

# 兔视网膜光凝术后 GFAP 和 CTGF 蛋白的表达

覃冬菊<sup>1</sup>, 游庆华<sup>2</sup>, 唐罗生<sup>3</sup>

作者单位:(201300)中国上海市浦东新区南汇中心医院 复旦大学附属华山医院南汇分院<sup>1</sup>眼科;<sup>2</sup>病理科;<sup>3</sup>(410000)中国湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院眼科  
作者简介:覃冬菊,女,博士,副主任医师,研究方向:眼底病。  
通讯作者:覃冬菊. qdj69@yahoo.com.cn  
收稿日期:2012-02-02 修回日期:2012-02-13

## Expression of glial fibrillary acidic protein and connective tissue growth factor in pigmented rabbits' retina after photocoagulation

Dong-Ju Qin<sup>1</sup>, Qing-Hua You<sup>2</sup>, Luo-Sheng Tang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology;<sup>2</sup>Department of Pathology, Nanhui Branch, Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 201300, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410000, Hunan Province, China  
**Correspondence to:** Dong-Ju Qin. Department of Ophthalmology, Nanhui Branch, Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 201300, China. qdj69@yahoo.com.cn  
Received:2012-02-02 Accepted:2012-02-13

### Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and connective tissue growth factor (CTGF) in pigmented rabbits' retinal laser scar after photocoagulation.  
• **METHODS:** The model of retinal photocoagulation in pigmented rabbit was established in right eyes by frequency doubled 532nm laser with laser lesion effect of Tso grade c photocoagulated spots at a wavelength of 532nm, for a duration of 0.05 seconds, at a power of 450mw, making a 75 $\mu$ m diameter spot. The left eyes were control group eyes. Twenty-four pigmented rabbits were randomly divided into six groups at the postoperative days 1, 3, 7, 14, 21, 28 after photocoagulation. The eyes were enucleated at the schedule time, fixed and cut into sections. Immunohistochemical examination was used to detect the expression of CTGF and GFAP. Pearson linear regression analysis was performed to determine possible relationship between GFAP and CTGF.  
• **RESULTS:** The Müller cells expressed GFAP at 3 days after photocoagulation and lasted for at least 28 days. There was weak expression in end feet of Müller cells in retina of normal control group. The expression of CTGF was detected in retinal lesion at 3 days after photocoagulation and increased with time. But the expression of CTGF in normal control group was not

detected. The expression of GFAP protein had markedly positive relationship with CTGF ( $r=0.786, P<0.01$ ).

• **CONCLUSION:** GFAP and CTGF may take part in regulating recovery of retinal laser scar after photocoagulation in pigmented rabbits.

• **KEYWORDS:** connective tissue growth factor; glial fibrillary acidic protein; photocoagulation; animal models; retina

Qin DJ, You QH, Tang LS. Expression of glial fibrillary acidic protein and connective tissue growth factor in pigmented rabbits' retina after photocoagulation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(4):622-625

### 摘要

**目的:**探讨色素家兔视网膜光凝术后 Müller 细胞胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 在激光斑的表达。

**方法:**采用倍频 532nm 绿激光光凝色素家兔视网膜后极部 30 点 (光斑效应为 Tso 分级 III 级), 建立色素家兔视网膜光凝 III 级光斑效应动物模型。24 只有色家兔右眼为视网膜光凝眼、左眼为正常对照眼。按术后观察时间 1, 3, 7, 14, 21, 28d 分为 6 个亚组, 各组动物于光凝术后相应的时间点处死, 取出眼球进行免疫组织化学方法测定 GFAP 和 CTGF 的表达, Pearson 直线相关分析两者之间有无相关性。  
**结果:**GFAP 蛋白在色素家兔正常对照眼神经节细胞层弱表达, 光凝后 3d, 激光斑 Müller 细胞表达 GFAP, 表达持续增强到光凝术后 28d。光凝后 3d, CTGF 在光斑处弱表达, 持续增强至术后 28d, CTGF 阳性表达在视网膜光凝斑的视网膜神经节细胞层 (GCL)、成纤维细胞、视网膜色素上皮层 (RPE) 细胞和无定形的胶原基质。CTGF 蛋白在正常对照眼无表达。Pearson 直线相关分析: 视网膜光凝斑 GFAP 与 CTGF 表达强度在时序上呈密切正相关 ( $r=0.786, P<0.01$ )。

