

无蹼壁虎视网膜 GFAP 免疫阳性的分布 和衰老相关性变化

王智超^{①②} 王笑蕾^③ 武军元^② 余中宾^① 鲁亚平^{①*}

(① 安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000; ②新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室
塔里木大学动物科技学院 新疆 阿拉尔 843300; ③泰山医学院内科护理教研室 泰安 271000)

摘要: 运用免疫组织化学方法(ABC 法)结合数学形态学技术观察了胶质纤维酸性蛋白(GFAP)在无蹼壁虎(*Gekko swinhonis*)视网膜的分布及与衰老相关性变化。结果显示,GFAP 免疫阳性结果主要位于视网膜的 Müller 细胞内侧端的胞体、突起和膨大的终足,胞体外侧端呈弱阳性。比较成年组与老年组视网膜中央区 GFAP 免疫阳性形态学参数显示:老年组 GFAP 免疫阳性 Müller 细胞短径较成年组增粗;老年组 GFAP 免疫阳性细胞的光密度值较成年组增高;老年组视网膜各层 GFAP 免疫阳性面积占视网膜总面积的百分率较成年组增高。GFAP 在无蹼壁虎视网膜的分布特点及年龄相关性变化,提示 Müller 细胞可能通过增加 GFAP 表达或减弱分解来参与视网膜衰老过程中的生理功能调节。

关键词: 胶质纤维酸性蛋白;无蹼壁虎;年龄;分布;免疫组织化学

中图分类号:Q954.6 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2008)01-16-05

The Distribution and Senescence related Changes of GFAP-immunoreactivity in the Retina of Lizard *Gekko swinhonis*

WANG Zhi-Chao^{①②} WANG Xiao-Lei^③ WU Jun-Yuan^② YU Zhong-Bin^① LU Ya-Ping^{①*}

(① School of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000;

② Key Laboratory of Animal Husbandry Science and Technology of Xinjiang Production and Construction Corps,

College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300;

③ Internal Nursing Teaching and Research Section, Taishan Medical College, Tai'an 271000, China)

Abstract: Immunohistochemical and morphometric methods were used in the present study to investigate the distribution and senescence related changes of GFAP immunoreactivity(IR) in the retina of lizard *Gekko swinhonis*. The results showed that the GFAP IR was mainly localized in the vitread endfeet and inner part of the radial trunks of the Müller cells through out the retina. Compared with adult lizards, the old lizards had a significant increase in the optical density (OD) and the percentage of GFAP IR in the retinas. At the same time, the GFAP IR Müller cells in the old lizards showed shorter minor diameters. All the results suggest that Müller cells probably participate in the senescencing processes of the retina by the mediation of the higher GFAP expression and lower decomposition.

Key words: GFAP; *Gekko swinhonis*; Age; Distribution; Immunohistology

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30470537),安徽省教育厅自然科学基金重点项目(No. 2005kj028zd);

* 通讯作者, E-mail: alanlu@ustc.edu;

第一作者介绍 王智超,男,硕士,讲师;研究方向:比较动物神经内分泌学; E-mail: wangzetarim@163.com;

