

# 视神经夹持损伤模型大鼠视网膜和视神经小胶质细胞的活化

聂祖庆 张琼 曹霞

650101 昆明医科大学第二附属医院中心实验室

通信作者:曹霞,Email:1244815508@qq.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.12.002

**【摘要】** 背景 外伤性视神经病变(TON)是继发于外力创伤下的急性视神经损伤,预后较差。小胶质细胞作为中枢神经系统中重要的免疫细胞,参与了中枢神经系统疾病与多种眼科疾病的病理生理过程。然而,小胶质细胞在 TON 的病理发展及损伤修复过程中的作用尚不明确。目的 比较大鼠视神经夹持损伤后视神经与视网膜中小胶质细胞的形态变化、激活数量、分布情况及活化水平的差异。方法 将 35 只 SPF 级健康雌性成年 Sprague-Dawley (SD)大鼠按照随机数字表法分为正常对照组,造模后 6 h、3 d、7 d、14 d、30 d 组和假手术组,每组 5 只大鼠。造模后各时间点组用夹持钳以 50 g 的夹持力在大鼠眼球后约 2 mm 处钳夹视神经 10 s,建立大鼠视神经夹持模型,假手术组大鼠行相同的手术操作但不夹持视神经,正常对照组不做任何处理。分别于上述时间点制备大鼠视神经和视网膜冰冻切片,采用 lectin-FITC 荧光标记抗体检测各组大鼠视神经和视网膜中的小胶质细胞数量和激活的小胶质细胞数量。结果 正常对照组和假手术组大鼠视网膜中小胶质细胞主要位于内丛状层(IPL),少部分位于内核层(INL)和神经节细胞层(GCL),外核层(ONL)和外丛状层(OPL)未见小胶质细胞分布。正常对照组大鼠视网膜小胶质细胞的细胞体较小,以分支状为主,突触细长,可见二级分支。各模型组大鼠视网膜中小胶质细胞主要位于 GCL 和 IPL,小胶质细胞在 GCL 的数量明显多于假手术组,小胶质细胞多为阿米巴状,部分呈半激活态,少见分支静息态。正常对照组、假手术组及造模后 6 h、3 d、7 d、14 d 和 30 d 组大鼠视网膜中小胶质细胞数分别为  $6.40 \pm 1.52$ 、 $7.20 \pm 2.05$ 、 $12.00 \pm 3.54$ 、 $14.00 \pm 4.06$ 、 $18.00 \pm 4.36$ 、 $18.40 \pm 3.13$  和  $10.80 \pm 1.92$ ,造模后各时间点大鼠视网膜中小胶质细胞数量均明显多于正常对照组,造模后 30 d 小胶质细胞数量明显少于造模后 7 d 和 14 d 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );造模后 3、7 和 14 d 组大鼠视网膜中激活小胶质细胞数量明显多于假手术组,差异均有统计学意义( $P = 0.024$ 、 $0.009$ 、 $0.023$ )。正常对照组和假手术组大鼠视神经中小胶质细胞较小,呈棒状或分枝状,分布均匀且稀疏。造模后各时间点组小胶质细胞较假手术组细胞体积增大,呈阿米巴状并分布在视神经夹持部位。造模后 6 h、3 d、7 d、14 d 大鼠视神经中小胶质细胞数量明显多于正常对照组,差异均有统计学意义( $P = 0.007$ 、 $0.001$ 、 $0.003$ 、 $0.014$ )。造模后 30 d 大鼠视神经中小胶质细胞数量明显少于造模后 3 d、7 d 和 14 d 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。造模后 6 h、3 d 和 7 d 组大鼠视神经中活化小胶质细胞数量明显多于假手术组,差异有统计学意义( $P = 0.005$ 、 $0.004$ 、 $0.030$ ),造模后 14 d、30 d 大鼠视神经中活化的小胶质细胞数量较造模后 3 d 组明显减少,差异均有统计学意义( $P = 0.021$ 、 $0.004$ ),造模后 6 h 组视神经中激活态小胶质细胞增加并持续到造模后 14 d。结论 大鼠视神经夹持损伤后一定时间内视网膜及视神经中小胶质细胞增加并活化,视神经中小胶质细胞的活化及其衰减均早于视网膜,视神经中小胶质细胞活化程度更明显。

**【关键词】** 视神经; 损伤; 视网膜; 小胶质细胞; 激活

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31160206); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2015HB041); 云南省教育厅科学研究基金项目(2014Z062)

**Activation of retinal and optic nerve microglia following optic nerve crush in rats** Nie Zuqing, Zhang Qiong, Cao Xia

Department of Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China

Corresponding author: Cao Xia, Email: 1244815508@qq.com

**【Abstract】** **Background** Traumatic optic neuropathy (TON) is an acute injury of the optic nerve secondary to trauma. As an important immune cell, microglia is involved in a variety of pathologic changes in central nervous system diseases and eye diseases. However, the role of microglia in the lesion development and neural restoration in