**结论:** CTGF 与 GFAP 参与了视网膜光凝术后激光斑损伤修复的调控过程。可能是视网膜神经胶质瘢痕形成的一个重要的病理学基础。

**关键词:** 结缔组织生长因子; 胶质纤维酸性蛋白; 光凝固术; 动物实验; 视网膜

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.04.07

覃冬菊, 游庆华, 唐罗生. 兔视网膜光凝术后 GFAP 和 CTGF 蛋白的表达. 国际眼科杂志 2012;12(4):622-625

### 0 引言

视网膜光凝术是治疗眼底视网膜新生血管疾病的有效手段, 但黄斑变性患者脉络膜新生血管 (CNV) 治疗后

表1 各组不同时间点 CTGF 和 GFAP 蛋白的阳性表达变化

指标	正常组	模型组					
		1d	3d	7d	14d	21d	28d
GFAP	0.054 ± 0.003	0.063 ± 0.029	1.061 ± 0.123	1.876 ± 0.319	2.112 ± 0.242	2.651 ± 0.357	2.992 ± 0.412
CTGF	0.035 ± 0.008	0.046 ± 0.004	1.323 ± 0.012	2.092 ± 0.432	2.691 ± 0.461	3.127 ± 0.497	3.764 ± 0.543

形成的视网膜神经胶质瘢痕的扩大和视网膜下纤维增生膜是患者光凝术后出现视力下降、视野缺损的主要原因之一<sup>[1-3]</sup>。研究已证实神经胶质瘢痕和纤维增生膜主要由肥大增生的 Müller 细胞的突起、增生的色素上皮细胞和胶原纤维构成,是多种细胞生长因子作用的结果<sup>[2,4]</sup>。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是 Müller 细胞骨架蛋白,在损伤后才表达,并与 Müller 细胞的肥大、增生和迁移有关<sup>[5]</sup>。而结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 是新近报道的一种间充质细胞的生长因子,促进细胞的增生分化和胶原合成,在伤口愈合中起主要作用<sup>[6]</sup>,提示可能是各种纤维化病变的最终共同通路。视网膜光凝术后激光斑的形成也是损伤修复过程,但 CTGF 是否与 GFAP 一起参与视网膜神经胶质瘢痕的形成尚无定论。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年有色家兔 24 只,雌雄不限,体质量 1.5 ~ 2.5kg,由中南大学湘雅二医院实验动物中心提供,使用条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。实验前经裂隙灯、眼底镜检查双眼无异常。兔抗人 GFAP (1:100) 多克隆抗体和兔抗人 CTGF (1:100) 多克隆抗体:购自武汉博士德生物工程有限公司;SP 二步法免疫组织化学试剂盒 (PV9000):购自北京中山生物技术有限公司;DAB 显色剂等均购自北京中山生物技术有限公司;倍频 532nm 绿激光机:法国 Quantel Medical SA 公司 (Viridis Twin 型);多功能真彩色病理图像分析系统:北京航空航天大学设计 (CMIAS 2000 型)。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 24 只有色家兔右眼为实验眼,左眼为正常对照眼。依术后观察时间点 1,3,7,14,21,28d 分为 6 个亚组,每组 4 眼,正常对照眼 24 眼。

**1.2.2 动物模型建立** 复方托品酰胺眼液和 100g/L 新福林散瞳,肌注盐酸氯胺酮 (50mg/kg) 和地西洋 (2.5mg/kg) 麻醉后,5g/L 丁卡因角膜表面麻醉放置三面镜,用倍频 532nm 绿激光机,在视盘下方 1 ~ 2DD 击射 20 点。激光击射参数:光斑直径 75 μm,功率 0.45W,时间 0.05s,光斑间距 100 μm;激光反应斑为 III 级 (Tso 分级<sup>[7]</sup>)。

