

【实验研究】

甘露醇对实验性视网膜挫伤后神经上皮层水通道蛋白 4 表达的影响

任芳芳 付群 张向东 杨尊之

Effects of mannitol on the expression of aquaporin-4 in retinal neuroepithelium after experimental retinal contusion

REN Fang-Fang, FU Qun, ZHANG Xiang-Dong, YANG Zun-Zhi

[Abstract] Objective To investigate the effect of mannitol on expression of

aquaporin-4 in retinal neurepithelium after experimental retinal contusion. **Methods**

A total of 36 healthy adult rabbits were randomly divided into 3 groups; mannitol treat-

ment group, sodium chloride control group and experimental control group. Rabbits in each group were observed on day 1, 3, 7 and 15 after modeling, respectively. And three

rabbits of each group were selected for observation at each time point, and right eyes

were selected to establish a model of experimental retinal contusion. Rabbits in the mannitol treatment group were given with intravenous injection of mannitol after model-

ing ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ based on body mass index) once each 12 hours. Rabbits in the sodium chloride control group were given the same amount of sodium chloride at each time

point after modeling; and rabbits in the experimental control group left untreated. The expression levels of AQP-4 in retinal neuroepithelial layers were observed with immuno-

histochemical methods. **Results** The expression levels of AQP-4 were observed in retinal neuroepithelial layers in rabbits of each group and positive expression was main-

ly found in ganglion cell layer and inner nuclear layer. On day 1 and 3 after modeling, there were significant differences in the expression of AQP-4 at retinal neuroepithelial

layers among three groups (all $P < 0.05$); but no statistical difference was found in the expression of AQP-4 among three groups on day 7 and 15 after modeling (all $P > 0.05$).

the expression of AQP-4 was obviously reduced in the mannitol treatment group and so-

dium chloride control group comparing with that in the experimental control group on 0.05). No statistical difference was found in the expression of AQP-4 at the four time

control group and experimental control group (all $P > 0.05$). The expression of AQP-4 in

dynamic change with time after modeling. Expression of AQP-4 gradually decreased in chloride control group and experimental control group on day 1, 3, 7 and 15 after model-

bound among the four time points (all $P < 0.05$). Statistical differences were found in the

between 1 d and 7 d, between 1 d and 15 d, between 3 d and 15 d after modeling (all $P < 0.05$), and between each time point (all $P > 0.05$). **Conclusion.** AOP

round between each two groups at each time point (all $P > 0.05$). **Conclusion** AQP-4 expression is up-regulated in the early stage of retinal edema. Mannitol can obviously reduce the early expression

after retinal contusion.

;mannitol;aquaporin 4

性视网膜挫伤后神经上皮层水通道蛋白4(aquaporin 4, AQP4)表达的影响。方法 取健康

生理盐水和实验对照组,每组分别在造模后1 d、3 d、7 d、15 d四个时间点进行观察,每个组作3只。治疗组在造模后立即静脉注射甘露醇(依据体重质量按 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 用量),然后每

致伤眼。活力组在造模后立即静脉注射甘露醇(依据体重量按 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 用量),然后每各时间点给予相应剂量的生理盐水;实验对照组造模后不给予任何处理。采用免疫组织化

情况。结果 各组兔视网膜神经上皮层 AQP-4 均有表达,阳性表达主要见于视网膜神经节

模后 7 d 和 15 d, 3 组间 AQP4 的表达总体比较差异均无统计学意义 (均为 $P>0.05$)。造模

实验对照组相比, AQP4 的表达均明显降低(均为 $P < 0.05$); 生理盐水组与实验对照组相比, AQP4 的表达无显著差异($P > 0.05$)。说明生理盐水灌流对 AQP4 的表达无影响, 而实验对照

均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。造模后视网膜神经上皮层 AQP4 的表达随时间呈动态
召组 AQP4 的表达在造模后 1 d、3 d、7 d、15 d 均逐渐下降,4 个时间点总体比较差异均有统

造模后 1 d 和 7 d AQP-4 的表达差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),造模后 1 d 和 15 d 以

及3 d和15 d比较差异亦均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),其余各时间点间两两比较差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。
结论 AQP4与挫伤后视网膜水肿的发生发展密切相关;甘露醇可明显降低视网膜挫伤后早期神经上皮层AQP4的表达。

