

早期单眼剥夺对大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 表达的影响

罗瑜琳, 罗俊, 邓姿峰, 郭燕, 王曦琅, 谭艺兰, 陶利娟, 吴秀婷

作者单位: (410007) 中国湖南省长沙市, 湖南省儿童医院眼科
作者简介: 罗瑜琳, 女, 博士, 医师, 研究方向: 斜弱视、屈光。
通讯作者: 陶利娟, 女, 学士, 主任医师, 研究方向: 斜弱视、屈光。
tlj823@sina.com
收稿日期: 2012-11-05 修回日期: 2012-12-20

Influence of early monocular deprivation on the expression of brain derived neurotrophic factor and TrkB receptor in rats' retina

Yu-Lin Luo, Jun Luo, Zi-Feng Deng, Yan Guo, Xi-Lang Wang, Yi-Lan Tan, Li-Juan Tao, Xiu-Ting Wu

Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China

Correspondence to: Li-Juan Tao. Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China. tlj823@sina.com

Received: 2012-11-05 Accepted: 2012-12-20

Abstract

• **AIM:** To explore the influence and significance of early monocular deprivation on the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and TrkB receptor in rats' retina.

• **METHODS:** Totally 40 neonatal rats were randomly allocated into 6 groups: normal group of postpartum 28 days (NorP28), normal group of postpartum 35 days (NorP35), normal group of postpartum 42 days (NorP42), monocular deprivation group of postpartum 28 days (MDP28), monocular deprivation group of postpartum 35 days (MDP35) and monocular deprivation group of postpartum 42 days (MDP42). For the MD model, we sutured together the right eyelids of rats at postpartum 21 days. A subset of rats at each time points were killed, then the retinas were removed and frozen for detecting the expression pattern of BDNF and its receptor TrkB by means of Western blot and immunohistochemistry.

• **RESULTS:** During the visual development critical period, the expression of BDNF and TrkB receptor had no significant change with the growth of age. After the early monocular deprivation, BDNF and TrkB receptor were

significantly increased its expression at postpartum 28 days, then decreased at postpartum 35 days and maintained a steady level between postpartum 35 days to postpartum 42 days. BDNF expressed in ganglion cell layer, inner nuclear layer and outer nuclear layer of retina, while TrkB receptor expressed only in ganglion cell layer. In response to MD, the expression of BDNF and TrkB receptor positive cells was dramatically up-regulated in ganglion cell layer at postpartum 28 days, and then decreased gradually at postpartum 35 days to postpartum 42 days.

• **CONCLUSION:** The expression of BDNF and its TrkB receptor presents a visual-experience dependency, and they participate in the onset of monocular deprivation amblyopia.

• **KEYWORDS:** brain derived neurotrophic factor; TrkB receptor; ganglion cell layer; monocular deprivation

Citation: Luo YL, Luo J, Deng ZF, *et al.* Influence of early monocular deprivation on the expression of brain derived neurotrophic factor and TrkB receptor in rats' retina. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(1):38-41

摘要

目的: 探讨早期单眼剥夺对大鼠视网膜中脑源性神经生长因子(BDNF)及受体 TrkB 表达的影响。

方法: 40 只新生 SD 大鼠随机分为 6 组: 28 日龄正常组、35 日龄正常组、42 日龄正常组、28 日龄模型组、35 日龄模型组及 42 日龄模型组, 模型组大鼠于出生后 21d 缝合右侧眼睑建立单眼剥夺弱视模型, 采用免疫印迹及免疫组织化学法检测视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 的表达。

结果: 正常大鼠在出生后视觉发育关键期内, 随年龄增长视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达无明显变化。早期单眼剥夺后, 模型组大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达在 28 日龄立即呈现显著上升趋势, 然而随着剥夺时间延长 35 日龄时表达剧烈下调, 并持续至 42 日龄。BDNF 表达在视网膜神经节细胞层、内核层及外核层, 而 TrkB 受体仅表达在视网膜神经节细胞层。早期单眼剥夺可使 28 日龄大鼠视网膜神经节细胞层中 BDNF 及受体 TrkB 阳性细胞数目显著增多, 但随着视觉剥夺时间延长, 35 日龄至 42 日龄时两者的阳性细胞数目呈现逐渐减少的趋势。

结论: BDNF 及受体 TrkB 的表达呈现一定的视觉经验依赖性, 其参与了单眼剥夺弱视的发病。

关键词:脑源性神经生长因子;TrkB 受体;神经节细胞层;单眼剥夺

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.07

引用:罗瑜琳,罗俊,邓姿峰,等.早期单眼剥夺对大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 表达的影响.国际眼科杂志 2013;13(1):38-41