收稿日期:2007-01-15, 修回日期:2007-10-15

视网膜作为中枢神经系统的外周脑,薄而透明、明显的分层以及取材与操控简单等特性使其成为研究神经发育机制、神经损伤、可塑性和神经生理功能的理想模型。爬行动物是唯一具有中枢再生能力的羊膜类脊椎动物,因其特殊的视觉再生能力,已成为神经发育生物学的研究热点^[1]。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)是星形胶质细胞(astrocyte, AS)的特异性标志蛋白,其表达的高低可反应胶质细胞的功能活动状态^[2]。Romero-Alemán 等报道在西加那利蜥蜴(*Gallotia galloti*)的中枢神经系统再生过程中,GFAP 的表达变化可能与其再生密切相关^[3]。哺乳动物视网膜 GFAP 免疫阳性细胞的数目、阳性反应强度及细胞形态均呈年龄相关性变化^[4]。本文报道了 GFAP 在无蹼壁虎(*Gekko swinhonis*)视网膜中的定位、分布及与衰老相关性变化,以期为脊椎动物视网膜 GFAP 的比较形态学研究提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 无蹼壁虎成体(全长 110~136 mm) 16 只,采自山东泰山医学院家属区宿舍,雌雄兼有。实验室室温面包虫喂养,水、食物自由摄取,稳定 1 周。根据体长(并参照其他体态特征)分为成年组(体长 < 120 mm, 1~2 龄),共 10 只;老年组(体长 > 128 mm, 3~5 龄),共 6 只。各组壁虎断头后每只各取眼球一个,迅速固定于新配制的 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(PB, pH 7.4)中,过夜后梯度酒精脱水,常规石蜡包埋切片,片厚 6 μm。相间取片贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,分别用于 GFAP 免疫组织化学染色和 H. E 染色,部分免疫组织化学染色切片用 Harris 苏木素进行复染。

1.2 免疫组织化学方法 切片脱蜡至水,置 3% H₂O₂ PBS 液中 30 min 以消除内源性过氧化物酶活性;微波抗原修复 2 次,每次 10 min; 5% 正常羊血清孵育 20 min 封闭非特异性反应;一抗兔抗牛 GFAP 多克隆抗体(DAKO A/S, Z0334, Denmark) 37℃ 孵育 1 h 后于 4℃ 冰箱过夜;二抗(Vector 公司 goat anti rabbit, 1: 200), 37℃ 温育 1

h; ABC 复合物(Vector 公司 ABC kit, 1: 200) 37℃ 孵育 1 h; DAB 显色 5 min。每一步后均以 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min,部分切片用苏木素进行必要的复染。阴性对照片以 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行孵育,其余步骤同上。一抗兔抗牛 GFAP 在爬行动物的特异性已有报道^[5,6]。

1.3 观察与统计分析 染色后的切片在 Nikon E800u 生物显微镜下观察。参照前人方法^[7,8], 各组分别取切片 20 张,在高倍镜(400×)下每张切片取视网膜中央区随机拍照 4 张并存储。利用 Image Pro Plus 5.01 生物图像分析软件(Media Cybernetics, Inc., America)测量阳性细胞相关形态学参数,并测定各组视网膜 GFAP 阳性细胞的光密度值(optical density, OD)。OD 是被测结构截面内各像素的光密度的算术平均,可反映组织细胞被染色的深浅,染色越深,其值越大,GFAP 表达越强。每张照片转换成灰度(gray scale 8)照片,视网膜各层结构采用 AOI (area of interested)工具手工圈定,阳性细胞的选定通过设定统一灰度范围后自动选定。所有数据采用平均值±标准误表示。*t* 检验方法分析组间差异,*P* < 0.05 显示差异显著。

2 结 果

无蹼壁虎视网膜结构通过 H. E 染色显示,由外到内共分 10 层(图版 I: 1)。GFAP 免疫阳性反应主要位于视网膜的 Müller 细胞胞体的内侧端、突起和膨大的终足,胞体外侧端呈弱阳性(图版 I: 2)。部分 Müller 细胞轮廓清晰,呈现全细胞免疫阳性,细胞呈柱状,纵贯视网膜内外界膜,胞体位于内核层,从胞体向内侧端伸展的突起终止在视网膜内界膜,在其终端呈特有的膨大的终足(endfoot);同时向外侧端伸出顶突,终止在光感受器层;此外 Müller 细胞又从细胞质主干伸出许多次级分枝,沿途向周围放射状发散(图版 I: 3)。统计表明,视网膜中央区各层 GFAP 免疫阳性细胞的光密度值为神经纤维层最大,其次分别为神经节细胞层、内网状层、内核层、外网状层和外核层(表 1)。比较成