TON is still unclear. **Objective** This study was to compare the differences of microglial activation between optic nerve axon and retina after optic nerve crush injury, including the morphological changes, number, and distribution of microglia. **Methods** Thirty-five SPF female Sprague-Dawley (SD) rats were numbered from 1 to 35 and randomized into normal control group, sham operation group and modeling 6-hour group, modeling 3-day group, modeling 7-day group, modeling 14-day group and modeling 30-day group according to the random number table. Optic nerve injury models were established by crushing optic nerve at retrobulbar 2 mm for 10 seconds. The same operation was carried out but not clamping optic nerve in the sham operation group, and normal control group without any treatment. The morphological changes, number and distribution of microglia in retina and optic nerve axon were assayed and compared by immunofluorescence staining with lectin-FITC fluorescence labeled antibody detection. The use and care of the experimental animals complied with ARVO. **Results** Microglia were displayed mainly in inner plexiform layer (IPL), and a few of microglia were in inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer (GCL), not any microglia were seen in outer nuclear layer (ONL) and outer plexiform layer (OPL) in the normal control group and sham operation group. Thinning synapsis and secondary branches were seen with the dendroid in shape in normal control group. In the model groups, the microglia were more in GCL compared with sham operation group and showed amoeboid microglial cells. The number of microglia in retinas was  $6.40 \pm 1.52$ ,  $7.20 \pm 2.05$ ,  $12.00 \pm 3.54$ ,  $14.00 \pm 4.06$ ,  $18.00 \pm 4.36$ ,  $18.40 \pm 3.13$  and  $10.80 \pm 1.92$  in the normal control group, sham operation group, modeling 6-hour group, modeling 3-day group, modeling 7-day group, modeling 14-day group and modeling 30-day group, respectively, and the microglia number were significantly increased in modeling 6-hour group, modeling 3-day group, modeling 7-day group, modeling 14-day group and modeling 30-day group in comparison with the normal control group, and in the modeling 30-day group, the microglial number in retinas was significantly reduced in comparison with the modeling 7-day group and modeling 14-day group (all at  $P < 0.05$ ). The activated microglia in the retinas were much more in the modeling 3-day group, modeling 7-day group and modeling 14-day group than that in the sham operation group ( $P = 0.024, 0.009, 0.023$ ). In the optic nerve, the microglial cells were small in size and sparse in arrangement in the normal control group and sham operation group. The cells were enlarged with the amoeboid-like in shape in the model groups and distributed in injury area. The cell number was significantly higher in the modeling 6-hour group, modeling 3-day group, modeling 7-day group and modeling 14-day group than that in the normal control group ( $P = 0.007, 0.001, 0.003, 0.014$ ). The cell number in modeling 30-day group was significantly reduced in comparison with the modeling 3-day group, modeling 7-day group and modeling 14-day group (all at  $P < 0.05$ ). The activated microglial number were significantly elevated in the modeling 6-hour group, modeling 3-day group, modeling 7-day group compared with the sham operation group ( $P = 0.005, 0.004, 0.030$ ), and the cell number in the modeling 30-day group was evidently lower than that in the modeling 3-day group ( $P = 0.021, 0.004$ ). The cells of activated state in the optic nerve were significantly increased in modeling 6-hour group and modeling 14-day group.

**Conclusions** Microglia are activated and keep increasing number in retina and optic nerve at a certain period after optic nerve injury, and these changes are earlier and more distinct in optic nerve axon than those in retina.

[Key words] Optic nerve/injury; Retina; Microglia; Activation

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (31160206); Yunnan Province Youth Academic Leader Reserve Personnel Training Program (2015HB041); Yunnan Education Department Scientific Research Fund Project (2014Z062)

视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 是视网膜中一种重要的视觉功能细胞, RGCs 损伤往往导致视功能障碍。外伤性视神经病变 (traumatic optic neuropathy, TON) 包括原发性损伤和继发性损伤, 原发性 TON 损伤的病理机制主要是视神经受到机械力量的牵拉, 造成视神经轴突的挫伤继而导致视神经元坏死; 继发性 TON 损伤则常继发于原发性 TON 损伤, 主要表现为 RGCs 的缓慢持续性死亡, 其可能的因素有炎性因子、氧自由基、营养因子剥夺及微环境改变介导的细胞凋亡等<sup>[1]</sup>。小胶质细胞是中枢神经中重要