**1.2.3 病理学标本制作** 于视网膜光凝后不同时间段,用空气栓塞法处死动物,去除眼周软组织,下方标记后置于 40g/L 甲醛液中固定 24h,去除眼前节,然后沿视神经旁 1mm 矢状剖开眼球,取包括激光斑的全层眼球壁组织,常规脱水、石蜡包埋,制成 3 μm 厚的连续石蜡切片,常规 HE 染色光镜下观察,选取有激光斑石蜡切片行 GFAP 和 CTGF 免疫组织化学检测。

**1.2.4 免疫组织化学染色检测 GFAP 和 CTGF 的表达** 采用 SP 二步法染色,常规石蜡切片脱蜡至水,30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

室温孵育 10min,以消除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5min,滴加 1:100 稀释的兔抗多克隆抗体,4℃ 过夜,滴加试剂 1 (聚合物辅助剂, Polymer Helper),37℃ 孵育 20min, PBS 冲洗,滴加试剂 2 (聚乙烯过氧化物酶抗兔 IgG),室温孵育 20min, PBS 冲洗, DAB 溶液显色,显微镜下控制反应时间,苏木素复染,常规脱水,封片。用 PBS 液及正常小鼠血清分别做阴性对照和替代对照,用已知阳性片作为阳性对照。以彩色病理图像分析管理系统 (CMIAS 2000 型) 对图片进行分析。GFAP 和 CTGF 免疫组织化学以细胞浆内出现黄色或棕黄色颗粒为阳性。在 400 倍显微镜下,每个激光损伤灶为一个视野,每个标本随机选取 5 处视野,对各组的免疫组织化学染色结果进行定量检测,测定阳性反应物的平均光密度值。

统计学分析:所有数据以 SPSS 13.0 统计软件包进行处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用双因素方差分析,SNK-*q* 检验进行两两比较,Pearson 直线相关法分析相关性,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 GFAP 蛋白在兔视网膜光凝斑的表达** 正常对照眼内界膜下视网膜神经纤维层和神经节细胞层 Müller 细胞终足有 GFAP 蛋白弱或无表达 (图 1A);光凝术后 1 和 3d,视网膜神经纤维层和节细胞层有增强的 GFAP 阳性染色,光凝斑两侧的 Müller 细胞都有围绕光凝斑的扇形 GFAP 阳性表达区域 (图 1B);光凝术后 7 ~ 28d,视网膜光凝斑 GFAP 持续表达,并有增强的趋势 (图 1C);各个时间段 GFAP 阳性表达平均光密度值比较,有显著统计学意义 ( $F = 3.34, P < 0.01$ , 表 1)。

**2.2 CTGF 蛋白在兔视网膜光凝斑的表达** 正常对照眼视网膜无 CTGF 表达 (图 2A);视网膜光凝术后 3d,视网膜激光斑外核层和神经纤维层有点状弱表达 (图 2B);光凝术后 7 ~ 28d,视网膜光凝斑 CTGF 持续表达,并有增强的趋势,CTGF 阳性表达在视网膜光凝斑的视网膜神经节细胞层 (GCL)、成纤维细胞、视网膜色素上皮层 (RPE) 和无定形的胶原组织 (图 2C);各个时间段组 CTGF 阳性表达平均光密度值比较,有显著统计学差异 ( $F = 3.05, P < 0.01$ , 表 1)。

**2.3 兔视网膜光凝后 GFAP 及 CTGF 表达的相关性** 经 Pearson 直线相关分析,GFAP 与 CTGF 在时序上表达呈密切正相关 ( $r = 0.786, P < 0.01$ )。

## 3 讨论

视网膜光凝术是治疗眼底疾病的一种重要有效手段,尽管已是临床上较成熟的操作技术,并取得了很好的治疗效果。但来源于治疗过程的一些并发症是难以避免的,如光凝时局部热扩散导致 Bruch 膜破裂、脉络膜充血和血栓形成、神经纤维层损伤等<sup>[1-3]</sup>。在治疗临近黄斑中心凹的

