

视网膜神经节细胞标记方法的研究进展

林俊, 朱益华

基金项目:福建省科技厅重点项目(No. C0520003)

作者单位:(350005)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院眼科

作者简介:林俊,男,在读硕士研究生,研究方向:青光眼。

通讯作者:朱益华,男,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:青光眼. zhuyihua889@126.com

收稿日期:2011-11-28 修回日期:2012-04-17

Recent advances in research on labeling retinal ganglion cells

Jun Lin, Yi-Hua Zhu

Foundation item: Fujian Provincial Department of Science and Technology Fund, China (No. C0520003)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Yi-Hua Zhu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. zhuyihua889@126.com

Received:2011-11-28 Accepted:2012-04-17

Abstract

• At present, there are many fundamental approaches to study label retinal ganglion cells (RGCs). Retrograde labeling is the common method of label RGCs, but there are many deficiencies. In the present studies, people have found that many kinds of proteins were specific expressed by RGCs, and tried to use immunolabeling method to label RGCs. This review focuses on recent advance in research on labeling RGCs.

• **KEYWORDS:** retinal ganglion cells; retrograde labeling; immunolabeling

Lin J, Zhu YH. Recent advances in research on labeling retinal ganglion cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2012;12(6):1091-1093

摘要

目前对视网膜神经节细胞(RGCs)进行标记研究的基本方法有多种。逆行标记法是标记研究 RGCs 的常用方法,但存在许多不足之处。近年来,人们发现 RGCs 内或胞体上存在某些特异的抗原,因此尝试使用免疫标记的方法标记检测 RGCs。本文综述近年来对 RGCs 进行标记的研究进展。

关键词: 视网膜神经节细胞;逆行标记;免疫标记

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.24

林俊,朱益华. 视网膜神经节细胞标记方法的研究进展. 国际眼科杂志 2012;12(6):1091-1093

0 引言

青光眼是一类以特征性视野缺损和视神经损害为共同特征的不可逆性致盲眼病,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)是青光眼病理性损伤的主要靶细胞。青光眼 RGCs 受损机制现在还未明确,但普遍认为视网膜神经节细胞层和视盘的病理性改变在青光神经病变过程中起到重要作用^[1]。然而 RGCs 约只占鼠视网膜神经节细胞层所有细胞的 45%^[2]。在细胞形态上,RGCs 不能很好的与其他细胞区别开来,比如无长突细胞^[3]。此外,RGCs 结构和功能异质性,以及有关 RGCs 亚型的分子组成和特征的资料仍然很有限。因缺乏区分 RGCs 及其亚型的标记,使得研究青光眼的发病机制更加困难。因此,如何正确地标记 RGCs,对研究青光眼视神经的损伤机制和保护具有重大意义。

1 逆行标记法

RGCs 发出的轴突组成视神经投射到外侧膝状体及上丘经换神经元后再投射到视皮质,形成完整的视通路。轴浆运输是神经细胞的基本生理现象,是细胞内物质运输的形式,为一复杂的耗能过程。逆行标记是将荧光或酶联染液注射或者用海绵贴附到 RGCs 轴突上或所投射的上一级中枢神经核团内,如上丘和外侧膝状体。染料通过 RGCs 轴突内的逆行轴浆运输,向 RGCs 胞体内移行,并使 RGCs 染色,1wk 后摘取眼球,固定平铺视网膜,观察标记 RGCs^[4]。但这种方法也有许多缺点:活体上解剖定位上丘较困难,且术中出血、脑脊液漏出等影响手术操作将颅骨打开后确定外侧膝状体和上丘的位置。上丘和外侧膝状体定位的数据库仅是同类实验动物的平均值,而实验动物的大小常存在个体差异,因此给定位带来困难。上丘和外侧膝状体定位稍有偏差,RGCs 染色就会不均匀。要求严格控制注射深度,用立体定位仪固定大鼠,需将金属固定器的尖端插入大鼠外耳道使其头部制动,对实验动物造成很大的痛苦,而且这种固定方法是将注射器固定于上方的弧形操作杆上,不能完全避免注药时动物的呼吸运动引起的注射针头的移动。立体定位注射法逆行标记法需要特殊的立体定位仪及实验动物的脑部立体定位图谱,且定位准确度无法保证,有时会出现染色不均匀,而导致样本剔除和浪费。由于逆行标记法的解剖和生理基础为视神经的轴浆运输,视神经轴索的大小和功能就决定了 RGCs 是否能被准确标记。不均匀染色可见于多种情况,最常见的有视网膜各象限染色不均,部分象限染色已充分,其他象限不充分染色甚至没有染色^[5]。