的免疫细胞, 并具有多种效应功能<sup>[2-3]</sup>。在青光眼、糖尿病视网膜病变及缺血-再灌注等病变过程中, 视网膜小胶质细胞出现活化并参与病理生理过程。在外伤性视神经损伤中, 小胶质细胞在视网膜中被活化及其毒性损伤已有报道, 但目前小胶质细胞在视神经中与在视网膜中的激活情况是否存在差异鲜有报道。本研究建立大鼠视神经夹持损伤动物模型, 检测模型大鼠视神经和视网膜中小胶质细胞形态变化、激活数量、分布情况以及活化水平, 比较视神经与视网膜中小胶质细胞在视神经夹持损伤病理过程中激活情况的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** SPF 级健康、雌性成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 35 只, 体质量 180 ~ 220 g, 由昆明医科大学实验动物中心提供, 动物实验环境许可证号: SYXK(滇)k2015-0002。标准环境下饲养, 保证昼夜节律, 自由饮食。将 SD 大鼠按照随机数字表法分为正常对照组, 造模后 6 h、3 d、7 d、14 d、30 d 组和假手术组, 每个组 5 只大鼠。实验动物的喂养及使用遵循 ARVO 中关于动物使用的声明。本研究经昆明医科大学实验动物伦理委员会审核批准(批文号: KMMU2013017)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** TBS 缓冲液(0.01 mmol/L, pH=7.4)(自行配制); 山羊封闭血清、lectin-FITC(美国 Sigma 公司); 含 DAPI 抗荧光淬灭封片剂(美国 Vector 公司)。BX51 荧光显微镜、DP73 显微镜、cellSens Standard 阅图软件(日本 Olympus 公司); 载玻片(江苏世泰实验器材有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 视神经夹持模型的建立** 手术组大鼠用碘伏消毒尾静脉, 用质量分数 10% 水合氯醛按 0.5 ml/100 g 行尾静脉注射(约 1.0 ml/只)。待大鼠角膜反射消失、仰卧位无法自行转体、呼吸深慢时即为麻醉成功。大鼠取右侧卧位(露左眼)置于手术台上, 左眼用盐酸奥布卡因滴眼液点眼 2 ~ 3 滴行表面麻醉。解剖显微镜下剪开左眼外眦约 2 mm, 环形剪开左眼球结膜, 避开大血管, 向后钝性分离外直肌, 提起球结膜向前稍牵拉眼球, 暴露视神经 3 ~ 4 mm, 用夹持钳在球后约 2 mm 处以 50 g 的夹持力钳夹视神经 10 s, 避免损伤血管, 制成视神经钳夹伤模型。假手术组大鼠左眼分离视神经后不进行夹持。手术组和假手术组大鼠右眼均不做处理, 正常对照组大鼠不做任何处理。分别于造模后 6 h、3 d、7 d、14 d 及 30 d 在各组大鼠尾静脉注射 10% 水合氯醛麻醉, 将大鼠仰卧位固定, 打开胸腔, 左心室插入灌注针, 用质量分数 4% 多聚甲醛充分灌注, 然后摘除左侧眼球并分离出视神经, 立即行冰冻切片。

**1.2.2 免疫荧光法检测小胶质细胞的分布** TBS 缓冲液清洗冰冻切片 3 次, 每次 3 min。在冰冻切片上滴加体积分数 5% 山羊血清, 封闭 1 h。TBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 3 min, 加入直标抗体 lectin-FITC(稀释浓度为 1:500)抗体, 4 °C 冰箱过夜孵育。复温后 TBS 清洗 3 次, 每次 3 min, 用抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下观察 lectin-FITC 阳性细胞形态及分布。用 Image-

Pro Plus 图像分析软件分析各组大鼠视神经与视网膜中 lectin-FITC 阳性细胞, 任意选取每张视神经切片远夹持区、夹持区、近夹持区 3 个视野, 计数 3 个视野中阳性细胞的数量; 然后每张视网膜切片选取远视盘区、视盘区、近视盘区 3 个视野, 计数 3 个视野中阳性细胞的数量。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间的样本均数经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组单因素干预多水平研究设计, 正常对照组、假手术组及造模后 6 h、3 d、7 d、14 d 和 30 d 组大鼠视网膜和视神经中小胶质细胞和活化小胶质细胞数量的总体差异比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠视网膜中小胶质细胞的分布及活化情况

正常对照组、假手术组大鼠视网膜中小胶质细胞主要位于内丛状层(inner plexiform layer, IPL), 少部分位于内核层(inner nuclear layer, INL) 和神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL), 外核层(outer nuclear layer, ONL) 和外丛状层(outer plexiform layer, OPL) 未见小胶质细胞。小胶质细胞的细胞体较小, 多以分支状小胶质细胞为主, 突触细长, 可见二级分支。正常对照组大鼠视网膜中未见明显活化的小胶质细胞(图 1A), 假手术组大鼠视网膜中偶见活化的阿米巴状小胶质细胞(图 1B)。造模后 6 h 组与正常对照组和假手术组大鼠视网膜中小胶质细胞在形态、分布、活化状态方面均无明显差异(图 1C); 造模后 3 d, GCL 小胶质细胞数量增多, INL 中也可见到小胶质细胞分布, 部分小胶质细胞形态发生明显变化, 小胶质细胞胞体变圆, 突触消失, 呈阿米巴样, 处于激活态; 部分小胶质细胞胞体细长, 突触变粗变短, 无二级分支, 呈半激活状态, 但仍可见部分胞体小, 分支细长的双极或多极静息态小胶质细胞(图 1D)。造模后 7 d 组小胶质细胞主要位于 GCL 和 IPL, GCL 小胶质细胞较假手术组数量明显增多, 多为激活状态的阿米巴状小胶质细胞, 也有呈半激活态者(突触变粗变短, 无二级分支), 少见分支较细的静息态小胶质细胞(图 1E)。造模后 14 d 组大鼠视网膜中仍可见较多的阿米巴状小胶质细胞或分支状小胶质细胞, 主要分布在 GCL 和 IPL(图 1F)。造模后 30 d 组大鼠视网膜中小胶质细胞多为分支状, 分布稀



疏,少数出现在 INL(图 1G)。

### 2.2 各组大鼠视神经中小胶质细胞活化情况

正常对照组和假手术组大鼠视神经可见较小的小胶质细胞,呈棒状或分枝状,分布均匀且稀疏(图 2A, B)。造模后 6 h 组小胶质细胞数量稍增多,但分布稀疏(图 2C)。造模后 3 d 组和造模后 7 d 组小胶质细胞较正常对照组、假手术组和造模后 6 h 组体积增大,细