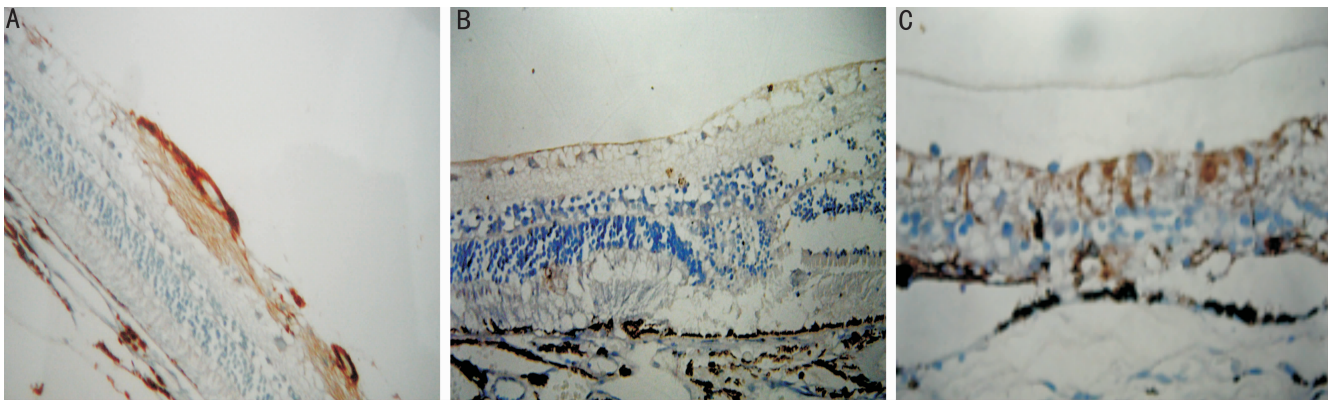


图1 GFAP蛋白在兔视网膜光凝斑的表达(SP法) A:正常对照组( $\times 200$ );B:光凝后3d( $\times 400$ );C:光凝后28d( $\times 400$ )。

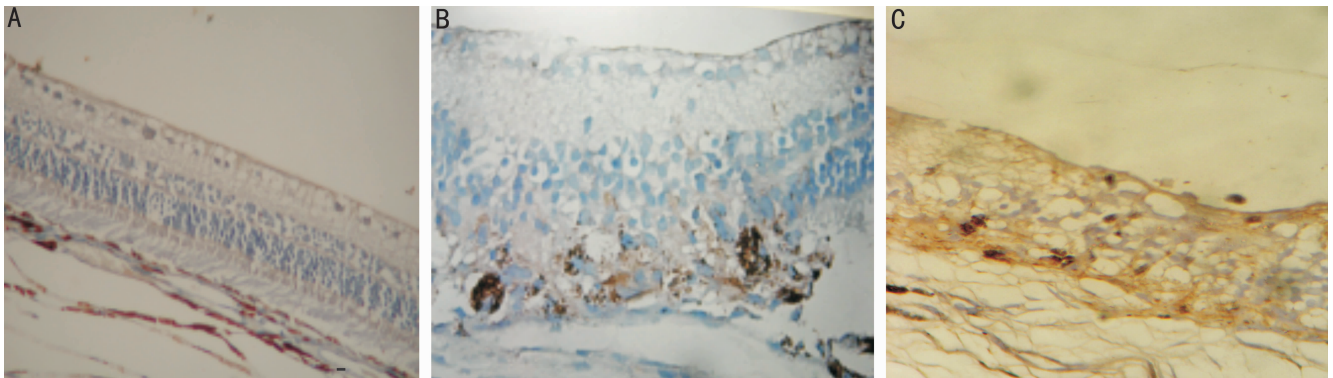


图2 CTGF蛋白在兔视网膜光凝斑的表达(SP法) A:正常对照组( $\times 200$ );B:光凝后3d( $\times 400$ );C:光凝后28d( $\times 400$ )。