0 引言

视觉发育可塑性机制一直是神经眼科研究的热点。传统观念认为,哺乳动物中枢神经系统在胚胎期及出生后早期具有良好的再生性及结构重排能力,视觉系统可根据外界环境的刺激调整和改变其神经联系和突触结构,表现出较强的可塑性。其原因可能为中枢神经系统神经元所生存的内环境中各种生长促进性和抑制性因子的相互影响,其中神经营养因子对神经元的可塑性调控可能起关键的作用。目前已发现表达在视网膜上的神经营养因子的种类很多,包括神经生长因子(NGF)、表皮生长因子(EGF)以及脑源性神经生长因子(BDNF)等^[1-3]。其中 BDNF 及受体 TrkB 表达对视觉可塑性影响的研究较多^[4],BDNF 属于神经营养因子蛋白家族,神经营养作为其传统作用仅仅只是众多作用之一^[5],除此之外,BDNF 已被确定为特定外周神经元存活的关键因素,也是神经元分化及损伤修复过程中的经典链接^[6]。同时,BDNF 又能调节发育及成熟神经系统中神经元各种不同方面功能^[7]。在中枢神经系统中,BDNF 的快速影响能使谷氨酸突触传递增强, γ -氨基丁酸能突触传递减弱;BDNF 存在的慢性作用能提高谷氨酸和 γ -氨基丁酸能突触的形成,加快它们的功能成熟^[8,9]。

然而,早期单眼剥夺所导致的视觉干预对大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 表达的影响报道较少。本实验拟通过建立单眼剥夺弱视大鼠模型,用免疫印记及免疫组织化学方法检测视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白的表达趋势,探讨单眼剥夺对大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 表达的影响和意义。

1 材料和方法

1.1 材料 新生健康 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌雄不限,饲养于中南大学医学院实验动物中心,饲养环境符合医学实验动物环境设施要求。饲养环境通风良好,室温 18℃~25℃,相对湿度 40%~70%,12h 光照昼夜循环。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 按随机数字表法将大鼠分为 2 组:正常组 16 只,单眼剥夺模型组 24 只。正常组:按实验设计取材时间点随机分为 3 小组,即 28 日龄正常组(NorP28,8 只)、35 日龄正常组(NorP35,4 只)、42 日龄正常组(NorP42,4 只);单眼剥夺模型组大鼠于出生后 21d 缝合右侧眼睑建立单眼剥夺弱视模型,按取材时间点随机分为 3 小组:28 日龄模型组(MDP28,8 只)、35 日龄模型组(MDP35,8 只)、42 日龄模型组(MDP42,8 只)。

1.2.2 大鼠单眼剥夺弱视模型的建立 采用 Maffei 等^[10]的眼睑缝合方法建立单眼剥夺弱视大鼠模型。取正常光

线条件下饲养的 21 日龄大鼠 24 只,10%水合氯醛腹腔麻醉,右侧上下眼睑分别剪除宽约 1.5mm 睑缘组织,6-0 可吸收缝线褥式缝合上下眼睑创缘,涂少许四环素眼膏。清醒后在正常光线下饲养,每天早、晚仔细观察缝合眼,眼睑出现裂缝的动物不纳入实验。

1.2.3 免疫印迹法检测单眼剥夺对大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达的影响 按实验预先设计分别取各组大鼠各 4 只,过量 10%水合氯醛腹腔麻醉动物,脱颈椎处死后冰上迅速取视网膜,加裂解液,4℃放置 30min,蛋白定量后沸水变性备用。取变性好的样本蛋白电泳并转膜后,对其做免疫反应,将膜放入含有 5%脱脂奶粉(含 0.1% Tween-20)的 PBS 中,室温封闭 1h;然后用 0.01mol/L PBS 溶液漂洗 3 次,分别加入封闭液稀释的 BDNF 一抗(1:100)或 TrkB 一抗(1:100),4℃轻摇过夜;再次用 0.01mol/L PBS 溶液漂洗 3 次后,分别加入稀释的相应种属的 HRP 偶联二抗(1:1000),37℃孵育 2h;用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤好,化学发光试剂盒显色,暗室显影定影后,扫描分析。

