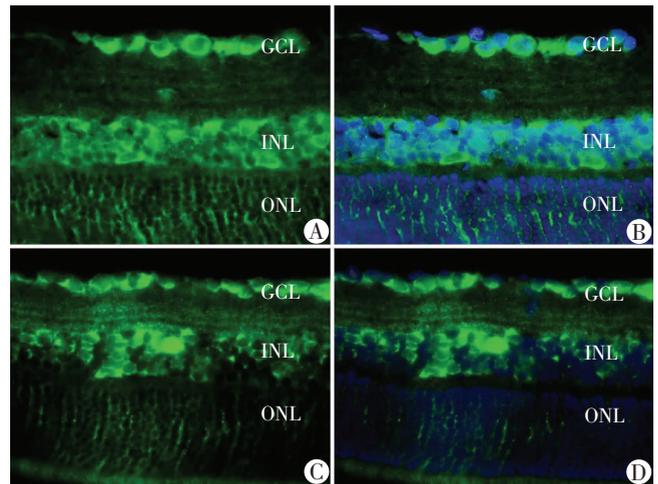
正常视网膜在神经纤维层及外丛层可见少量GFAP的表达,视神经损伤后神经纤维层及外丛层GFAP的表达量随着损伤时间的延长逐渐增多增强,在内核层、内丛层及外核层也可见线条状表达。SDF-1在正常视网膜少量表达位于神经纤维层及外丛层,视神经损伤后1、3、5、7、15、30d神经纤维层及外丛层SDF-1表达增多增强,损伤后第5、7天在内核层及外核层可见SDF-1少量线条状阳性表达,并且在损伤后第3、5、7、15天可见在视网膜内核层、外界膜表达。GFAP/SDF-1双标细胞在

正常视网膜主要定位于神经纤维层及外丛层,视神经损伤后早期 GFAP/SDF-1 双标细胞数量显著增多,随损伤时间出现先升高后降低的趋势,在损伤后 5、7 d 表达最多,在内核层、外核层也可见少量 GFAP/SDF-1 线条状阳性表达。正常视网膜 CXCR4 定位表达于神经节细胞层、外核层及内核层,且主要分布于细胞膜及胞浆内,损伤后其表达部位及表达量未见明显变化。见图 1、2。



GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层

图1 Long Evans 大鼠视神经钳夹伤后 SDF-1 在视网膜中的定位表达

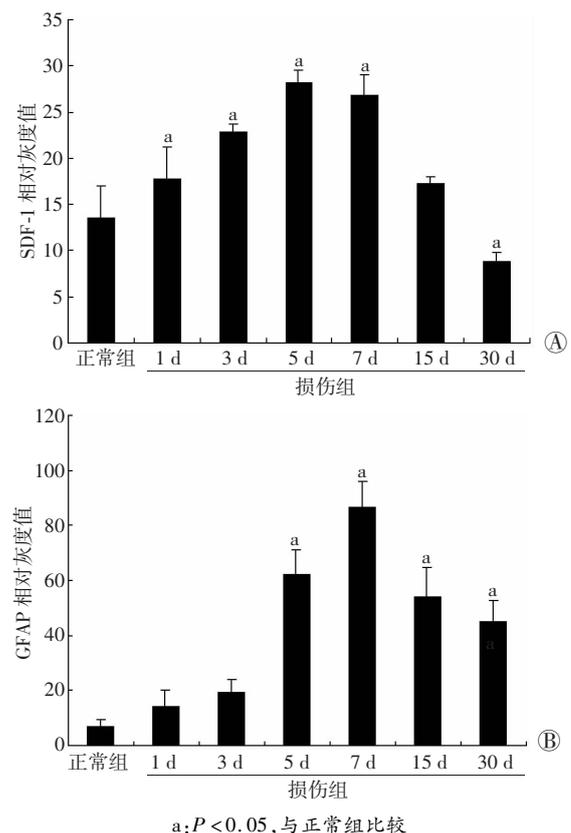


A、B:正常组;C、D:视神经损伤后 5 d 组;A、C: CXCR4; B、D: CXCR4 + DAPI; GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层

