

· 基础研究 ·

810 nm 低能量镓铝砷激光对大鼠视神经钳夹伤后的再生作用

林阳阳 苑秀华 周方倩 王中莉 刘苗苗 林振原

【摘要】目的 通过对视网膜和视神经再生的标志物生长相关蛋白-43 (GAP-43) 的测定和闪光视觉诱发电位 (F-VEP) 的测定, 观察 810 nm 低能量镓铝砷 (Ga-Al-As) 激光对大鼠视神经钳夹伤后视神经再生的影响。**方法** 健康成年 Wistar 大鼠 88 只, 体重 (180 ~ 220) g, 分成激光治疗组 40 只、单纯损伤组 32 只、正常对照组 16 只, 每组又分成 1, 3, 6, 9 周 4 个时间点。标准的视神经钳夹伤模型制备成功后, 激光治疗组行激光照射, 照射参数为: 光导子直径 5 mm, 照射强度 60 mW, 持续时间 3 min, 经皮至视神经损伤处, 每日照射 1 次。单纯损伤组及正常对照组在进行激光照射时, 激光器无功率输出。激光治疗 1, 3, 6, 9 周后测量视网膜、视神经 GAP-43mRNA 含量和 GAP-43 蛋白的表达。并且测量损伤前, 损伤即刻, 治疗 1, 3, 6, 9 周后患侧眼 F-VEP。**结果** 大鼠视神经损伤后, F-VEP 有很大变化, 表现在 N1、P1、N2 波潜伏期延长, 在视神经损伤即刻, 潜伏期瞬间延长, 随后有所恢复, 第 1 ~ 3 周进行性延长, 在第 3 ~ 9 周之间 N1、P1、N2 波潜伏期有所恢复。激光治疗组 N1、P1、N2 波的潜伏期也延长, 但是明显小于单纯损伤组。正常的视网膜和视神经中几乎没有 GAP-43 蛋白的表达, 视神经损伤后, GAP-43 蛋白的表达在伤后第 1 周时达到高峰, 随后下降, 激光治疗后第 1, 3, 6 周与同一时间单纯损伤组 GAP-43 蛋白表达相比有所提高 ($P < 0.05$), 视网膜的 GAP-43mRNA 的含量与 GAP-43 蛋白表达相一致。**结论** 810 nm 低能量镓铝砷激光能够促进大鼠视神经钳夹伤后视神经再生。

【关键词】 低能量激光; 视神经损伤; 生长相关蛋白-43; 闪光视觉诱发电位

The effect of 810 nm low-power Ga-Al-As laser treatment on the regeneration of a damaged optic nerve LIN Yang-yang*, YUAN Xiu-hua, ZHOU Fang-qian, WANG Zhong-li, LIU Miao-miao, LIN Zhen-yuan. * Department of Rehabilitation Medicine, the 1st Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】Objective To determine whether or not 810 nm low power Ga-Al-As laser treatment can stimulate the regeneration of damaged optic nerves by measuring the expression of growth associated protein 43 (GAP-43) and flash-visual evoked potential (F-VEP). **Methods** Eighty-eight Wistar rats weighing (180-220) g were randomly divided into a laser therapy group with 40 rats, an injury group with 32 rats, and a normal control group with 16 rats. Each group was subdivided into 1st, 3rd, 6th and 9th week subgroups. A standardized crushing of the optic nerve was applied to make the model. After this, the laser therapy group was treated for 3 minutes daily at 60 mW applied transcutaneously to a 5 mm diameter spot on the injured optic nerve. The injury and normal control groups received the same treatment with no laser output. The expression of GAP-43 was detected by immunohistochemistry and RT-PCR after 1, 3, 6 and 9 weeks of treatment. F-VEP was measured pre-injury, immediately after injury and 1, 3, 6 and 9 weeks post injury. **Results** After the optic nerve was injured, obvious changes in F-VEP were detected, including significantly prolonged latencies of N1, P1 and N2 waves. The latency increased immediately after the optic nerve injured, and then recovered, but after 1 and 3 weeks the latency was still prolonged. There was significant recovery from the 3rd to the 9th week. In the laser therapy group, the peak latencies of the N1, P1 and N2 waves were also prolonged, but the changes were less than those in the injury group. Expression of GAP-43 was hardly detectable in normal retinas and optic nerves. GAP-43 had its highest expression level at 1 week post-injury, and then decreased. At the 1st, 3rd and 6th week post-injury, the expression of GAP-43 in the laser therapy group was significantly higher than in the injury group. GAP-43 mRNA content in the retina showed the same tendency as GAP-43 protein. **Conclusion** A 810 nm low power Ga-Al-As laser can promote neural repair and axonal regeneration after optic nerve injury.