1.2.4 免疫组织化学法检测单眼剥夺对大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 表达的影响 按实验预先设计,分别取 NorP28 组、MDP28 组、MDP35 组、MDP42 组大鼠各 4 只,10%水合氯醛腹腔麻醉动物后,固定四肢,剪开胸腔暴露心脏,经左心室用 0.01mol/L PBS 溶液 150mL 快速冲净血液,然后用 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液约 150mL 灌注固定;断头取出眼球,剪开角膜,分离晶状体并移除,将视杯于 4%多聚甲醛中 4℃固定过夜,再分别移至 15%和 30%蔗糖溶液中梯度脱水至沉底。根据大鼠视网膜结构特点,沿水平面做 20 μ m 厚连续冰冻切片,0.1%明胶片贴片,4℃保存备用。将切片放入含有 5%小牛血清白蛋白(含 0.1% Triton X-100)的 PBS 中,室温封闭 1h;然后用 0.01mol/L PBS 溶液漂洗 3 次,分别加入封闭液稀释的 BDNF 一抗(1:100)或 TrkB 一抗(1:100),4℃轻摇过夜;再次用 0.01mol/L PBS 溶液漂洗 3 次后,分别加入稀释的相应种属的 HRP 偶联的二抗(1:1000),37℃孵育 2h;0.01mol/L PBS 溶液漂洗,加入 A 和 B 液,37℃孵育 2h,DAB 显色,TrkB 做 Ni 加强染色,干片后,常规梯度乙醇脱水,二甲苯脱水透明后,中性树胶封片,显微镜下观察照相。

统计学分析:计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 11.0 统计软件包对数据进行统计处理。多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单眼剥夺对大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达的影响 运用 Western-blot 方法检测正常发育各组大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达水平,结果见图 1。正常组大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达丰富,各年龄组间表达差异无统计学意义($P>0.05$)。单眼视觉剥夺 7d 后,即 MDP28 组大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达量剧增;视觉剥夺 14d 后,MDP35 组及 MDP42 组大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达明显减少,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。单眼剥夺后,模型大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 的表达趋势基本一致。

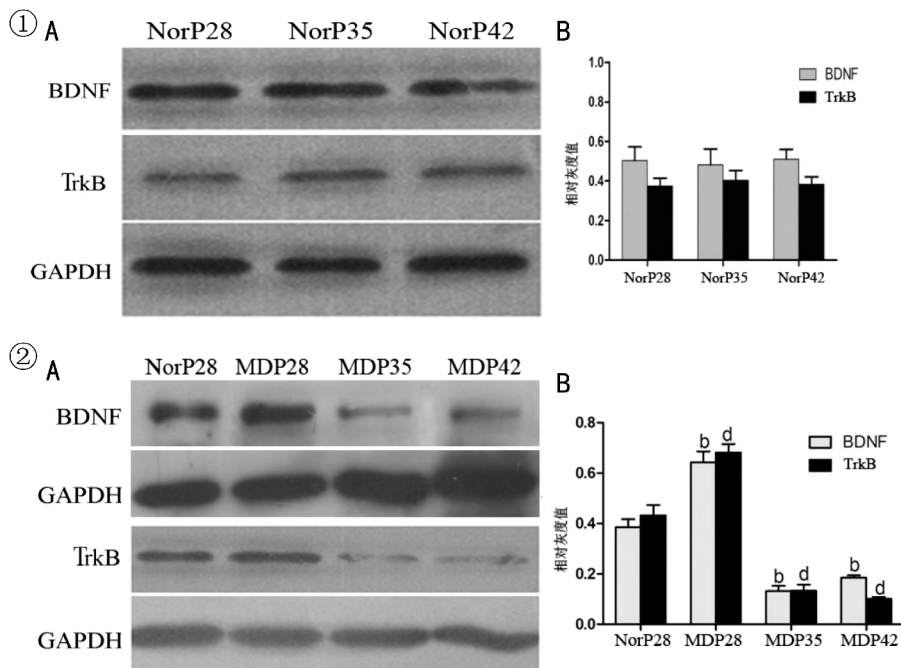


图1 免疫印迹法检测各时间点正常及模型大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达 ①正常组:A:电泳条带图;B:灰度相对比值柱状图。②NorP28 和模型组:A:电泳条带图;B:灰度相对比值柱状图;^b $P < 0.01$,^d $P < 0.01$ vs NorP28 组。