病变时,约20%患者术后可出现即刻或进展性视功能损害;神经胶质瘢痕可能发生进行性扩大<sup>[2,3]</sup>,其发展的过程及机制不太清楚。我们的前期研究<sup>[4]</sup>表明视网膜光凝Tso III级光斑会导致光凝斑周围视网膜感觉神经细胞的非选择性、扩展性损伤。

根据Tso的分级:血管阻塞性缺血性增殖性视网膜病变均应达到视网膜III级光凝斑,但III级光斑易产生无效光斑和过量光凝斑<sup>[7]</sup>。为确定损伤程度的一致性,本研究在预实验的基础上,用频调532nm激光光凝色素家兔后极部(色素兔的视盘下方),建立兔视网膜III级光斑激光损伤动物模型,本研究从免疫组织学上探讨CTGF与GFAP是否参与视网膜光凝术后光凝斑组织损伤修复过程,为临床减少光凝副作用提供实验依据。

Müller细胞胞体位于内核层,但细胞突起占据整个视网膜厚度,是视网膜最重要的支架细胞和营养支持细胞,这种神经胶质细胞在神经系统中起着营养和支持的作用,并具有参与血-视网膜屏障形成、神经元信号传递的功能。这些说明Müller细胞在视网膜正常的生理活动和视网膜病变的病理过程中具有重要作用<sup>[5]</sup>。许多研究认为视网膜在受到损伤后,Müller细胞开始表达GFAP,而GFAP的表达是Müller细胞进入反应状态的标志,并与Müller细胞的肥大、增生和迁移有关系<sup>[5,8]</sup>。本研究显示视网膜光凝后第1d,GFAP在光凝斑周围阳性表达,光凝后第3d,RPE细胞和胶质细胞在破坏区开始增殖,GFAP开始在激光损伤灶表达;光凝后7~28d,RPE细胞和胶质细胞明显增生填补缺损区视网膜,此时激光损伤灶出现GFAP强阳性表达,这说明激光损伤灶最终由增生活化的Müller细胞修

复。Chu等<sup>[9]</sup>用氩激光光凝鼠视网膜发现光凝后6h,Müller细胞的GFAP在病变区阳性表达,7d和14d时Müller细胞已复盖病变区。Tassignon等<sup>[10]</sup>用激光光凝兔视网膜后2d,GFAP在Müller细胞终足染色阳性,4d时病变中心区染色。Humphrey等<sup>[11]</sup>观察到视网膜激光光凝损伤后GFAP的表达有两种不同的方式,即在激光光斑区域有局限和持续的表达,而在激光光凝斑周围有广泛而短暂的表达。这与我们的研究观察结果基本一致。

Müller细胞对损伤呈高反应性,在组织修复过程中能发生增生和分化,这种变化是损伤后的特征性自身保护反应,但胶质细胞反应过度将导致中间丝蛋白合成过多,影响光感受器细胞外节和色素上皮细胞之间的正常嵌合,从而影响光感受器细胞再生,阻碍了视网膜组织结构恢复和神经传递的重建,影响视功能恢复<sup>[5]</sup>。所以有学者希望通过采用一些方法阻止细胞增生来保护损伤的视网膜。

视网膜光凝后激光斑的修复也是一个创伤愈合过程,我们的前期研究已证实激光损伤灶最终由增生活化的Müller细胞、巨噬细胞、RPE细胞、表型转化的RPE细胞即成纤维细胞分泌的胶原基质修复<sup>[4,9]</sup>。CTGF是一种间质细胞的生长因子,它可由成纤维细胞分泌,启动一系列介导组织创伤修复和再生的生物学过程,在视网膜下新生血管中可发现CTGF的表达,这些都提示着CTGF可能是新生血管形成及纤维化的一个诱因<sup>[12-14]</sup>。本研究结果显示视网膜光凝术后3d,CTGF蛋白在激光光凝斑的神经节细胞层及外核层有点状阳性表达;第7d光镜下,光凝斑处视网膜下可见增生的成纤维细胞及胶原组织,CTGF在成纤维细胞、RPE、吞噬色素的巨噬细胞的胞浆和胶原基质