【关键词】 视网膜挫伤;甘露醇;水通道蛋白4

【中图分类号】 R774

视网膜挫伤是指眼部受到钝性外力击打所引起的视网膜损伤,主要表现为急性视力损害和视网膜水肿、变性、出血、坏死^[1]。水通道蛋白4(aquaporin-4, AQP-4)在视网膜、睫状体上皮、晶状体和角膜等部位均有表达,在视网膜上的表达最强^[2],它在水分子快速跨膜转运中发挥重要作用。甘露醇是临床中首选脱水剂,它能使血浆渗透压升高,达到减轻视网膜水肿的目的。本研究观察甘露醇对实验性视网膜挫伤后神经上皮层AQP-4表达的影响,探讨挫伤后视网膜水肿渗透性治疗的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 取健康成年大白兔36只(二级,由新乡医学院动物中心提供),雌雄不限,体重2.0~2.5 kg;经散瞳、常规外眼和眼底检查无明显异常后标识为受试兔;采用随机数字表法将受试兔分为治疗组、生理盐水组和实验对照组,每组12只。每组分别在造模后1 d、3 d、7 d、15 d四个时间点进行观察,每个时间点均选取3只兔,均选取右眼为致伤眼。

1.1.2 试剂及仪器 AQP4(北京博奥森公司),40 g·L⁻¹多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司),二步法免疫组织化学检测试剂盒、DAB染色试剂盒、多聚赖氨酸(北京中杉金桥公司),中性树胶(武汉博士德公司),100 g·L⁻¹水合氯醛(新乡医学院生理实验室提供),复方托吡卡胺滴眼液(北京双鹤现代医药技术有限责任公司),200 g·L⁻¹甘露醇(石家庄四药有限公司),37℃孵化箱、60℃恒温烤箱、免疫组织化学恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),电子秤、恒温干燥箱(上海光学仪器厂),图像分析系统(美国Media Cybernetics公司),电脑生物组织摊烤片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司),检眼镜(苏州六六视觉科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备及模型成功标准 采用改良Allen's重击法建立视网膜挫伤模型,致伤能量约为2.87 J^[3]。所有造模由同一操作者序贯完成。治疗组在造模后立即静脉注射甘露醇(依据体重按0.5 g·kg⁻¹用量),然后每12 h给药1次。生理盐水组造模后在各时间点给予相应剂量的生理盐水(2.5 mL·kg⁻¹)。实验对照组造模后不给予任何处理。模型制作后伤眼直接对光反应迟钝,瞳孔散大,检眼镜观察眼底,视网膜出现乳白色混浊,水肿范围较大,同时伴有眼底出血者为造模成功,纳入实验。

术后结膜囊内涂红霉素眼膏。

1.2.2 眼部情况观察及视网膜神经上皮层AQP-4表达检测 实验兔均在同一条件、不同时间点进行眼部伤情观察,检查眼球位置、结膜、角膜、前房、瞳孔、晶状体、玻璃体和视网膜;眼部检查由同一名高年资眼科医师完成。在造模后1 d、3 d、7 d、15 d处死动物,摘除眼球常规包埋切片,采用免疫组织化学法检测AQP-4在视网膜神经上皮层表达情况。AQP-4表达以细胞膜呈不同程度的棕黄色为阳性,阴性结果无棕黄色表达。结果用图像分析处理系统测量灰度值;每个标本任意选择15个视野来检测阳性表达细胞的灰度值;灰度值高表示AQP-4含量高,灰度值低表示AQP-4含量低。

1.3 统计学分析 应用SPSS 17.0统计软件对实验结果进行分析;各组间比较采用方差分析进行检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组兔视网膜神经上皮层AQP-4的表达情况

各组兔视网膜神经上皮层AQP-4均有表达,阳性表达主要见于神经节细胞层与内核层;各组不同时间点AQP-4的表达变化见表1。造模后1 d和3 d,治疗组、生理盐水组和实验对照组3组间视网膜神经上皮层AQP-4的表达总体比较差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);造模后7 d和15 d,3组间AQP-4的表达总体比较差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$);造模后1 d和3 d治疗组与生理盐水组和实验对照组相比,AQP-4的表达均明显降低(均为 $P < 0.05$);生理盐水组与实验对照组相比,AQP-4的表达在4个时间点差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。

2.2 各时间点兔视网膜神经上皮层AQP-4的表达变化

造模后视网膜神经上皮层AQP-4的表达随时间呈动态变化;治疗组、生理盐水组和实验对照组AQP-4的表达在造模后1 d、3 d、7 d、15 d均逐渐下降,4个时间点总体比较差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);各组在造模后1 d和7 d AQP-4的表达差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),1 d和15 d以及3 d和15 d比较差异亦均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),其余各时间点间两两比较差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。见表1和图1。