2 免疫标记法

免疫标记技术是指将抗原或抗体用小分子的标记剂,如荧光素、放射性同位素、酶、铁蛋白、胶体金及化学(或生物)发光剂等作为追踪物,并借助于荧光显微镜、射线测量仪、酶标检测仪、电子显微镜和发光免疫测定仪等精密仪器,以提高其灵敏度和便于检出的一类新技术^[6,7]。

近年来,人们发现 RGCs 胞内或胞体上存在某些特异的抗原,因此尝试使用免疫标记的方法标记检测 RGCs。目前常用的免疫标记物为 Thy-1.1, Brn-3 以及 γ -突触核蛋白等。

2.1 Thy-1.1 Osborne 等^[8]使用 Thy-1 抗原抗体对 RGCs 进行体外的免疫标记检测表明,Thy-1.1 抗原是存在于啮齿类动物许多细胞表面的一种糖蛋白,被认为是成熟节细胞的标志。因此,Thy-1.1 单克隆抗体广泛用于鼠 RGCs 的鉴定与分离纯化。视网膜的 Thy-1.1 抗原表达于胚胎 19d 开始出现,且仅仅在 RGCs 胞体及突起上表达,并于出生后 14d 才开始增加,其增加与内丛状层的厚度增加相平行,因而认为 RGCs 上 Thy-1.1 抗原表达与其轴突伸长、树突生长及与靶组织上丘开始建立突触联系有关^[9]。Bamstable 等^[10]发现 Thy-1.1 抗原是啮齿类动物 RGCs 特异性的标记物。Takahash 等^[11]亦用抗鼠 Thy-1.1 mAb 鉴定 RGCs。但 Taschenberger 等^[12]发现在体外培养中,特别是培养 1wk 后,一种类成纤维细胞也表达 Thy-1.1 抗原。但是它对视网膜损伤模型的 RGCs 的丢失的判定不是一个好的标记物,因为 Thy-1.1 的表达模式在视网膜损伤后会有改变。再则,Thy-1.1 的下降与 RGCs 的凋亡不相关,事实上目前我们对 Thy-1.1 在 RGCs 中的作用知道甚少,没有报道认为 Thy-1.1 与 RGCs 的存活有关。Thy-1.1 在 Bax^{-/-}的小鼠和视神经挫伤、视网膜损伤后存活的 RGCs 中的表达会关闭^[13]。Thy-1.1 在 Müller 细胞中也有表达。

2.2 Brn-3 Brn-3 族转录因子属于 POU (Pit-Oct-Unc, POU) 结构域转录因子家族,在神经系统的正常发育及神经元的分化方向选择中发挥着重要作用,其家族成员包括 Brn-3a, Brn-3b 和 Brn-3c (又名: Brn3.0, B m3.1, B m3.2; 小鼠基因组名称: Pou4 f1, Pou4 f2 和 Pou4f3)^[14]。三种 Brn-3 族成员广泛分布于中枢神经系统的 RGCs、背根和三叉神经节、听觉和前庭神经元以及特定的中脑神经核中,共同维持着视觉系统、躯体感觉系统以及听觉、前庭系统的正常发育分化^[15]。当去除 Brn3 族转录因子中的任何一个或多个,将导致视网膜、三叉神经节和内耳中特定类型神经元的发育缺陷及凋亡^[16]。常用于标记 RGCs 的有 Brn-3a 和 Brn-3b。