表达;光凝术后 7 ~ 28d, CTGF 持续阳性表达于激光损伤灶,随着激光斑细胞退变明显瘢痕化,CTGF 阳性表达有增强的趋势。而 CTGF 蛋白的表达在时序上与 GFAP 有一致性。本实验结果提示 CTGF 可能和 GFAP 一样是参与激光损伤灶修复的重要细胞因子,与激光斑瘢痕化直接相关,但它们之间的作用方式、调控机制尚需进一步探讨。CTGF 被视为 TGF- $\beta_1$  的下游效应介质,在创伤修复、组织纤维化进程中起重要作用。

Meyer 等<sup>[15]</sup>从基因水平证实增生性视网膜疾病的纤维血管膜中,转化的 RPE 细胞和成纤维细胞样细胞表达 CTGF mRNA,并且与 I 型胶原和细胞黏合素的表达有一致性。因此推测在增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)等增生性眼病发生过程中,TGF- $\beta$  显著上调 RPE、成纤维细胞 CTGF 的表达,刺激 CTGF 分泌,而 CTGF 以自分泌或旁分泌机制又进一步加重了 RPE 增生、黏附和分泌胶原。CTGF 在激光损伤灶的表达,推测 CTGF 可能与 Müller 细胞激活、成纤维细胞、RPE 细胞的增生有关。CTGF 有可能成为抑制神经胶质瘢痕扩大和视网膜下纤维增生膜形成的一个有价值的新靶点。

#### 参考文献

- 1 Rutledge BK, Wallow IH, Poulsen GL. Sub-pigment epithelial membranes after photocoagulation for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 1993;111(5):608-613
- 2 Dastgheib K, Bressler SB, Green WR. Clinicopathologic correlation of laser lesion expansion after treatment of choroidal neovascularization. *Retina* 1993;13(4):345-352
- 3 Lee CJ, Smith JH, Kang-Mieler JJ, et al. Decreased circulation in the feline choriocapillaris underlying retinal photocoagulation lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3398-3403
- 4 覃冬菊,唐罗生,刘湘平,等.兔视网膜光凝术后组织形态学改变的动态观察. *国际眼科杂志* 2008;8(5):909-912
- 5 李树宁. 视网膜中的 Müller 细胞. *眼科研究* 2005;23(1):104-106
- 6 Gupta S, Clarkson MR, Duggan J. Connective growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 2000;58(4):1388-1399
- 7 Tso MOM. Retinal photocoagulation therapy: Clinical application and biological basis of therapeutic effects. Philadelphia: J B Lippincott Company 1988:246-262
- 8 Gohdo T, Ueda H, Ohno S, et al. Heat shock protein 70 expression increased in rabbit muller cells in the ischemia-reperfusion model. *Ophthalmic Res* 2001;33(5):298-302
- 9 Chu Y, Humphrey MF, Alder W, et al. Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor and glial fibrillary acidic protein after laser photocoagulation in the Royle college surgeons rat. *Aust NZ J Ophthalmol* 1998;26(1):87-91
- 10 Tassignon MJ, Stemples N, Nguyen-legros J, et al. The effect of wave length on glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in laser-induced lesions in rabbit retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991;29(4):380
- 11 Humphrey MF, Constable IJ, Chu Y, et al. A quantitative study of the lateral spread of Müller cell responses to retinal lesions in the rabbit. *J Comp Neurol* 1993;334(4):545-558
- 12 Kuiper EJ, Van Nieuwenhoven FA, de Smet MD, et al. The angiogenic switch of VEGF and CTGF in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* 2008;3(7):2675-2679
- 13 Watsnabe D, Takagi H, Suzuma K, et al. Expression of connective tissue growth factor and its potential role in choroidal neovascularization. *Retina* 2005;25(7):911-918
- 14 Pi L, Xia H, Liu J, et al. Role of connective tissue growth factor in the retinal vasculature during development and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):8701-8708
- 15 Meyer P, Wunderlich K, Kain HL, et al. Human connective tissue growth factor Müller expression of epiretinal and subretinal fibrovascular membranes: a report of three cases. *Ophthalmology* 2002;216(4):284-291