3 讨论

视网膜挫伤是指眼组织遭受钝性物体打击、弹震性损伤、冲击波等所引起的视网膜脉络膜血管反

表 1 各组各时间点视网膜神经上皮层 AQP-4 表达的变化

组别	视网膜神经上皮层 AQP-4 表达				F 值	P 值
	造模后 1 d	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 15 d		
治疗组	95.79 ± 1.88	93.13 ± 3.39	88.41 ± 4.19	84.47 ± 5.13	5.129	<0.05
生理盐水组	102.44 ± 2.87	99.64 ± 2.56	94.51 ± 2.89	89.47 ± 2.97	13.343	<0.05
实验对照组	102.67 ± 3.84	99.84 ± 2.21	94.84 ± 2.58	89.38 ± 2.96	11.703	<0.05
F 值	5.184	5.729	3.614	1.675		
P 值	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05		

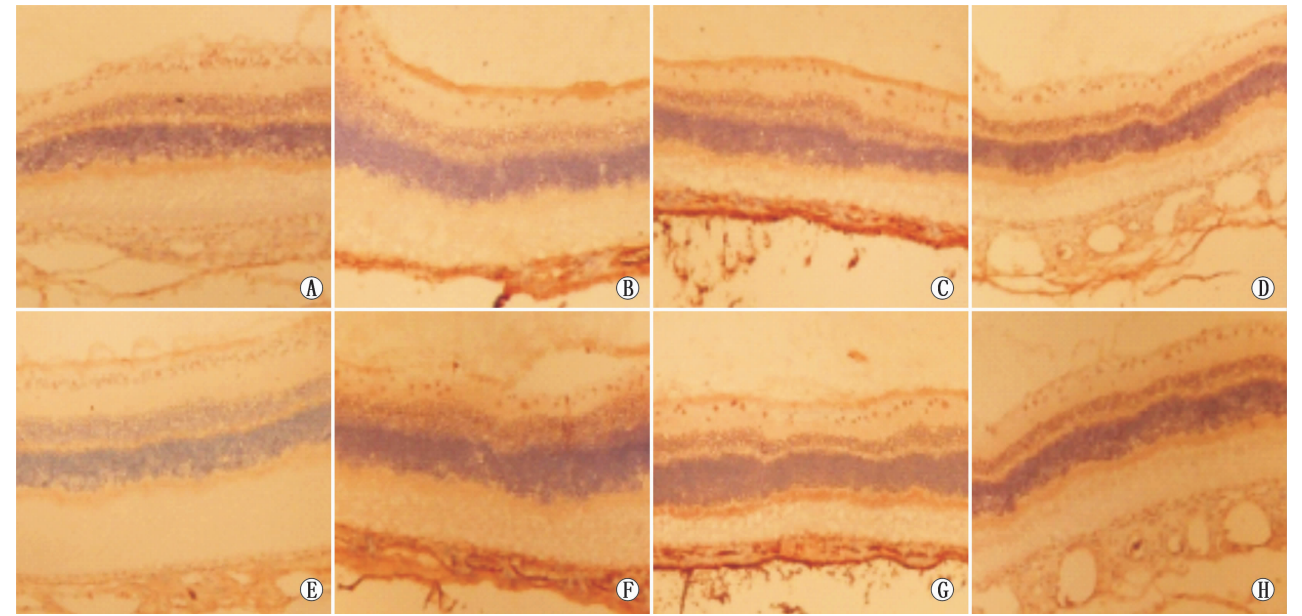


图 1 各组视网膜神经上皮层 AQP-4 的阳性表达 (×200)。A ~ D 分别为光镜下治疗组 1 d、3 d、7 d、15 d 时染色结果, AQP-4 的阳性表达呈逐渐下降趋势; E ~ H 分别为生理盐水组 1 d、3 d、7 d、15 d 时染色结果, AQP-4 的阳性表达亦呈逐渐下降趋势 (因生理盐水组与实验对照组各时间点视网膜神经上皮层 AQP-4 的表达差异均无统计学意义, 不再附图)

应及视网膜水肿变性,甚至坏死。视网膜坏死后可引起严重的视觉功能障碍,视网膜挫伤是眼外伤后视力丧失的主要原因之一^[4]。虽然目前对视网膜挫伤后的眼底改变在临床上已经有较充分的认识,但对其发病机制及治疗意见仍不一致。

