

【实验研究】

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在遗传性视网膜变性小鼠视网膜内的表达[△]

A contrastive research on bFGF expression in retinas of rd mouse and C57BL mouse

[Key words] basic fibroblast growth factor; retinal degeneration; ganglion cell

[Abstract] Objective To compare the expressions of basic fibroblast growth factor (bFGF) in retinas of *rd* mouse (the experiments) and C57BL mouse (the controls) of five different postnatal ages, analyze the similarities and differences of bFGF expressions, and conclude the role of bFGF during the key period that retinas developed or degenerated. **Methods** Eight *rd* mice and eight C57BL mice of postnatal 0 week, 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks (PN 0, 1, 2, 3, 4 W) were chosen stochastically and executed immediately, their eyeballs were excavated and made into the retinal slices, then the bFGF contents in the retinas were analyzed by immunohistochemical method, photomicroscope and semi-quantitative analysis. **Results** Change characteristic of the curve of bFGF contents in retina of *rd* mice was similar to that of C57BL mice. Both curves began to fall after born, which reached each low level at PN-1W and then rose until reaching each peak at PN-2W, at which ten layer structures of retinas in both groups were formed. Then both curves began the second fall till PN-4W. During the last two weeks, retinas of C57BL mice degenerated rapidly while retinas of *rd* mice continued to mature. For all the five postnatal weeks, the bFGF contents in retinas of *rd* mice were lower than those of C57BL mice evidently. All statistical analysis of the difference have made sense distinctly ($P < 0.01$). **Conclusion** bFGF may play a protective role in the developing to maturation and sustaining of retinal structure, and the higher expression of bFGF content may prevent retinal degeneration in some extent.

【中图分类号】 R774.1

【关键词】 碱性成纤维细胞生长因子;视网膜变性;神经节细胞

【摘要】 目的 比较碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在出生后五个不同周龄的rd小鼠(病变组,遗传性视网膜变性小鼠)和C57BL小鼠(正常对照组)视网膜内的表达,分析小鼠视网膜发育成熟或变性的过程中bFGF表达的异同及变化特点,进而推测bFGF在视网膜神经细胞发育分化或退变中可能的作用。方法 随机选取出生后0.1、2、3、4周龄的病变组小鼠和正常对照组小鼠各8只即刻处死,摘除眼球制作视网膜切片,应用免疫组织化学法和光学显微镜法及半定量分析法对视网膜内bFGF的表达量进行测定。结果 两组小鼠出生后4周内的bFGF含量曲线特点基本相同:均在出生后开始下降,至出生后1周龄时达到低谷;随后开始上升,至出生后2周龄时达到高峰,此时两组小鼠视网膜的十层结构均基本形成;2周龄后开始二次下降,直至出生后4周龄,在此期间,病变组小鼠的视网膜迅速退变,而正常对照组小鼠的视网膜继续发育成熟。在出生后0~4周各周龄,bFGF在病变组小鼠视网膜内的表达量均明显低于同龄正常对照组小鼠视网膜内的表达量,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 bFGF可能在视网膜神经细胞的分化成熟和形态维持中起一定的保护作用,而视网膜内bFGF处于较高表达水平可能在一定程度上能防止其退变凋亡。

Responsible author: LI Gen-Lin; E-mail: ligenglin @ 263. net; ORCID: 0000-0002-4641-4386

视网膜色素变性是以夜盲、视野缩小、眼底骨细胞样色素沉着和光感受器功能不良为特征的进行性遗传性眼病。究其发病因素, SATARIAN 等^[1]研究发现细胞因子的作用较为突出, 其中碱性成纤维细

胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)一直被研究者所关注。一些研究发现, bFGF 可以促进感光细胞变性后的再生, 增强感光细胞损伤后的修复^[2-3]。而对于 bFGF 在视网膜色素变性小鼠组织内