年组与老年组视网膜中央区 GFAP 免疫阳性细胞形态学参数(表 2, 图版 I: 4, 5), 老年组 GFAP 免疫阳性 Müller 细胞短径较成年组增粗 ($P < 0.05$); 老年组 GFAP 免疫阳性细胞光密度值较成年组增高 ($P < 0.001$); 老年组视网膜各层 GFAP 免疫阳性面积占视网膜总面积的百分率较成年组增高 ($P < 0.001$)。阴性对照无阳性反应(图版 I: 6)。

表 1 无蹼壁虎成年组视网膜中央区 GFAP 阳性细胞 OD 结果统计 (Mean ± SE, n = 80)

Table 1 Statistical OD of GFAP IR in the central area of the retina in adult *Gekko swinhonis*

参数 Parameter	中央区 Central areas
外核层光密度值 OD of outer nuclear layer	< 0.0010
外网状层光密度值 OD of outer plexiform layer	< 0.0010
内核层光密度值 OD of inner nuclear layer	0.0010 ± 0.0003
内网状层光密度值 OD of inner plexiform layer	0.0036 ± 0.0010
神经节细胞层光密度值 OD of ganglion cell layer	0.0107 ± 0.0062
神经纤维层光密度值 OD of nerve filament layer	0.1122 ± 0.0085
视网膜平均光密度值 Average OD of retina	0.0080 ± 0.0004
阳性面积百分率 (%) Percentage of immunoreactive area	1.62 ± 0.12

表 2 无蹼壁虎成年组与老年组视网膜中央区 GFAP 免疫阳性形态学参数结果统计 (Mean ± SE, n = 80)

Table 2 Morphological parameters of GFAP IR in the central area of the retina in adult and old *Gekko swinhonis*

参数 Parameter	老年组 Aged group	成年组 Adult group
Müller 细胞短径(μm) Minor diameter of Müller cell	2.9 ± 0.74	2.0 ± 0.67*
平均光密度值 Average optical density	0.0131 ± 0.0026	0.0080 ± 0.0004**
阳性面积百分率 (%) Percentage of immunoreactive area	4.94 ± 0.09	1.62 ± 0.12**

t 检验, 成年组与老年组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。

t test, adult group vs. old group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。

3 讨论

H. E 染色显示, 无蹼壁虎视网膜呈现明显的脊椎动物分层结构特征, 与以往所报道的夜行性或晨昏性蜥蜴类视网膜结构特征一致^[9]。

前人报道 GFAP 免疫阳性反应主要位于视网膜 Müller 细胞内侧端的胞体、突起和膨大的终足^[5], 本研究结果与此一致。另外, 本研究结果显示, 在免疫组织化学染色的切片中视椎视杆层呈棕黄色, 而阴性对照片和 H. E 染色的切片中此层亦呈棕黄色, 故认为此层并非呈 GFAP 免疫阳性, 而可能是色素颗粒经固定所致。在视网膜的各层结构中神经纤维层 GFAP 的 OD 值最大, 免疫阳性最强, 这可能是呈 GFAP 阳性的 Müller 细胞的膨大终足包围神经节细胞轴突造成的。

胶质纤维酸性蛋白表达的高低可反映星形胶质细胞的功能活动状态, 在脑损伤、衰老过程或病理状况下脊椎动物(包括爬行类)星形胶质细胞有明显的反应性增生和生长现象^[3, 10]。本实验结果表明: 老年组 GFAP 免疫阳性 Müller 细胞短径较成年组增粗; 老年组 GFAP 免疫阳性细胞光密度值较成年组增高; 老年组视网膜各层 GFAP 免疫阳性面积占视网膜总面积的百分率较成年组亦增高。这提示在衰老过程中视网膜 Müller 细胞增生和活性增强, 可能与胶质纤维酸性蛋白合成增加或分解减弱有关。衰老过程中视网膜 Müller 细胞的增生可能与哺乳动物脑中星形胶质细胞增生^[10]具有相似的作用: (1) Müller 细胞可从毛细血管吸收更多营养物质供给衰老的视网膜神经细胞, 延缓神经细胞的进一步衰老和凋亡。(2) Müller 细胞为再生的视网膜神经细胞提供丰富的黏着基质, 从而起支持作用。