胞呈阿米巴状,多分布于近视神经夹持部位(图 2D, E)。造模后 14 d 组大鼠视神经中小胶质细胞数量较假手术组及造模后 6 h、3 d 和 7 d 组减少,细胞仍多呈阿米巴状和分枝状,多分布于近视神经夹持部位(图 2F)。造模后 30 d 组较造模后 6 h、3 d、7 d 和 14 d 组数量减少,阿米巴状小胶质细胞数量下降,棒状及分枝状细胞分布均匀(图 2G)。

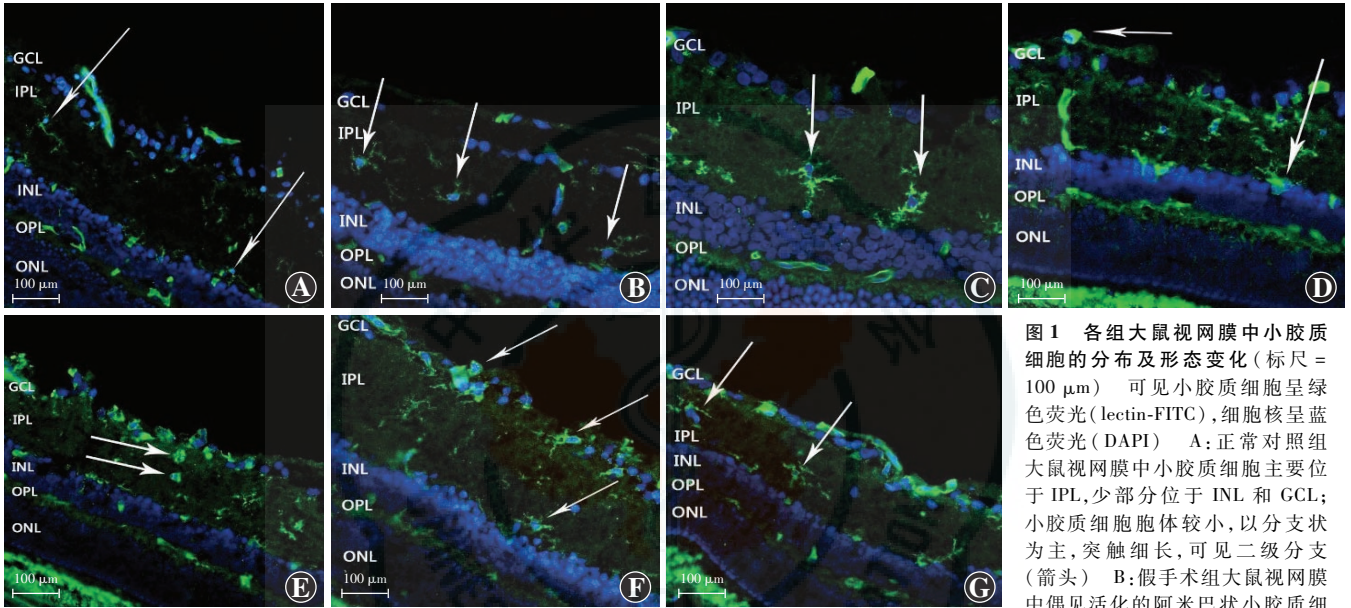


图 1 各组大鼠视网膜中小胶质细胞的分布及形态变化(标尺 = 100 μm) 可见小胶质细胞呈绿色荧光(lectin-FITC),细胞核呈蓝色荧光(DAPI) A:正常对照组大鼠视网膜中小胶质细胞主要位于 IPL,少部分位于 INL 和 GCL;小胶质细胞胞体较小,以分枝状为主,突触细长,可见二级分支(箭头) B:假手术组大鼠视网膜中偶见活化的阿米巴状小胶质细胞(箭头) C:造模后 6 h 组视网膜中小胶质细胞形态与假手术组接近(箭头) D:造模后 3 d 组大鼠 GCL 小胶质细胞数量增加,部分细胞变圆或变长,突触变粗或消失(箭头) E:造模后 7 d 组小胶质细胞主要位于 GCL 和 IPL,多为阿米巴样(箭头) F:造模后 14 d 组大鼠视网膜中可见较多的阿米巴样小胶质细胞或分枝状小胶质细胞,主要分布在 GCL 和 IPL(箭头) G:造模后 30 d 组大鼠视网膜中小胶质细胞多为分枝状,分布稀疏,少数出现在 INL(箭头) GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层

胞(箭头) C:造模后 6 h 组视网膜中小胶质细胞形态与假手术组接近(箭头) D:造模后 3 d 组大鼠 GCL 小胶质细胞数量增加,部分细胞变圆或变长,突触变粗或消失(箭头) E:造模后 7 d 组小胶质细胞主要位于 GCL 和 IPL,多为阿米巴样(箭头) F:造模后 14 d 组大鼠视网膜中可见较多的阿米巴样小胶质细胞或分枝状小胶质细胞,主要分布在 GCL 和 IPL(箭头) G:造模后 30 d 组大鼠视网膜中小胶质细胞多为分枝状,分布稀疏,少数出现在 INL(箭头) GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层