表达的异同和变化规律目前尚没有较多相关研究, 本文就此进行对比分析, 以期对视网膜变性类疾病的诊治提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及其相关处理 随机取出生后刚满0、1、2、3、4周龄的C57BL小鼠(正常对照组)和rd小鼠(病变组, 遗传性视网膜变性小鼠)(两组小鼠均为首都医科大学实验动物中心提供)各8只处死, 完整摘出其双侧眼球(尽量保留其视神经, 作为眼位的标志); 将眼球即刻放入0.5 mL EP管: EP管事先做好标记, 盛入包埋剂(O. C. T复合物, SAKURA公司), 经离心机(日本Tokyo公司)摇匀; 放入眼球时, 使眼球在活体内的水平面与EP管的管盖平面相平行, 以利于切片时能取水平位的视网膜切面; $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮内冷冻, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内冻存, 取出后用恒冷箱切片机(德国LEICA公司)切成薄片, 取临近眼球水平位最大球径平面切片, 使视网膜切片厚度为 $3\sim 5\text{ }\mu\text{m}$; 将切片贴于载玻片, 丙酮浸泡固定组织10 min, 随后取出并冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

1.2 免疫组织化学染色技术 将待测切片干燥, PBS清洗3次, 每次5 min; 加入体积分数3% H_2O_2 -甲醇, 室温下20 min; PBS清洗3次, 每次5 min, 滴加正常血清, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置30 min; 擦去多余血清, 滴加一抗[山羊抗鼠/名称: bFGF(N-19)/产品编号: SC-1390/Santa Cruz公司], 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜; PBS清洗, 滴加二抗(牛抗山羊/名称: bovine anti goat IgG/产品编号: SC-2350/Santa Cruz公司), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置30 min; PBS清洗, 滴加ABC复合物, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置45 min; PBS清洗3次, 每次5 min, 滴加 H_2O_2 -DAB底物(北京中山生物技术有限公司)显色, 室温静置 $3\sim 10\text{ min}$; 流水冲洗, 苏木精复染细胞核; 酒精脱水, 二甲苯透明, 树胶封固。本实验中最终的阳性产物呈棕黄色。经过多次的预实验, 本实验最终选定bFGF特异抗体稀释度为 $1:300$ 。

1.3 光学显微镜法 应用光学显微镜复合图像采集系统(OLYMPUS BX51, 日本Olympus), 对染色后的视网膜切片各取 $10\times$ 、 $20\times$ 或 $40\times$ 的若干视野摄片存盘。所有图像的读取和采集从始至终皆由指定的有丰富经验的专家进行。图像一经采集, 专家和实验者本人各持一份留档, 以防止对图像进行任何后期人为的处理。

1.4 图像半定量分析方法 在每种小鼠生后每个时间点各随机选取6张视网膜切片, 应用CMIAS多功能真彩色病理图像分析系统(OLYMPUS BX50, 日本Olympus公司), 对每张染色后的视网膜切片(显微镜物镜 $\times 40$)随机选择4个视野进行图像采集与存储的半定量分析, 在进行阳性目标

(靶目标)的彩色分割后, 系统自动计算每个视野中靶目标的积分光密度, 在病变组和正常对照组的各周龄均产生24个积分光密度值。积分光密度值越高, 表示被测组织内的靶目标数越多, 同时阳性染色程度越深。

1.5 统计学分析 本实验使用SPSS 13.0统计学软件进行统计学处理, 主要使用两种统计学方法进行分析。第一, 针对相同周龄不同种属比较, 采用两独立样本比较 t 检验, 从而分析周龄相同的条件下, bFGF是否因小鼠病变而表达异同; 第二, 针对相同种属不同周龄比较, 采用5个样本比较的单因素方差分析, 从而分析种属相同的条件下, bFGF是否因小鼠周龄增长而表达异同。对各组数据经过正态检验和方差齐性检验后, 分别进行相关统计学检验, 数值非正态的情况下, 转为秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 bFGF的免疫组织化学染色

2.1.1 bFGF在正常对照组的染色分析 出生后0周龄时, 仅分出内丛状层(inner plexiform layer, IPL)和节细胞层(ganglion cell layer, GCL), bFGF主要在近视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)区着染(图1A); 出生后1周龄时, 内外核层轮廓可见但分界不清晰, bFGF在GCL、IPL和内核层(inner nuclear layer, INL)出现着染(图1B); 出生后2周龄时, 十层结构初步形成且内外节段排列有序, bFGF主要在GCL和INL浓染, 同时还在IPL、外丛状层(outer plexiform layer, OPL)和视网膜神经节细胞(retinal ganglial cell, RGC)的感光细胞的内节段(inner segment, IS)着染(图1C); 出生后3周龄时, 十层结构清晰而典型, bFGF仍在GCL和INL着染, 但程度明显变淡, 同时还在IPL、OPL和IS着染(图1D); 出生后4周龄时, 十层结构保持良好, bFGF着染区域不变, 而在OPL和IS处的着染略有增强, 但总体较前有所降低(图1E)。