参 考 文 献

[1] Lang D M, Romero Aleman M M, Arbelo Galvan J, et al. Regeneration of retinal axons in the Lizard *Gallotia gallois* is not linked to generation of new retinal ganglion cells. *Journal of Neurobiology*, 2002, 52: 322~ 335

[2] Bigini P, Bastone A, Mennini T. Glutamate transporters in the

- spinal cord of the wobbler mouse. *Neuroreport*, 2001, **12**(9): 1 815~ 1 820.
- [3] Romeró Almirán M M, Monzó ir Mayor M, Yanes C, *et al.* Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to successful structural repair in the cerebral cortex of the lizard *Galloia galloti*. *Experimental Neurology*, 2004, **188**: 74~ 85.
- [4] Lewis G P, Fisher S K. Up regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol*, 2003, **230**: 263~ 290.
- [5] Sassoe P M, Panzanelli P, Artero C, *et al.* Comparative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP)- like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates. *Eur J Histochem*, 1992, **36**(4): 467~ 477.
- [6] Dahl D, Crosby C J, Sethi J S, *et al.* Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *The Journal of Comparative Neurology*, 1985, **239**(1): 75~ 88.
- [7] Bennis M, Moldayc R S, Versaux Botter C, *et al.* Rhodopsin like immunoreactivity in the 'all cone' retina of the chameleon (*Chameleo chameleo*). *Experimental Eye Research*, 2005, **80**: 623~ 637.
- [8] 鲁亚平, 曾梅, 周江宁. 雌激素受体 α 免疫阳性星型胶质细胞在阿尔茨海默病人海马中分布的改变. *中国神经科学杂志*, 2003, **19**(6): 379~ 383.
- [9] 张育辉, 贾林芝. 蜥蜴亚目 5 种动物视网膜结构的观察比较. *西北大学学报(自然科学版)*, 2003, **33**(4): 475~ 478.
- [10] Bizon J L, Lee H J, Gallagher M. Neurogenesis in a rat model of age related cognitive decline. *Aging Cell*, 2004, **3**(4): 227 ~ 234.

图 版 说 明

1. 无蹼壁虎视网膜 H.E 染色, $\times 400$ (标尺= 50 μm); 2. 无蹼壁虎老年组视网膜中央区 GFAP 免疫组织化学染色 (苏木素复染), 阳性结果棕黄色, $\times 400$ (标尺= 50 μm); 3. 无蹼壁虎老年组视网膜中央区 GFAP 的免疫阳性 Müller 细胞 (箭头示, 苏木素复染), $\times 800$ (标尺= 25 μm); 4. 无蹼壁虎老年组视网膜中央区 GFAP 的免疫组织化学染色, $\times 400$ (标尺= 50 μm); 5. 无蹼壁虎成年组视网膜中央区 GFAP 的免疫组织化学染色, $\times 400$ (标尺= 50 μm); 6. 阴性对照, 无阳性反应, $\times 400$ (标尺= 50 μm).