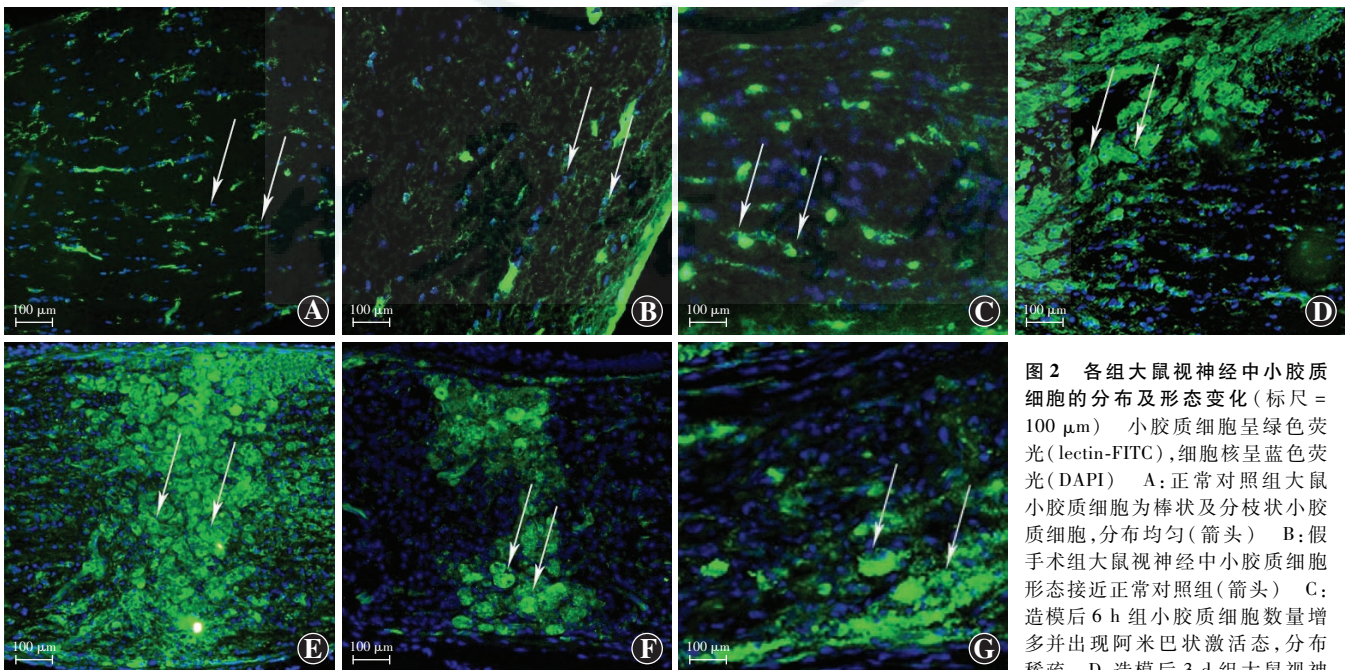


图 2 各组大鼠视神经中小胶质细胞的分布及形态变化(标尺 = 100 μm) 小胶质细胞呈绿色荧光(lectin-FITC),细胞核呈蓝色荧光(DAPI) A:正常对照组大鼠小胶质细胞为棒状及分枝状小胶质细胞,分布均匀(箭头) B:假手术组大鼠视神经中小胶质细胞形态接近正常对照组(箭头) C:造模后 6 h 组小胶质细胞数量增多并出现阿米巴状激活态,分布稀疏 D:造模后 3 d 组大鼠视神经中激活态的小胶质细胞分布于近视神经夹持部位,体积增大,呈阿米巴状(箭头) E:造模后 7 d 组大鼠视神经中激活态的小胶质细胞分布于近视神经夹持部位,数量增多,呈阿米巴状(箭头);造模后 14 d 组大鼠视神经中激活态的小胶质细胞数量减少,多分布于近视神经夹持部位(箭头) F:造模后 30 d 组大鼠视神经中小胶质细胞数量进一步减少,阿米巴状小胶质细胞减少(箭头)

胞(箭头) E:造模后 7 d 组大鼠视神经中激活态的小胶质细胞分布于近视神经夹持部位,数量增多,呈阿米巴状(箭头);造模后 14 d 组大鼠视神经中激活态的小胶质细胞数量减少,多分布于近视神经夹持部位(箭头) F:造模后 30 d 组大鼠视神经中小胶质细胞数量进一步减少,阿米巴状小胶质细胞减少(箭头)

### 2.3 各组大鼠视网膜中小胶质细胞计数的比较

正常对照组、假手术组及造模后各时间点小胶质细胞数量的总体比较差异有统计学意义 ( $F = 11.600, P < 0.001$ ), 造模组大鼠小胶质细胞数量从术后 6 h 起开始逐渐升高, 造模后 6 h、3 d、7 d、14 d 和 30 d 组大鼠视网膜中小胶质细胞数量均明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.010、0.008、0.004、0.001、0.007$ )。造模后 7 d 组和造模后 14 d 组大鼠视网膜中小胶质细胞数量较造模后 6 h 组明显升高, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.034、0.008$ ); 造模后 30 d 组大鼠视网膜中小胶质细胞数量明显低于造模后 7 d 组和造模后 14 d 组, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.019、0.006$ )。假手术组和造模后各时间点的激活态小胶质细胞数量的总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 7.580, P < 0.001$ ), 造模后 6 h 组大鼠视网膜中活化小胶质细胞数量升高, 造模后 3 d 组、7 d 组和 14 d 组大鼠视网膜中活化小胶质细胞数量显著增加, 与假手术组比较差异均有统计学意义 ( $P = 0.024、0.009、0.023$ ), 造模后 6 h 组和 30 d 组大鼠视网膜中活化小胶质细胞数量与假手术组比较差异均无统计学意义 ( $P = 0.136、0.374$ ); 造模后 14 d 组大鼠视网膜中活化小胶质细胞数量较造模后 6 h 组和 3 d 组明显上升, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.007、0.007$ ); 造模后 30 d 组活化小胶质细胞数量较造模后 3 d 组和造模后 7 d 组明显下降, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.005、0.002$ ) (表 1)。