图2 Long Evans 大鼠视神经钳夹伤后 CXCR4 在视网膜中的定位表达

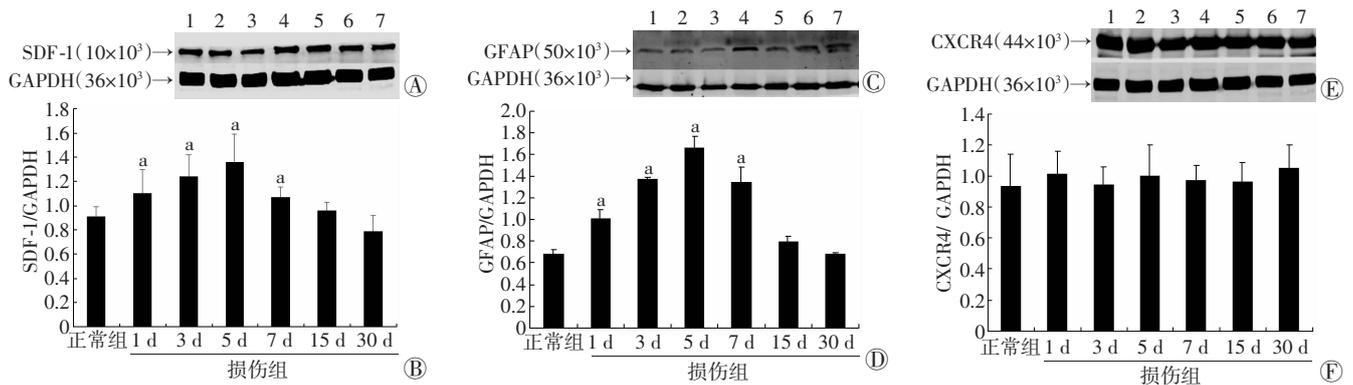
2.2 SDF-1 及 CXCR4 在视神经部分损伤后大鼠视网膜中的表达变化

通过 ImageJ 软件对 SDF-1 及 GFAP 荧光强度半定量测量发现;SDF-1 及 GFAP 免疫荧光相对灰度值随着视神经损伤时间均出现先升高后降低,且在损伤后第 5、7 天表达最高(图 3)。通过相关性分析发现,SDF-1 及 GFAP 相对灰度值相关系数为 0.482,显著性(双侧)为 $0.027 < 0.05$,所以视神经损伤后 SDF-1 与 GFAP 表达变化具备显著相关性。



a: $P < 0.05$, 与正常组比较

图3 Long Evans 大鼠视神经钳夹伤后视网膜中 SDF-1 (A) 和 GFAP (B) 免疫荧光染色相对灰度值



A、C、E: Western blot 检测 SDF-1、GFAP、CXCR4 的表达; 1: 正常组; 2~7: 分别为损伤组 1、3、5、7、15、30 d; B、D、F: SDF-1、GFAP、CXCR4 的灰度值分析; a: $P < 0.05$, 与正常组比较

图 4 Long Evans 大鼠视神经钳夹伤后 SDF-1、GFAP 及 CXCR4 在视网膜中的定量检测

采用 Western blot 测定视神经部分损伤后大鼠视网膜组织 SDF-1 及 CXCR4 蛋白表达水平, 结果显示, 在损伤后 1 d 视网膜中 SDF-1 及 GFAP 的水平较正常组显著升高, 随着损伤时间延长, 视网膜中 SDF-1 及 GFAP 水平逐渐升高, 在第 5、7 天时 SDF-1 水平达到峰值, 然后逐渐下降(图 4), 变化趋势同免疫荧光观察一致。通过相关性分析发现, SDF-1 及 GFAP 表达量变化的相关系数为 0.750, 显著性(双侧)为 $0.000 < 0.01$, 所以视神经损伤后 SDF-1 与 GFAP 表达量变化具备显著相关性。并且通过统计分析发现, 与正常组相比, 视神经损伤后视网膜中 SDF-1 水平在第 1、3、5、7 天存在统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。视神经损伤后 CXCR4 的水平无明显改变, 各组表达量均无统计学差异。

3 讨论

视神经损伤后视网膜 RGCs 会出现凋亡, 其轴突出现再生障碍, 这是导致视神经损伤后视功能丧失的主要原因。本研究采用中号动脉夹, 经测试, 在大鼠球后 2 mm 处视神经夹持 10 s, 瞳孔散大, 成功建立视神经损伤的实验动物模型, 并且损伤稳定, 操作简便。