研究表明 AQP4 在视网膜、睫状体上皮、晶状体和角膜等部位均有表达^[5]。AQP-4 在视网膜上的表达最强,从内界膜至外界膜均可见 AQP-4 的阳性表达,特别是在神经节细胞层、内核层、外核层。Yamamoto 等^[6]证实 AQP-4 主要在视网膜 Müller 细胞及星形胶质细胞表达,定量分析发现 AQP-4 在视网膜 Müller 细胞足突膜较非足突膜的表达水平高。这种细胞分布的特殊模式说明 AQP-4 可能参与多种眼功能活动^[7],提示 AQP4 对维持细胞外渗透性有重要意义。

甘露醇是一种高分子碳水化合物^[8]。临床上常用浓度为 200 g · L⁻¹甘露醇溶液,其渗透压是正常血浆的 3.6 倍。静脉注射或静脉滴注后不易通过毛细血管渗入组织,能够迅速提高血浆渗透压,在组织与血浆之间形成渗透压梯度,促使组织间液和细胞内水分向血浆转移,从而达到组织脱水的作用。对

眼、脑等具有屏障功能的组织脱水作用更为明显。本研究旨在观察甘露醇对实验性视网膜挫伤后神经上皮层 AQP-4 表达的影响,探讨视网膜挫伤后渗透性治疗的作用机制。

本研究结果显示,造模后 AQP-4 主要表达于神经节细胞层与内核层,并且 AQP-4 的表达随时间呈动态变化,逐渐减低。应用甘露醇后,治疗组与另外 2 组相比,造模后 1 d 和 3 d AQP-4 的表达均明显降低,提示甘露醇可明显降低视网膜挫伤后神经上皮层 AQP-4 的表达,故甘露醇对 AQP-4 可能存在抑制作用。造模后 7 d 和 15 d 视网膜神经上皮层 AQP-4 的表达 3 组间无明显差异,可能是因为挫伤后血-视网膜屏障破坏使甘露醇进入病灶区视网膜组织,随着甘露醇应用次数及量的增加,药物逐渐在病灶区的视网膜组织中聚集,最终导致病灶区视网膜组织中的甘露醇浓度与血浆中的甘露醇浓度无法形成渗透压梯度,最后不能达到脱水的作用。国外研究发现^[9-10]视网膜挫伤后存在视网膜神经纤维层的丧失,也有观点认为^[11-12]挫伤后由于缺血缺氧使视网膜处于饥饿和窒息状态,代谢产物的毒性作用使视网膜组织细胞变性坏死。另有研究发现视网膜挫伤

后7 d、14 d神经纤维层和内核层由于细胞凋亡而变薄^[13]。我们推测挫伤后早期应用甘露醇可扩充血浆容量^[11-12],改善血液流变学,减少因缺氧造成的局部组织坏死,也能改善细胞代谢,提高愈后功能^[13-15]。

综上所述,甘露醇可明显降低视网膜挫伤后神经上皮层AQP-4的表达,提示甘露醇对AQP-4有抑制作用。应用甘露醇治疗视网膜挫伤后神经上皮层水肿及研发新型脱水剂具有一定意义。

参考文献

[1] FU Q, WANG Z Y. The thickness of sensory layer of the experimental contusive of retina in rabbit[J]. *J Clin Ophthalmol*, 2008, 16(3): 262-264.
付群, 王志玉. 实验性兔视网膜挫伤后不同时间的视网膜厚度研究[J]. 临床眼科杂志, 2008, 16(3): 262-264.

[2] ZHAO J, MOORE A N, CLIFTON G L, DASH P K. Sulforaphane enhances aquaporin-4 expression and decreases cerebral edema following traumatic brain injury[J]. *Neurosci Res*, 2005, 82(4): 499-506.

[3] LI F M. Ophthalmology[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996: 3281-3285.
李凤鸣. 眼科全书[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 3281-3285.

[4] DOU H L, SONG C. Changes of retinal tissue and ultrastructure after ocular contusion[J]. *J Ocul Traum Occupat Eye Dis*, 1993, 15(1): 8-10.
窦宏亮, 宋琛. 眼球钝挫伤后视网膜组织及超微结构的变化[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 1993, 15(1): 8-10.

[5] YAKATA K, HIROAKI Y, ISHIBASHI K, SOHARA E, SASAKI S, MITSUOKA K, et al. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity Biochim[J].

Biophys Acta, 2007, 1768(3): 688-693.

[6] YAMAMOTO N, YONEDA K, ASAI K, SOBUE K, TADA T, FUJITA Y, et al. Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 90(1): 26-38.