**表 1 各组大鼠视网膜中小胶质细胞数量及活化小胶质细胞数量的比较 ( $\bar{x} \pm s, /3$  个视野)**

组别	样本量	小胶质细胞数量	活化小胶质细胞数
正常对照组	5	6.40±1.52	0
假手术组	5	7.20±2.05	0.40±0.55
造模后 6 h 组	5	12.00±3.54 <sup>a</sup>	2.80±2.39
造模后 3 d 组	5	14.00±4.06 <sup>a</sup>	2.80±1.30 <sup>b</sup>
造模后 7 d 组	5	18.00±4.36 <sup>ac</sup>	6.20±2.68 <sup>b</sup>
造模后 14 d 组	5	18.40±3.13 <sup>ac</sup>	5.80±3.08 <sup>bcd</sup>
造模后 30 d 组	5	10.80±1.92 <sup>acf</sup>	0.60±0.54 <sup>de</sup>
<i>F</i> 值		11.600	7.580
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与假手术组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与造模后 6 h 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与造模后 3 d 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与造模后 7 d 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ ; 与造模后 14 d 组比较, <sup>f</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

### 2.4 各组大鼠视神经中小胶质细胞计数的比较

正常对照组、假手术组与造模后各时间点组大鼠视神经中小胶质细胞数量总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 31.700, P < 0.001$ ), 造模后 6 h 组大鼠视神经中

小胶质细胞数量开始升高, 造模后 6 h 组、3 d 组、7 d 组和 14 d 组大鼠视神经中小胶质细胞数量明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.007、0.001、0.003、0.014$ ), 造模后 30 d 组大鼠视神经中小胶质细胞数量与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.088$ )。造模后 3 d 组、7 d 组和 14 d 组大鼠视神经中小胶质细胞数量较造模后 6 h 组明显升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.001, P < 0.001, P = 0.005$ ), 造模后 30 d 组大鼠视神经中小胶质细胞数量与造模后 3 d 组、7 d 组和 14 d 组比较明显下降, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.011、0.017、0.043$ )。假手术组和造模后各时间点大鼠视神经中激活态小胶质细胞数量总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 16.300, P < 0.001$ ), 造模后 6 h 组、3 d 组和 7 d 组大鼠视神经中活化小胶质细胞数量均明显高于假手术组, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.005、0.004、0.030$ ), 造模后 14 d 组和 30 d 组与假手术组间大鼠视神经中活化小胶质细胞数量的差异均无统计学意义 ( $P = 0.066、0.368$ ); 造模 3 d 组和造模后 7 d 组大鼠视神经中活化小胶质细胞数量明显高于造模后 6 h 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.001, P = 0.011$ ); 造模后 14 d 组和 30 d 组大鼠视神经中活化小胶质细胞数量明显低于造模后 3 d 组和 7 d 组, 差异均有统计学意义 (与造模后 3 d 组比较:  $P = 0.021、0.004$ ; 与造模后 7 d 组比较:  $P = 0.005、0.036$ ) (表 2)。

**表 2 各组大鼠视神经中小胶质细胞数量及活化小胶质细胞数量比较 ( $\bar{x} \pm s, /3$  个视野)**

组别	样本量	小胶质细胞数量	活化小胶质细胞数
正常对照组	5	11.33±0.58	0
假手术组	5	12.33±3.21	0.33±0.58
造模后 6 h 组	5	29.33±2.52 <sup>a</sup>	5.00±0.58 <sup>b</sup>
造模后 3 d 组	5	63.67±3.21 <sup>ac</sup>	23.00±1.16 <sup>bc</sup>
造模后 7 d 组	5	63.67±5.69 <sup>ac</sup>	28.33±4.98 <sup>bc</sup>
造模后 14 d 组	5	59.00±10.54 <sup>ac</sup>	13.33±3.38 <sup>de</sup>
造模后 30 d 组	5	30.33±10.16 <sup>def</sup>	4.00±3.00 <sup>de</sup>
<i>F</i> 值		31.700	16.300
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与假手术组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与造模后 6 h 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与造模后 3 d 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与造模后 7 d 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ ; 与造模后 14 d 组比较, <sup>f</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

### 3 讨论

小胶质细胞是健康或病变的中枢神经系统中具有传感器功能和多种效应功能的细胞<sup>[2]</sup>, 约占大脑细胞总数的 10%, 是中枢神经系统中重要的免疫细胞<sup>[3]</sup>, 而视神经是中枢神经系统的重要组成部分。研究表