2.1.2 bFGF在病变组的染色分析 出生后0周龄时, 视网膜仅分出IPL和GCL, bFGF在近RPE区淡染, 程度低于同龄正常对照组(图2A); 出生后1周龄时, 内外核层轮廓可见, 分界不清晰, 细胞排列略紊乱, bFGF在GCL出现着染, 但染色更淡(高倍镜下可见)(图2B); 出生后2周龄时, 十层结构基本形成, 但细胞排列更紊乱, bFGF在GCL、IPL、INL和OPL着染, 其中染色主要集中于IPL, 但程度明显低于同龄正常对照组(图2C); 出生后3周龄时, 病变组的INL和外核层急速退变为1层, 视网膜厚度明显变薄并减半, 仅依稀可见bFGF在GCL和IPL淡染(图2D); 出生后4周龄时, 病变组视网膜神经细胞更为稀少, bFGF的着染更加微弱(图2E)。

图1 出生后0~4周正常对照组小鼠视网膜组织内bFGF的表达(×200)。A~E:分别为出生后0、1、2、3、4周

图2 出生后0~4周病变组小鼠视网膜组织内bFGF的表达(×200)。A~E:分别为出生后0、1、2、3、4周

2.2 bFGF 半定量分析结果

2.2.1 相同周龄不同种属间的对比 针对出生后0~4周龄各时间点分别作独立样本*t*检验(在出生后3、4周龄因正常对照组数值非正态,转行秩和检验得*Z*值和*u*值),出生后0~4周龄的每个时间点,两组小鼠视网膜内的bFGF表达量的差异均有统计学意义(均为*P*<0.01;表1)。

表1 各周龄正常对照组和病变组小鼠视网膜内bFGF积分光密度值

| 周龄 | 病变组 | 正常对照组 | <i>t</i> 值/ <i>u</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|----|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------|
| 0 | 0.479±0.306 | 2.895±2.280 | <i>t</i> =5.145 | 0.000 |
| 1 | 0.230±0.162 | 0.396±0.191 | <i>t</i> =3.237 | 0.002 |
| 2 | 0.784±0.305 | 4.122±2.904 | <i>t</i> =5.599 | 0.000 |
| 3 | 0.200±0.173(<i>Z</i> =17.83) | 0.534±0.512(<i>Z</i> =31.17) | <i>u</i> =128.000 | 0.001 |
| 4 | 0.103±0.074(<i>Z</i> =16.15) | 0.461±0.669(<i>Z</i> =32.85) | <i>u</i> =87.500 | 0.000 |

2.2.2 相同种属不同周龄间的对比

2.2.2.1 正常对照组小鼠组内的对比 因出生后3、4周龄的数值非正态,转行“5个独立样本的秩和检验”,得总体*P*值=0.000,取双侧检验标准α=0.05,差异有统计学意义,再作不同时间点的视网膜内bFGF值的两两比较,检验标准取校正的α'=0.005(表2)。

表2 正常对照组小鼠生后不同周龄的视网膜内bFGF积分光密度值的对比分析*P*值

| 周龄 | 出生后0周龄 | 出生后1周龄 | 出生后2周龄 | 出生后3周龄 |
|----|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 0.000 | | | |
| 2 | 0.089 | 0.000 | | |
| 3 | 0.000 | 0.089 | 0.000 | |
| 4 | 0.000 | 0.027 | 0.000 | 0.091 |

2.2.2.2 病变组小鼠组内的对比 各周龄数值均符合正态分布,但总体方差不齐,取对数转换后*P*=0.289,具有齐性,再对五组新bFGF变量作单因素方差分析,得总体*P*=0.000,取双侧检验标准α=0.05,差异有统计学意义,再作两两比较,同时检验标准仍为α=0.05(表3)。