SDF-1/CXCR4 轴在机体的免疫、炎症、胚胎发育、器官发生、肿瘤、HIV 病、WHIM 综合征等多种生物学过程中发挥着重要的作用。目前研究认为, 基质细胞因子-1(SDF-1)及其受体 CXCR4 在多种组织损伤修复中存在重要作用^[8-10]。心肌细胞急性损伤后 SDF-1 升高诱导内源性组织特异性干细胞向损伤部位迁移, 并对其对组织细胞存在直接的保护作用^[11]。随着组织损伤修复研究的不断进展, SDF-1 及 CXCR4 在视神经损伤修复中的作用不断被揭示。SDF-1 对 RGCs 存活具有促进作用, 此作用与 SDF-1 浓度密切相关^[12]。在视网膜脱离患者, SDF-1 对感光细胞的存活存在重要作用^[13]。但目前关于视神经损伤情况下 SDF-1 及其受体 CXCR4 的表达变化, 以及其在视神经损伤修复中的作用研究较少, 对其定位及表达量的变化情况了解有限。

我们通过免疫荧光及 Western blot 对视神经损伤后 SDF-1 及其受体 CXCR4 在大鼠视网膜中的分布和

表达规律进行研究。既往袁源智等^[14]发现正常成年大鼠视网膜神经上皮层存在 SDF-1 的生理性表达, 且多位于视网膜内层, 视神经无明显染色。我们通过免疫荧光染色发现: 视神经损伤后, SDF-1 与 GFAP 存在共表达, 且 SDF-1 定位表达于星形胶质细胞和 Müller 细胞。通过 ImageJ 对 SDF-1 及 GFAP 荧光强度半定量测量及 Western blot 检测发现: SDF-1 及 GFAP 表达量随着视神经损伤时间出现先升高后降低, 并且通过相关性分析发现视神经损伤后 SDF-1 与 GFAP 表达量变化具备显著相关性。提示我们: 视神经损伤后, SDF-1 表达量的变化与星形胶质细胞及 Müller 细胞活化有关。既往研究表明, 胶质细胞活化在神经修复中具有“双刃剑”的作用: 它们有利于对抗损伤, 促进神经元的修复, 但是却阻碍组织修复和神经再生^[15]。而 SDF-1 是如何通过参与胶质活化参与视神经损伤修复, 其作用机制尚不清楚。本研究发现 CXCR4 表达位于视网膜神经节细胞层、内核层及外核层, 损伤前后表达量无明显改变, 而 Otsuka 等^[13]发现正常视网膜 CXCR4 主要分布于视网膜神经节细胞层、内核层及外核层表达, 网膜脱离患者视网膜外核层 CXCR4 表达增高, 并且表达在视网膜下腔浸润的巨噬细胞。我们分析认为, 这可能与 Otsuka 研究模型为视网膜脱离模型, 只对网膜脱离后 3 d 与正常对照进行比较, 并且 Otsuka 只是从免疫荧光染色判断有关, 并没行定量检测。

因此, SDF-1 在视神经损伤后视网膜中表达先升高后降低, 参与了视神经损伤的修复, 这种修复作用可能与胶质细胞活化相关。但 SDF-1 在视神经损伤后的胶质活化中的作用机制仍不清楚, 我们将进一步对 SDF-1 在视神经损伤后组织修复中的作用进行研究。

参考文献:

- [1] Mavier P, Martin N, Couchie D, et al. Expression of stromal cell-derived factor-1 and of its receptor CXCR4 in liver regeneration from oval cells in rat[J]. Am J Pathol, 2004, 165(6): 1969-1977.

- [2] Hill W D, Hess D C, Martin-Studdard A, *et al.* SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(1): 84-96.
- [3] Tang Y L, Qian K, Zhang Y C, *et al.* Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha) treatment[J]. *Regul Pept*, 2005, 125(1/3): 1-8.
- [4] Hoffmann U, Banas B, Kruger B, *et al.* SDF-1 expression is elevated in chronic human renal allograft rejection[J]. *Clin Transplant*, 2006, 20(6): 712-718.
- [5] Li Y, Reza R G, Atmaca-Sonmez P, *et al.* Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(4): 1646-1652.
- [6] Fischer D, Leibinger M. Promoting optic nerve regeneration[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(6): 688-701.
- [7] 李灿, 王一. 睫状神经营养因子对大鼠视神经不全损伤后轴浆运输的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(5): 408-411.
- [8] Askari A T, Unzek S, Popovic Z B, *et al.* Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy[J]. *Lancet*, 2003, 362(9385): 697-703.
- [9] Rosenkranz K, Kumbruch S, Lebermann K, *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to the 'homing' of umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain[J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(6): 1223-1233.
- [10] Stokman G, Stroo I, Claessen N, *et al.* SDF-1 provides morphological and functional protection against renal ischaemia/reperfusion injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(12): 3852-3859.
- [11] Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, *et al.* SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction[J]. *FASEB J*, 2007, 21(12): 3197-3207.
- [12] 岑令平, 梁嘉健, 张铭志. 基质细胞衍生因子-1在视网膜培养中促进节细胞存活的研究[J]. *汕头大学医学院学报*, 2012, 25(2): 86-88.
- [13] Otsuka H, Arimura N, Sonoda S, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 is essential for photoreceptor cell protection in retinal detachment[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(5): 2268-2277.
- [14] 袁源智, 袁非, 黎蕾, 等. 基质细胞衍生因子-1在Wistar大鼠视网膜上的生理性表达[J]. *眼科研究*, 2007, 25(7): 518-521.
- [15] Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, *et al.* Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism[J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(3/4): 143-160.
- (收稿:2013-09-29;修回:2013-11-12)
(编辑 张 维)