Brn-3a 主要表达于周围神经系统的神经元亚群中,参与神经元的生存和分化相关基因的激活。已有学者对其结构、表达的调节以及在神经细胞中的功能和作用机制等进行了深入研究,研究还发现 Brn-3a 在非神经来源的细胞类型,包括宫颈和睾丸以及乳腺、B 和 T 淋巴细胞中都有表达。Brn-3a 与神经系统的发育密切相关,目前人们已注意到 POU 同源盒基因与神经系统发育有密切关系。在神经系统的发育期间,POU 家族的许多因子能以不同时间和空间模式表达,如 Brn-3a 因子的 3 种亚型均在发育的神经管中表达,而 Brn-3a 又是中枢神经系统发育期有丝分裂后神经元中最早表达的一个因子。无论是体内的神经元,还是在体外培养的神细胞系的分化期 Brn-3a 均高效表达。Brn-3a 转录因子在鼠类 RGCs 的发育过程中,对 RGCs 的分化、存活以及轴突的延伸起重要作用^[17]。它们也成为重要且可信度高的 RGCs 的标记物,例如,在大鼠和小鼠中 Brn-3b 曾被用来辨别 RGCs, Brn-3a 也被证实成年小鼠的 RGCs 和外侧膝状体的神经核中特异性表达,在大鼠视网膜离体培养中用来鉴别 RGCs^[18]。Jochen 等研究^[19]表明 POU 家族转录因子 Brn-3a 和 Brn-3b

在成年大鼠的绝大多数的 RGCs 中表达, Brn-3a 阳性细胞仅仅存在于视网膜的神经节细胞层,其空间分布与逆行荧光金标记的细胞大致相同。Brn-3a 的信号存在于细胞核,这优于 Bex1/2 和标记神经微丝的抗体,它们表达在 RGCs 的胞质和轴突,不利于 RGCs 的计数分析。Francisco 等^[20]通过对整个视网膜的蛋白提取物进行 Western blot 分析,发现 Brn-3a 的表达模式在视网膜损伤后没有改变。因此 Brn-3a 是一种用来标记有活性的 RGCs 的理想抗原。他们设计实验利用 RGCs 特异性表达 Brn-3a 对 RGCs 进行定量和空间分布的检测,并且制作视神经横断和视神经挫伤的大鼠模型,然后检测 RGCs 随着时间的丢失,并与同样的模型用逆行荧光金染色来比较。结果显示: Brn-3a 的表达模式在视网膜损伤后没有改变。在未经处理的正常大鼠视网膜中,92.2% 的 RGCs 逆行荧光金和 Brn-3 标记均阳性,有 4.4% 的 RGCs 被 Brn-3a 标记但未被荧光金标记,3.4% 的 RGCs 被荧光金标记未被 Brn-3a 标记。Brn-3a 在大多数逆行荧光金标记阳性的 RGCs 中表达,这说明在正常视网膜中用 Brn-3a 标记 RGCs 和计数 RGCs 是有效且可信的。