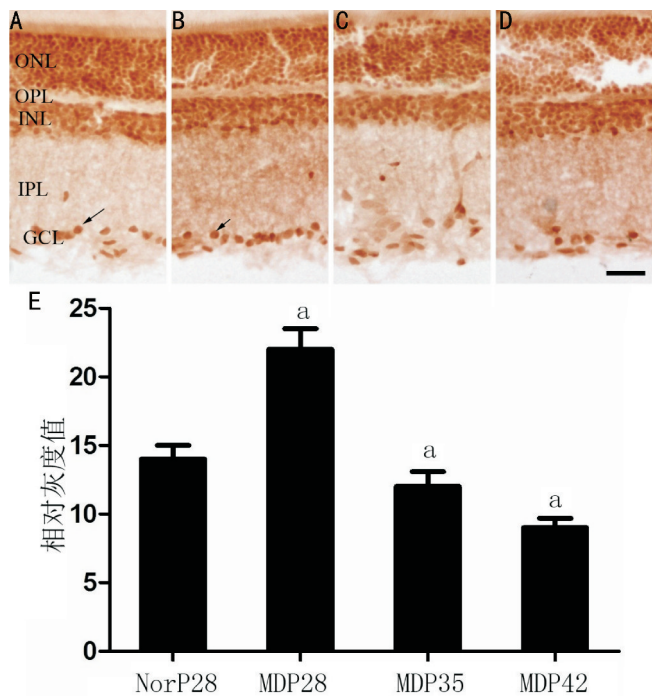


图2 免疫组织化学法检测单眼剥夺对大鼠视网膜中 BDNF 蛋白表达的影响 A:NorP28 组组;B:MDP28 组;C:MDP35 组;D:MDP42 组(箭头所示为 BDNF 表达的阳性细胞,bar = 50 μ m);E:视网膜神经节细胞层中 BDNF 表达的阳性细胞计数统计柱状图(^a $P < 0.05$ vs NorP28 组)。

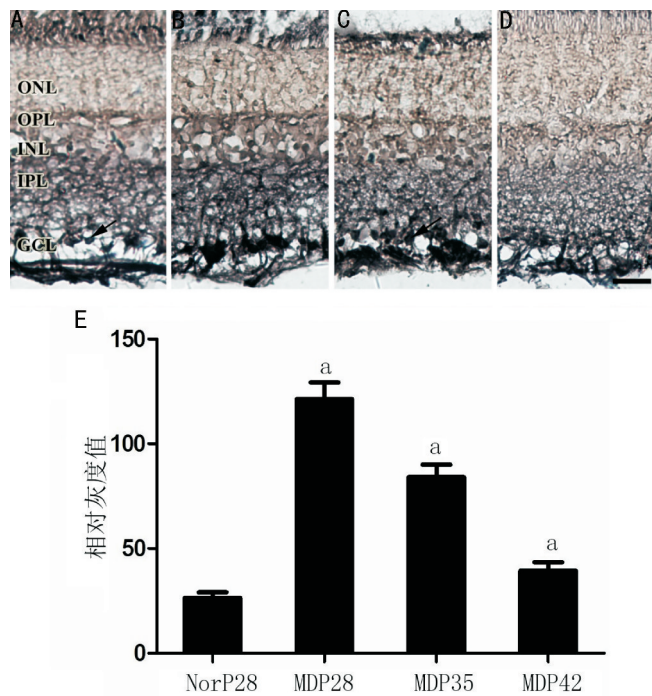


图3 免疫组织化学法检测单眼剥夺对大鼠视网膜中 TrkB 受体蛋白表达的影响 A:NorP28 组组;B:MDP28 组;C:MDP35 组;D:MDP42 组(箭头所示为 TrkB 表达的阳性细胞,bar = 50 μ m);E:视网膜神经节细胞层中 TrkB 受体表达的阳性细胞计数统计柱状图(^a $P < 0.05$ vs NorP28 组)。

2.2 单眼剥夺对大鼠视网膜神经节细胞层中 BDNF 表达的影响 正常组大鼠视网膜中 BDNF 表达在视网膜神经节细胞层、内核层及外核层,其中神经节细胞层 BDNF 表达边界清晰,阳性细胞数量丰富(图2)。单眼剥夺 7d 后,MDP28 组大鼠剥夺视网膜神经节细胞层中 BDNF 阳性细胞数目增多,颜色较正常组深染。随着剥夺时间延长,MDP35 组及 MDP42 组大鼠视网膜神经节细胞层细胞排

列紊乱,阳性细胞数目减少,与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。单眼剥夺对模型组大鼠视网膜内核层及外核层中 BDNF 阳性细胞表达无显著性影响。

2.3 单眼剥夺对大鼠视网膜神经节细胞层中 TrkB 受体表达的影响 正常组大鼠视网膜中 TrkB 主要表达在视网膜神经节细胞层,内核层及外核层基本无表达(图3)。单眼剥夺 7d 后,MDP28 组大鼠剥夺视网膜神经节细胞层中