明,当视神经由于外伤、肿瘤、高眼压、缺血等因素引起损伤时,免疫细胞及相关细胞因子均参与损伤后炎症反应及修复过程,而小胶质细胞在这个过程中起着重要作用<sup>[4]</sup>。传统的形态学分类方法将小胶质细胞分为两类:正常小胶质细胞突起呈放射状或分支状,为静息态小胶质细胞,其在维持视网膜微环境稳态中有重要意义<sup>[5]</sup>;中枢神经系统受到损伤后小胶质细胞呈阿米巴样,为激活态小胶质细胞,具有吞噬和释放多种细胞因子的功能<sup>[6]</sup>。近期研究发现小胶质细胞亦有棒状的形态,这与本研究观察到的小胶质细胞形态相似,可能是衰老退化的小胶质细胞<sup>[7]</sup>。研究证实,视神经损伤可激活局部固有的小胶质细胞,引起其增生并缓慢向巨噬细胞转化<sup>[8]</sup>,与 RGCs 退化和凋亡及细胞碎片的清除有密切关系<sup>[9-10]</sup>。

本研究中观察了大鼠视神经夹持损伤后不同时间点视神经和视网膜中小胶质细胞数量、活化程度及分布变化。Lectin 是小胶质细胞的标志物<sup>[11-13]</sup>,本研究中采用 lectin-FITC 荧光标记小胶质细胞,发现正常对照组和假手术组大鼠视神经和视网膜中小胶质细胞数量不多,且基本呈分支状的静息态,但在视神经夹持损伤后 6 h,视神经钳夹部位激活的小胶质细胞数量明显增多,而视网膜中的活化小胶质细胞在视神经钳夹 3 d 后才增加,且视神经较视网膜中激活态的小胶质细胞数量多,说明视神经损伤后视神经较视网膜中小胶质细胞的激活时间早,且激活程度更强,这与 Fitzgerald 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。目前认为视神经损伤后小胶质细胞的增生机制可能与小胶质细胞接收到损伤信号在原位增生或血-视网膜屏障受到破坏导致外周血中循环的单核细胞趋化进入损伤部位并转化为激活的小胶质细胞有关<sup>[15-17]</sup>。因此认为视神经与视网膜小胶质细胞激活时间及程度存在差异可能源于以下原因:(1)血-视神经屏障和血-视网膜屏障 视神经由 RGCs 的轴突汇集而成,视神经的钳夹直接导致 RGCs 轴突的机械性损伤,导致 RGCs 轴突的回缩、变性、髓鞘丢失以及大量的星形胶质细胞死亡,从而激活原位小胶质细胞,吞噬细胞碎片,分泌炎症因子,如肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素  $1\beta$ <sup>[13]</sup>。机械损伤也使视神经结构和血管内皮受到损伤,导致血-视神经屏障破坏,外周血中循环的单核细胞受到趋化进入损伤部位并转化为激活的小胶质细胞,后者作为抗原递呈细胞引起特异性免疫应答<sup>[18]</sup>,使得外周血中的免疫效应物质,如致敏 T 细胞、抗体等进入视神经,引起剧烈的视神经炎症反应。完整的血-视网膜屏障是视网膜小胶质细胞激活相对滞后的可能原因<sup>[19]</sup>,因为不同于缺血-

再灌注损伤或糖尿病视网膜病变,夹持损伤模型中夹持视神经时避开了视神经腹侧的视网膜中央静脉,未影响视网膜供血,避免了缺血、缺氧造成的视网膜毛细血管内皮损害,所以早期并不直接破坏屏障,外周血中的单核/巨噬细胞很难进入视网膜中,此外 RGCs 胞体的损伤晚于轴突的直接损伤,仅靠原位增生的小胶质细胞参与免疫反应视网膜中的小胶质细胞数量少于视神经,且激活时间晚于视神经。也有文献报道在视神经切断后视网膜内增多的活化小胶质细胞尚不足以破坏血-视网膜屏障,血-视网膜屏障的功能性完整得以维持<sup>[20]</sup>。(2)轴突损伤变性后引起 RGCs 二次损伤或者继发性损伤 主要表现为没有或只是部分受到原发损害影响的神经元和神经胶质细胞死亡。继发变性由受损组织释放的病理因子所引发,如钙失调、过量的自由基和蛋白酶的活化及促凋亡蛋白水解酶和谷氨酸的过度表达等,并通过细胞凋亡、坏死、自噬、氧化应激、兴奋性毒性等方式引起 RGCs 进一步死亡<sup>[21]</sup>,RGCs 发生二次损伤的过程长于原发损伤过程。近期的研究表明,小胶质细胞不仅会吞噬死亡的神经元,也会吞噬那些功能失调的神经元,在二次损伤过程中,功能失调的 RGCs 逐渐增多,死亡的 RGCs 也会逐渐增多,所以视网膜激活的小胶质细胞会在夹持后一段时间内持续存在,而视神经的小胶质细胞中无此现象<sup>[22-23]</sup>。

TON 是常见的视神经损伤,本研究在大鼠视神经夹持损伤模型中观察了小胶质细胞在视神经和视网膜中的数量变化、活化程度和分布情况,发现小胶质细胞在视神经与视网膜中的小胶质细胞改变具有差异性。造成这些差异的机制非常复杂,小胶质细胞的活化对神经元是起保护作用还是损伤作用,以及这些差异能否为药物治疗的时间和给药方式提供指导依然值得我们进一步研究。