Brn-3b 也是 POU 类家族转录因子中的一员,它在细胞特别是神经系统细胞的基因调节过程中起到非常关键的作用^[21]。各种生物包括鼠、鸡、兔、猴和人类的某一类 RGCs 的胞核内皆有 Brn-3b 的表达^[22]。研究表明,在猫所有小、中、大 3 类 RGCs 中均有 Brn-3b 蛋白分布。在猕猴的视网膜内, Brn-3b 抗体标记了所有逆转运双标记的 RGCs;但在小鼠视网膜内,仅有 35% ~ 36% 的 RGCs 中 Brn-3b 染色阳性。由于 Brn-3b 仅在啮齿类某些 RGCs,而无法在视网膜其他细胞内表达,因此是一种用来标记有活性的 RGCs 的理想抗原。通过对视网膜内 Brn-3b 阳性细胞的计数可以反映有活性 RGCs 的数量。Brn-3b 是 Brn-3 转录因子家族中最早出现表达的成员,已发现其对 RGCs 具有重要的调控作用。在胚胎发育早期, Brn-3b 被发现约 80% 视网膜前体细胞中有表达^[23,24]。Leahy 等^[25]使用 Brn-3b 对离体视网膜进行免疫标记定量检测啮齿类 RGCs。

2.3 γ -突触核蛋白 突触核蛋白 (synuclein) 是一个广泛分布于中枢神经系统突触前成分内的小分子可溶性蛋白质家族,由 α -突触核蛋白 (α -synuclein)、 β -突触核蛋白 (β -synuclein) 和 γ -突触核蛋白 (γ -synuclein) 3 个成员组成,是一组氨基酸序列及结构高度同源天然伸展蛋白。目前,对于它们的生物学功能还未充分了解。对突触核蛋白家族的研究一直是神经变性疾病领域的热点,它的表达异常影响多巴胺能神经元功能,导致阿尔茨海默病和帕金森病等神经退行性疾病的发生和发展^[26,27]。

已有研究表明突触核蛋白家族的 3 名成员在视网膜发现差异表达, α -和 β -突触核蛋白主要于内网状层,内核层,并在感光细胞表达,而 RGCs 表达 γ -突触核蛋白^[28,29]。Surgucheva 等^[30]的研究表明 γ -突触核蛋白是 RGCs 的特异性标志物。 γ -突触核蛋白表达在神经节细胞层的 RGCs 和其在神经纤维层的轴突上。他们还发现,在视网膜母细胞瘤患者的视网膜和神经纤维层 γ -突触核蛋白的表达减少,但在 RGCs 亚群的细胞体表达增加。在原发性开角型青光眼患者中,轴索和肿胀的轴突仍然有 γ -突触核蛋白的表达。这种蛋白质在视网膜肿瘤和视网膜变性疾病中的作用还有待研究。突触核蛋白通过 N-氨基末端重复区

域结合囊泡参与轴突运输^[31]。他们研究发现在青光眼性视神经中 γ -突触核蛋白的聚集可能导致RGCs轴突的 γ -突触核蛋白的运输中断。在DBA/2J青光眼小鼠模型中, γ -突触核蛋白表达的减少和轴突运输障碍是一致的^[32]。 γ -突触核蛋白也可能通过调节神经微丝网络的完整性^[33],或通过其上调一种在动物模型中在RGCs凋亡起着重要作用的调节细胞外基质的基质金属蛋白-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)^[34],发挥其在轴突运输受损的致病作用。他们的研究认为 γ -突触核蛋白将成为研究RGCs正常生理及其凋亡机制的一个重要工具,其本身也很可能在青光眼或其它退行性病变导致RGCs凋亡的病理生理学机制中起着重要作用。

3 结语

免疫标记法既可特异性地对RGCs进行标记,又不需要在逆行标记中所必需的侵入性的试验操作,且不会影响RGCs的细胞活性,避免了轴浆运输的不稳定性,因此为RGCs标记提供了一种简便可行的方法,为进一步研究青光眼或其它退行性疾病中视神经病变的病理生理机制提供重大帮助。