(上接 644 页)

物,顺利取出异物,切口用可吸收线予以连续缝合,关闭喉腔,全身给予抗感染、止血等治疗。术后1周拔管,复查电子喉镜示双侧声带活动度好,声门闭合好,无声嘶,无呼吸困难。



图2 C形臂X线术中准确定位异物的位置

2 讨论

喉腔异物、颈部异物相对常见且有较为规范的手术取出方法,而喉深部组织(黏膜下甚至是肌肉内)的异物在和平时期相对少见,如何做到成功取出异物又尽可能少地损伤正常组织值得探索,并可以此为战时积累经验。颈部结构复杂、血运丰富、功能重要,对于颈部外伤患者,要求医务人员严格遵守“救命第一,救治结合”的颈部外伤治疗原则及治疗流程。枪弹伤、爆炸伤后导致的异物残留如果时间过久,可直接损伤重要血管神经或者致局部炎症扩散引起严重并发症,原则上均应该取出^[1]。

颈部解剖复杂且腔隙较多,对于较小的异物成功取出的风险较大,术前准确的定位、合理的手术方案,以及对相关部位解剖的熟悉是成功的关键。术中大多使用探针、电磁铁、B超、X线片、CT、C形臂X线机等进行实时定位。喉腔异物大多可以通过喉镜、电子喉镜予以取出,即使是较为复杂的喉部异物也

可以通过直达喉镜予以取出^[2-3]。在该病例中,异物从颈部进入,在组织内穿行,到达喉腔但又没有进入喉腔,非常特殊。如果沿弹道探取异物,路径太长,既盲目又损伤周围组织太多,不可取。在喉腔见不到弹孔和弹道,无法在喉镜下取出,但我们进行了尝试。通过术前检查所得到的资料,分析异物存留的部位应该在杓状软骨前方,没有穿透环状软骨板后方,存留在几乎是中线的位置,在杓状软骨靠喉腔一侧,究竟使用颈侧切开还是喉裂开,我们进行了讨论,各有利弊,最后我们选择喉裂开是基于手术路径的熟练程度和方便异物取出而决定的,我们认为咽侧切开不如行喉裂开暴露好。术后恢复效果非常好,声音几乎没有受到影响。

喉腔结构精细,涉及发声、呼吸等重要生理功能,要求术中准确操作,尽可能减轻副损伤,因此我们选择探针结合C形臂X线机的方法来定位。C型臂X线机适时定位在手术中的应用能节约手术时间,减少痛苦,避免因盲目操作导致术后并发症,在颈部金属异物的取出中是十分有意义的,但定位中检查者及患者均受辐射。该病例中的异物较大,距离黏膜表面较浅,因此采用多根探针配合C形臂X线机照片的方法来减少暴露,取得了非常好的效果。对于此类异物,提倡使用这种异物取出的方法。

参考文献:

- [1] Shrestha I, Shrestha B L, Amatya R C. Analysis of ear, nose and throat foreign bodies in dhulikhel hospital[J]. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)*, 2012, 10(38): 4-8.
- [2] Tong B, Zhang L, Fang R, *et al.* 3D images based on MDCT in evaluation of patients with suspected foreign body aspiration[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013, 270(3): 1001-1007.
- [3] Pinto A, Muzj C, Gagliardi N, *et al.* Role of imaging in the assessment of impacted foreign bodies in the hypopharynx and cervical esophagus [J]. *Semin Ultrasound CT MR*, 2012, 33(5): 463-470.

(收稿:2013-10-22;修回:2013-12-04)

(编辑 张 维)