[7] ZHAO L, BRINTON R D. Vasopressin-induced cytoplasmic and nuclear calcium signaling in embryonic cortical astrocytes: Dynamics of calcium and calcium dependent kinase translocation[J]. *Neuroscience*, 2003, 23(10): 4228-4239.

[8] YU L. New clinical application of mannitol[J]. *Chin Pract Med*, 2009, 4(14): 146-147.
于莉. 甘露醇的临床新用途[J]. 中国实用医药, 2009, 4(14): 146-147.

[9] FELIPE A M, FREDERICO C M, ROBERTO M V, REMO S. Axonal loss after traumatic optic neuropathy documented by optical coherence tomography[J]. *Am J Ophthalmol*, 2003, 135(3): 406-408.

[10] MIYAHARA T, KURIMOTO Y, KUROKAWA T, KURODA T, YOSHIMURA N. Alterations in retinal nerve fiber layer thickness following indirect traumatic optic neuropathy detected by nerve fiber analyzer, GDx-N[J]. *Am J Ophthalmol*, 2003, 136(2): 361-364.

[11] SUN W R, ZHAO G Q, LIANG C P, WANG H H, YANG W Y, ZHAO J, et al. Study on enzyme histochemistry and histology of retinal contusion[J]. *Ophthalmol Res*, 1996, 1(2): 101-104.
孙为荣, 赵桂秋, 梁婵萍, 王颀华, 杨文毅, 赵洁, 等. 视网膜挫伤的酶组织化学及组织学研究[J]. 眼科研究, 1996, 1(2): 101-104.

[12] LIU Y W, LIU Q X. Clinical analysis of ocular trauma[J]. *Jilin Med J*, 2004, 25(10): 36.
刘英伟, 刘秋霞. 眼球顿挫伤的临床分析[J]. 吉林医学, 2004, 25(10): 36.

[13] WANG Z Y, SHI A Y. Pathology observation of retinal contusion rabbit model[J]. *Int Eye Sci*, 2009, 9(8): 1469-1471.
王志玉, 史爱云. 视网膜挫伤兔模型的病理学观察[J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(8): 1469-1471.

(上接第942页)

参考文献

[1] IMRAY C, BOOTH A, WRIGHT A, BRADWELL A. Acute altitude illnesses[J]. *BMJ*, 2011, 15: 343.

[2] BOSCH M M, MERZ T M, BARTHELMES D, PETRIG B L, TRUFFER F, BLOCH K E, et al. New insights into ocular blood flow at very high altitudes[J]. *Appl Physiol*, 2009, 106(2): 454-460.

[3] FRÉMONT L. Biological effects of resveratrol[J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 663-673.

[4] SCHATZ A, WILLMANN G, FISCHER MD, SCHOMMER K, MESIAS A, ZRENNER E, et al. Electroretinographic assessment of retinal function at high altitude[J]. *Appl Physiol*, 2013, 115(3): 365-372.

[5] XIN X R, GONG T X. Effects of hypoxia on production of ATP and expression of mitochondria C in human meningeal cells as the cerebral fluid-optic nerve barrier[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(1): 28-31.
辛晓蓉, 巩天祥. 缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞ATP水平和细胞色素C表达的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(1): 28-31.

[6] XIN X R, GONG T X. Effects of hypoxia on endoplasmic reticulum and mitochondrial membrane potential in human me-

ningothelial cells in cerebral fluid-optic nerve barrier[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2014, 34(11): 1009-1012.

辛晓蓉, 巩天祥. 缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞内质网和线粒体膜电位的影响[J]. 眼科新进展, 2014, 34(11): 1009-1012.

[7] FRANCKE M, FAUDE F, PANNICKE T, BRINGMANN A, ECKSTEIN P, REICHELT W, et al. Electrophysiology of rabbit müller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(5): 1072-1079.

[8] Semenza GL. Oxygen homeostasis[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2010, 2(3): 336-361.

[9] FENG L, CHEN H, YI J, TROY JB, ZHANG HF, LIU X. Long-term protection of retinal ganglion cells and visual function by brain-derived neurotrophic factor in mice with ocular hypertension[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(8): 3793-3802.

[10] OLA MS, NAWAZ MI, EL-ASRAR AA, ABOUMMOH M, AL-HOMIDA AS. Reduced levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the serum of diabetic retinopathy patients and in the retina of diabetic rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(3): 359-367.

[11] TAYLOR CT. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- κ B in hypoxic inflammation[J]. *J Physiol*, 2008, 586(17): 4055-4059.