参考文献

- Quigley HA. Glaucoma: macrocosm to microcosm the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(8):2662-2670
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 1998;18(21):8936-8946
- Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(5):1004-1008
- LaVail JH, LaVail MM. Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 1972;176(42):1416-1417
- 段宣初, 卿国平, 李婵. 实验动物视网膜神经节细胞的定量研究方法. *国际眼科杂志* 2006;6(3):667-670
- 车振明. 工科微生物学教程. 成都:西南交通大学出版社 2007
- 周德庆. 微生物学教程. 北京:高等教育出版社 2002
- Osborne NN, Larsen AK. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem* 1996;29(3):263-270
- Leifer D, Lipton SA, Barnstable CJ, Masland RH. Monoclonal antibody to Thy-1 enhances regeneration of processes by rat retinal ganglion cells in culture. *Science* 1984;224(4646):303-306
- Barnstable CJ, Drager UC. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 1984;1(4):847-855
- Takahashi N, Cuminms D, Caprioli J. Rat retinal ganglion cells in cultures. *Exp Eye Res* 1991;53(5):565-572
- Taschenberger H, Grantyn R. Several types of Ca²⁺ channels mediate glutamatergic synaptic responses to activation of single Thy-1 immunolabeled rat retinal ganglion neurons. *J Neurosci* 1995;15(3):2240-2254
- Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, et al. Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2001;7:192-201
- Turner EE, Jenne KJ, Rosenfeld MG. Brn-3. 2: a Brn-3-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid. *Neuron* 1994;12(1):205-218
- Fedtsova NG, Turner EE. Brn-3. 0 expression identifies early post mitotic CNS neurons and sensory neural precursors. *Mech Dev* 1995;53(3):291-304

- Gerrero MR, McEvelly RJ, Turner E, et al. Brn-3. 0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(22):10841-10845
- Wang SW, Mu X, Bowers WJ, et al. Brn-3b/Brn-3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn-3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development* 2002;129(2):467-477
- Johnson TV, Martin KR. Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an *in vitro* intraocular stem cell transplantation model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(8):3503-3512
- Weishaupt JH, Klöcker N, Bähr M, et al. Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells. *J Mol Neurosci* 2005;26(1):17-25
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naïve and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(8):3860-3868
- Latchman DS. POU family transcription factors in the nervous system. *Cell Physiol* 1999;179(2):126-133
- Xiang M, Zhou L, Peng YW, et al. Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells. *Neuron* 1993;11(4):689-701
- Xiang M. Requirement for Brn-3b in early differentiation of post mitotic retinal ganglion cell precursors. *Dev Biol* 1998;197(2):155-169
- Xiang M, Gan L, Li D, et al. Role of the Brn-3 family of POU-domain genes in the development of the auditory/vestibular, somatosensory, and visual systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1997;62(2):325-336
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, et al. Quantitative *ex vivo* detection of rodent retinal ganglion cells by immunolabeling Brn-3b. *Exp Eye Res* 2004;79(1):131-140
- Brighina L, Okubadejo NU, Schneider NK, et al. Beta-synuclein gene variants and Parkinson's disease: a preliminary case-control study. *Neurosci Lett* 2007;420(3):229-234
- Myerowitz R, Mizukami H, Richardson KL, et al. Global gene expression in a type 2 Gaucher disease brain. *Mol Genet Metab* 2004;83(4):288-296
- Surguchov A, McMahan B, Masliah E, et al. Synucleins in ocular tissues. *Neurosci Res* 2001;65(1):68-77
- Martínez-Navarrete GC, Martín-Nieto J, Esteve-Rudd J, et al. Alpha synuclein gene expression profile in the retina of vertebrates. *Mol Vis* 2007;13:949-961
- Surgucheva I, Weisman AD, Goldberg JL, et al. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2008;14:1540-1548
- Jensen PH, Nielsen MS, Jakes R, et al. Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *Biol Chem* 1998;273(41):26292-26294
- Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, et al. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *Neurosci* 2008;28(2):548-561
- Buchman VL, Adu J, Pinón L, et al. Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity. *Nat Neurosci* 1998;1(2):101-103
- Chintala SK, Zhang X, Austin JS, et al. Deficiency in matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) protects against retinal ganglion cell death after optic nerve ligation. *Biol Chem* 2002;277(49):47461-47468