2.2.3 两组小鼠综合对比 在出生后0~4周龄的

每个时间点,正常对照组小鼠视网膜内bFGF的表达量均明显高于同龄病变小鼠的表达量(*P*<0.01),其中,尤以出生后0周龄和出生后2周龄时的差距明显。两组小鼠各自的bFGF表达曲线在4周内的变化趋势特点相同:均在出生后开始下降,到出生后1周龄时达到低谷;随后开始上升,到出生后2周龄时达到高峰;随后开始二次下降,直至出生后4周龄时(图3)。

表3 病变组小鼠生后不同周龄的视网膜内bFGF积分光密度值的对比分析*P*值

| 周龄 | 出生后0周龄 | 出生后1周龄 | 出生后2周龄 | 出生后3周龄 |
|----|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 0.000 | | | |
| 2 | 0.002 | 0.000 | | |
| 3 | 0.000 | 0.261 | 0.000 | |
| 4 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 |

图3 出生后0~4周龄正常对照组和病变组小鼠视网膜内bFGF积分光密度值曲线图

3 讨论

bFGF最先是在脑垂体的组织提取液中被发现,后经分离纯化而来,因其可促进成纤维细胞增殖而得名。目前bFGF在视网膜方面的研究,主要有以下方面的观点:(1)关于视网膜感光细胞:研究发现,bFGF有促进感光细胞变性后再生,增强感光细胞损

伤后修复的作用^[2-5];而 WEST 等^[6]认为 bFGF 对移植感光细胞的整合无显著效应。(2)关于 RGC: WANG 等^[7]认为, bFGF 在光诱导鼠后部视神经损伤导致 RGC 进行性损害过程中,对 RGC 有明显的保护效应。(3)关于视网膜: XU 等^[8]观察发现间充质干细胞对损伤后的视网膜有修复效应,而 bFGF 在其中起关键作用。(4)关于 RPE: FERGUSON 等^[9]发现,除去 bFGF 后的人类胚胎干细胞是可以成功地分化为 RPE 细胞。(5)关于 bFGF 的分布: LAU 等^[10]用 bFGF 基因转染视网膜色素变性大鼠的视网膜后,发现 bFGF 可在感光细胞的体部和 IS 处着染。

本研究发现,在遗传性视网膜变性的 rd 小鼠中, bFGF 主要在视网膜的神经 GCL、INL 和 IPL、OPL 着染;而在正常对照组 C57BL 小鼠中, bFGF 主要在视网膜的神经 GCL、INL、IPL、OPL 和感光细胞的 IS 处着染。在生后 0~4 周龄各阶段,病变组和正常对照组小鼠各自的视网膜内 bFGF 表达变化的趋势基本相同,但病变组小鼠视网膜内 bFGF 表达的水平始终显著低于同时期正常对照组小鼠,而且病变组小鼠的视网膜结构发育和改变均较同时期的正常对照组小鼠较差。由此提示我们,视网膜神经细胞的分化不全和退变衰亡可能与其视网膜内 bFGF 表达不足相关。

具体来说,在生后 0~1 周龄时,两组小鼠视网膜内 bFGF 均下降至各自的较低水平,但二者均完成视网膜内外核层的初步分化,但病变组小鼠的视网膜神经细胞排列相对略紊乱。由此推测,生后 0~1 周龄阶段的视网膜初步发育可能主要与其相关基因的启动有关,而与视网膜内 bFGF 的含量无绝对相关关系,而此时相对高的 bFGF 表达水平有利于视网膜神经细胞的初步发育和分化。在生后 1~2 周龄时,两组小鼠视网膜内 bFGF 表达均迅速增高并达到各自波动曲线的峰值,虽然两峰值相比仍有显著差异,但两组小鼠均初步完成视网膜十层的结构分层,但病变组小鼠的视网膜神经细胞排列更显紊乱。由此推测,在此阶段表达较高水平的 bFGF 有利于视网膜结构的精细分化和排列。在生后 2~3 周龄阶段,两组小鼠视网膜的 bFGF 表达均开始二次下降,但表达水平仍有差异;而两组小鼠的视网膜结构变化特征却完全相反:病变组小鼠的视网膜开始迅速退变,核层减少,厚度减半;而正常对照组小鼠的视网膜则继续发育分化至成熟,十层结构较前更加清晰而完整。由此提示我们,此阶段视网膜内 bFGF 处于较高表达水平可能对视网膜神经细胞的进一步分化成熟有良性推动作用。在生后 3~4 周龄阶段,两组小鼠视网膜的 bFGF 表达均继续缓慢下降;但不同的是,至出生后 4 周龄时,病变组小鼠视网膜内 bFGF 的表达水平为其出生后波动曲线最低值,且与其此前各周龄时 bFGF 水平相比,差异均有统计学意义;而正常对