TrkB 受体阳性细胞数目增多,颜色较正常组深染。随着剥夺时间延长,MDP35 组及 MDP42 组大鼠视网膜神经节细胞层细胞排列紊乱,阳性细胞数目减少,与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过对新生 SD 大鼠行早期单侧眼缝合,成功建立单眼剥夺弱视模型,根据 Lyckman 等^[11]对视觉可塑性关键期的描述,选取了出生后 28,35,42d 3 个时间点,各时间点分别对应视觉发育可塑性关键期开始、高峰及终止。采用免疫印迹及免疫组织化学法观察 BDNF 及受体 TrkB 蛋白质在正常发育大鼠视觉关键期的动态表达,以及单眼剥夺对其表达的影响。研究结果显示,正常大鼠在出生后视觉发育关键期内,随年龄增长其视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达无明显变化,提示生理状态下的视觉发育过程对 BDNF 及受体 TrkB 无显著性影响。然而早期单眼剥夺后,我们发现模型组大鼠视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达立即呈现显著上升趋势,然而随着剥夺时间延长其表达剧烈下调,并持续至关键期终止时。单眼剥夺对 BDNF 及受体 TrkB 表达的影响基本一致。BDNF 是以一种视觉经验依赖的方式表达的,其活性主要依赖于视网膜所接受传入信息的调节。Bozzi 等^[12]提出,单眼剥夺可使视网膜传入电活动显著减少,从而调控神经元表达的某些因子,导致视皮层电活动的紊乱而引起弱视,BDNF 及受体 TrkB 在其中可能起到重要的作用,与我们的研究结果相一致。此外,有证据表明 BDNF 及受体 TrkB 在视觉皮层的活动依赖可塑性中具有重要作用^[13,14],它们不仅可调节 γ -氨基丁酸能的皮层环路成熟及突触可塑性过程,还能抑制眼优势柱的形成^[15]。

免疫组织化学法观察到的结果显示:BDNF 表达在视网膜神经节细胞层、内核层及外核层,其阳性表达细胞数量丰富,而 TrkB 受体仅表达在视网膜神经节细胞层。早期单眼剥夺可使视网膜神经节细胞层中 BDNF 及受体 TrkB 阳性表达的细胞数目显著增多,但随着视觉剥夺时间延长,两者的阳性细胞数目呈现逐渐减少的趋势。TrkB 是 BDNF 发挥作用的通路之一,它的表达在一定程度上反应了 BDNF 的活性,本实验中 TrkB 受体的表达趋势略滞后于 BDNF 的表达,BDNF 表达减弱后,TrkB 的表达有一个反应性增强的过程,以代偿 BDNF 表达减少的作用。

总之,本实验在一定程度上阐明了早期单眼剥夺后,视网膜中 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达的变化趋势,反映了 BDNF 及受体 TrkB 的表达呈现一定的视觉经验依赖

性,我们推测其可能参与了单眼剥夺弱视的发病,但具体机制如何,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Clandinin TR, Feldheim DA. Making a visual map: mechanisms and molecules. *Curr Opin Neurobiol* 2009;19(2):174-180
- 2 Huberman AD, Feller MB, Chapman B. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci* 2008;31:479-509
- 3 McLaughlin T, O'Leary DD. Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:327-355
- 4 Rashid T, Upton AL, Blentic A, et al. Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 2005;47(1):57-69
- 5 Marler KJ, Becker-Barroso E, Martinez A, et al. A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J Neurosci* 2008;28(48):12700-12712
- 6 Lim YS, McLaughlin T, Sung TC, et al. p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* 2008;59(5):746-758
- 7 Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361(1473):1545-1564
- 8 Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(4):299-309
- 9 Greenberg ME, Xu B, Lu B, et al. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* 2009;29(41):12764-12767
- 10 Maffei A, Nelson SB, Turrigiano GG. Selective reconfiguration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation. *Nat Neurosci* 2004;7(12):1353-1359
- 11 Lyckman AW, Hornig S, Leamey CA, et al. Gene expression patterns in visual cortex during the critical period: synaptic stabilization and reversal by visual deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(27):9409-9414
- 12 Bozzi Y, Pizzorusso T, Cremisi F, et al. Monocular deprivation decreases the expression of messenger RNA for brain-derived neurotrophic factor in the rat visual cortex. *J Neurosci* 1995;69(4):1133-1144
- 13 Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, et al. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(4):1267-1272
- 14 Keifer J, Sabirzhanov BE, Zheng Z, et al. Cleavage of proBDNF to BDNF by a tollid-like metalloproteinase is required for acquisition of *in vitro* eyeblink classical conditioning. *J Neurosci* 2009;29(47):14956-14964
- 15 Singh KK, Park KJ, Hong EJ, et al. Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration. *Nat Neurosci* 2008;11(6):649-658