Explanation of Plate

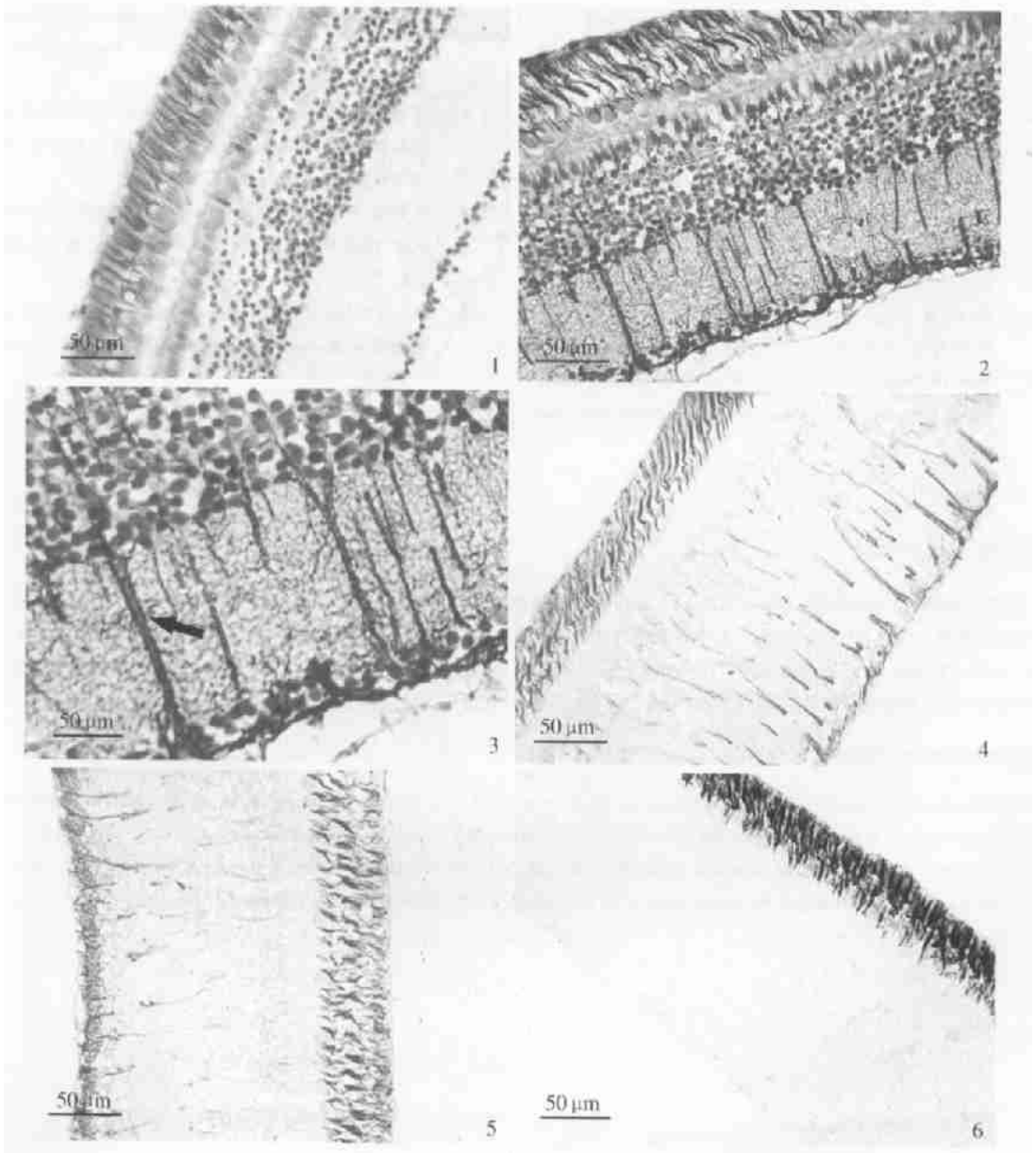
1. H.E staining of the retina in the *Gekko swinhonis*, $\times 400$ (Bar= 50 μm); 2. GFAP IHC staining of the central retina, counterstained by Hematoxylin trihydrate in the aged group, $\times 400$ (Bar= 50 μm); 3. GFAP⁺ ir Müller cell in the central retina of the aged *G. swinhonis* group (arrow head), counterstained by Hematoxylin trihydrate, $\times 800$ (Bar= 25 μm); 4. GFAP IHC staining of the central retina in the aged group, $\times 400$ (Bar= 50 μm); 5. GFAP IHC staining of the central retina in the adult group, $\times 400$ (Bar= 50 μm); 6. The negative control, non positive reaction, $\times 400$ (Bar= 50 μm).

王智超等: 无蹼壁虎视网膜 GFAP 免疫阳性的分布和衰老相关性变化

图版 I

WANG Zhi Chao *et al.*: The Distribution and Senescence related Changes of GFAP immunoreactivity in the Retina of Lizard *Gekko swinhonis*

Plate I



图版说明见文后