照组小鼠视网膜内 bFGF 表达水平,与其出生后 3 周龄时(bFGF 表达已降低)相比,差异无统计学意义,而且其水平仍显著高于同龄的病变组小鼠视网膜内 bFGF 表达量。同时病变组小鼠的视网膜神经细胞更为稀少,细胞结构也更紊乱;而正常对照组小鼠的视网膜结构仍保持完善和良好。由此进一步提示我们, bFGF 处于较高表达水平对已发育成熟的视网膜其后期形态的良好维持可能同样起到一定的支持效应;而病变组小鼠视网膜的退变可能与其视网膜内 bFGF 的长期低水平,尤其是在出生后 2 周龄后 bFGF 表达的持续降低直接相关。

综上所述, bFGF 对视网膜发育分化和形态结构的维持有一定的保护效应,而视网膜内 bFGF 处于较高表达水平可能在一定程度上能防止其退变凋亡,由此为我们进一步深入研究视网膜色素变性的治疗开启了一些有益的思路。

参考文献

- [1] SATARIAN L, JAVAN M, KIANI S, HAJIKARAM M, MIRNA-JAFI-ZADEH J, BAHARVAND H. Engrafted human induced pluripotent stem cell-derived anterior specified neural progenitors protect the rat crushed optic nerve[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71855.
- [2] LEE DC, HAMM LM, MORITZ OL. *Xenopus laevis* tadpoles can regenerate neural retina lost after physical excision but cannot regenerate photoreceptors lost through targeted ablation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(3): 1859-1867.
- [3] WYSE-JACKSON AC, ROCHE SL, RUIZ-LOPEZ AM, MOLONEY JN, BYRNE AM, COTTER TG. Progesterone analogue protects stressed photoreceptors via bFGF-mediated calcium influx[J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 44(12): 3067-3079.
- [4] BRAMALL AN, SZEGO MJ, PACIONE LR, CHANG I, DIEZ E, D'ORLEANS-JUSTE P, et al. Endothelin-2-mediated protection of mutant photoreceptors in inherited photoreceptor degeneration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e58023.
- [5] WYSE-JACKSON AC, ROCHE SL, RUIZ-LOPEZ AM, MOLONEY JN, BYRNE AM, COTTER TG. The synthetic progesterone Norgestrel is neuroprotective in stressed photoreceptor-like cells and retinal explants, mediating its effects via basic fibroblast growth factor, protein kinase A and glycogen synthase kinase 3 β signalling[J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 44(12): 3067-3079.
- [6] WEST EL, PEARSON RA, DURAN Y, GONZALEZ-CORDERO A, MACLAREN RE, SMITH AJ, et al. Manipulation of the recipient retinal environment by ectopic expression of neurotrophic growth factors can improve transplanted photoreceptor integration and survival[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(5): 871-887.
- [7] WANG Y, BROWN DP Jr, DUAN Y, KONG W, WATSON BD, GOLDBERG JL. A novel rodent model of posterior ischemic optic neuropathy[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2013, 131(2): 194-204.
- [8] XU W, WANG X, XU G, GUO J. Basic fibroblast growth factor expression is implicated in mesenchymal stem cells response to light-induced retinal injury[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(8): 1171-1179.
- [9] FERGUSON LR, BALAIYA S, MYNAMPATI BK, SAMBHAV K, CHALAM KV. Deprivation of bFGF Promotes Spontaneous Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Retinal Pigment Epithelial Cells[J]. *J Stem Cells*, 2015, 10(3): 159-170.
- [10] LAU D, MCGEE LH, ZHOU S, RENDAHI KG, MANNING WC, ESCOBEDO JA, et al. Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(11): 3622-3633.