## 参考文献

- [1] Li HY, Ruan YW, Ren CR, et al. Mechanisms of secondary degeneration after partial optic nerve transection [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(6): 565-574. DOI:10.4103/1673-5374.130093.
- [2] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11): 1387-1394. DOI:10.1038/nn1997.
- [3] Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, et al. The role of microglia in the healthy brain [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(45): 16064-16069. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011.
- [4] Kaur C, Rathnasamy G, Ling EA. Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(1): 66-78. DOI:10.1007/s11481-012-9347-2.
- [5] Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper [J]. *Neuron*, 2013, 77(1): 10-18. DOI:10.1016/j.neuron.2012.12.023.
- [6] Benarroch EE. Microglia: multiple roles in surveillance, circuit shaping,

- and response to injury [J]. *Neurology*, 2013, 81 (12) : 1079-1088. DOI:10.1212/WNL.0b013e3182a4a577.
- [7] Taylor SE, Morganti-Kossmann C, Lifshitz J, et al. Rod microglia: a morphological definition [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9 (5) : e97096 [2016-04-27]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0097096>. DOI:10.1371/journal.pone.0097096.
- [8] Bendszus M, Stoll G. Caught in the act; *in vivo* mapping of macrophage infiltration in nerve injury by magnetic resonance imaging [J]. *J Neurosci*, 2003, 23 (34) : 10892-10896.
- [9] Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85 (3) : 352-370. DOI:10.1189/jlb.0608385.
- [10] 焦晓玲, 彭媛, 杨柳. 米诺环素在小鼠视神经钳夹伤后早期对视网膜神经节细胞的保护作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32 (4) : 303-307. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.004.
- Jiao XL, Peng Y, Yang L. Neuroprotective effects of minocycline on retinal ganglion cells in early stage of optic nerve crush injury [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32 (4) : 303-307. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.004.
- [11] Chen L, Yang P, Kijlstra A. Distribution, markers, and functions of retinal microglia [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2002, 10 (1) : 27-39.
- [12] Sivakumar V, Foulds WS, Luu CD, et al. Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina [J]. *J Pathol*, 2011, 224 (2) : 245-260. DOI:10.1002/path.2858.
- [13] Fang M, Yuan Y, Rangarajan P, et al. Scutellarin regulates microglia-mediated TNF1 astrocytic reaction and astrogliosis in cerebral ischemia in the adult rats [J/OL]. *BMC Neurosci*, 2015, 16 : 84 [2016-04-27]. <https://bmcbiochem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12868-015-0219-6>. DOI:10.1186/s12868-015-0219-6.
- [14] Fitzgerald M, Bartlett CA, Harvey AR, et al. Early events of secondary degeneration after partial optic nerve transection: an immunohistochemical study [J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27 (2) : 439-452. DOI:10.1089/neu.2009.1112.
- [15] Panagis L, Thanos S, Fischer D, et al. Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21 (8) : 2305-2309. DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04046.x.
- [16] Yuan TF, Liang YX, Peng B, et al. Local proliferation is the main source of rod microglia after optic nerve transection [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5 : 10788 [2016-04-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649910/>. DOI:10.1038/srep10788.
- [17] Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, et al. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49 (9) : 4162-4168. DOI:10.1167/iov.08-1738.
- [18] Wierzbicka-Bobrowicz T, Schmidt-Sidor B, Gwiazda E, et al. Major histocompatibility complex class II expression in the frontal and temporal lobes in the human fetus during development [J]. *Folia Neuropathol*, 2000, 38 (2) : 73-77.
- [19] Campbell M, Humphries P. *The blood-retina barrier* [M]. New York: Springer, 2013 : 70-84.
- [20] 侯冰, 邝芳, 刘惠玲, 等. 视神经切断激活小胶质细胞后血-视网膜屏障的功能状态 [J]. *眼科研究*, 2004, 22 (1) : 63-66.
- Hou B, Kuang F, Liu HL, et al. The effect of microglial cell activation induced by optic nerve transection on functional integrity of blood-retinal barrier [J]. *Chin Ophthal Res*, 2004, 22 (1) : 63-66.
- [21] Farkas O, Povlishock JT. Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage [J]. *Prog Brain Res*, 2007, 161 : 43-59. DOI:10.1016/S0079-6123(06)61004-2.
- [22] Fourgeaud L, Través PG, Tufail Y, et al. TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology [J]. *Nature*, 2016, 532 (7598) : 240-244. DOI:10.1038/nature17630.
- [23] Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15 (4) : 209-216. DOI:10.1038/nrn3710.

(收稿日期:2017-04-24 修回日期:2017-11-02)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)

读者·作者·编者

## 本刊投稿方式

投稿请登录中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>), 登录后点击“业务中心”, 经中华医学会远程稿件处理系统 (<http://www.cma.org.cn/ywzx/index.html>) 或中华医学会杂志社网站 (<http://www.medline.org.cn/>), 根据提示进行注册后投稿。投稿时请使用 Word 格式 (.doc 文件类型), 投稿后请注意自留原稿, 并保留论文相关的原始资料, 以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”, 填写有关项目并请每位作者亲笔签字, 加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中署名的相一致, 如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意: (1) 在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2) 作者须告知与该研究有关的利益冲突, 如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

## 本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省立眼科医院 河南省眼科研究所承办的眼科专业学术期刊, 月刊, 每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果, 主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等, 学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章, 欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

(本刊编辑部)