【Key words】 Lasers; Optic nerve injury; Growth associated protein-43; Flash-visual evoked potential

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.09.007

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (20061007)

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学附属第一医院康复医学科 (林阳阳、苑秀华、周方倩、王中莉、刘苗苗); 厦门大学附属第一医院康复医学科 (林振原)

颅脑外伤合并视神经损伤的发生率约为 0.5% ~ 5%^[1]。随着交通运输、建筑及体育等事业的发展,其发病率有增加的趋势,视神经挫伤造成的不可逆的视力丧失更加突出。视网膜神经节细胞及视神经属中枢神经系统,神经节细胞作为中枢神经,其胞体在视网膜的内层,轴突长入脑的特殊部位^[2-3]。如同其他的中枢神经损伤一样,视神经损伤后很难再生。已有大量研究视神经损伤后再生的方法,如注射生长因子^[4-5]、阻断 LINGO-1 功能^[6]、移植神经干细胞^[7]、损伤晶状体^[8]、注射 B 型链球菌外毒素^[9]等方法可以提高视神经的再生能力。但在众多治疗方法中,物理因子成为不容忽视的促进神经再生的治疗方法。近年来,国外已有报道经角膜电刺激^[10-11]、经瞳孔激光^[12-13]及高压氧^[14]等治疗有助于视神经的再生。对视神经挫伤后激光治疗的研究,仅有应用经瞳孔激光治疗的报道,但神经修复所需的能量远远大于视网膜损伤的阈值^[15]。本实验构建视神经钳夹伤的模型,并对受损神经局部经皮应用 810 nm 低能量镱铝砷 (Ga-Al-As) 激光持续照射治疗,通过生长相关蛋白-43 (growth associated proteins-43, GAP-43) 和闪光视觉诱发电位 (flash-visual evoked potential, F-VEP) 的检测,探讨经皮激光治疗能否促进视神经损伤后的神经修复与再生,为临床应用提供理论依据。

材料与方法

一、动物及分组

健康成年 Wistar 大鼠 88 只 (中国医科大学实验动物部提供), 体重 180 ~ 220 g, 雌雄不拘。分成激光治疗组 40 只, 单纯损伤组 32 只, 正常对照组 16 只, 每组又分为 1, 3, 6, 9 周 4 个时间点, 激光治疗组每个时间点 10 只, 单纯损伤组每个时间点 8 只, 正常对照组每个时间点 4 只。

二、模型制备

用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 (5 ml/kg 体重) 满意后, 在无菌条件及手术显微镜下, 环形剪开右眼外眦部球结膜, 打开 Tenon's 囊, 钝性分离悬韧带, 向前牵拉眼球, 暴露视神经, 自球后视神经约 2 mm 处, 用动脉夹 (上海产, 持力为 40 g) 持续夹持视神经 15 s 造成损伤, 观察到伤眼瞳孔散大后, 清洗伤口, 缝合球结膜。待麻醉苏醒后回笼饲养。术后第 2 天伤眼出现 Marcus-gun 瞳孔 (瞳孔直接对光反射消失, 间接对光反射存在), 眼球无明显突出, 检眼镜观察眼底无明显出血者为成功模型^[16]。

三、激光治疗

采用北京产 LXW 810 nm 激光半导体治疗仪进行激光治疗, 照射光导子直径为 5 mm。激光治疗组在视

神经夹伤造模成功后立即进行激光照射, 治疗前将大鼠轻度麻醉, 光导子对准外眦, 经皮照射, 避开瞳孔, 每次使用前用激光功率计检测激光器的功率输出, 激光治疗参数为治疗强度 60 mW, 持续时间 3 min, 能量密度 13.76 J/cm², 每日 1 次, 按分组情况分别进行 1, 3, 6, 9 周的激光照射。单纯损伤组及正常对照组在进行激光照射时, 激光器无功率输出。

四、闪光视觉诱发电位测定

F-VEP 测定采用肌电图诱发电位仪 (上海产), 分别测定大鼠损伤前、损伤即刻以及治疗 1, 3, 6, 9 周后右眼 N1、P1、N2 波的潜伏期。测量方法: 暗室内适应 30 min 后用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 用碘伏消毒大鼠头部, 分别在枕骨粗隆 (两耳连线与正中中线交点) 放置记录电极, 两外眦连线的中点放置刺激电极, 左侧耳后皮肤放置接地电极。用黑布遮蔽大鼠左眼, 闪光刺激右眼, 刺激频率 2 Hz, 分别叠加 100 次, 排除溢出波形连续测量至少 3 次, 并选出稳定波形 3 条。

五、逆转录-聚合酶链反应检测

分别于治疗 1, 3, 6, 9 周后, 用 10% 水合氯醛 (10 ml/kg 体重) 腹腔注射深度麻醉大鼠后开颅取视神经。摘除眼球, 在手术显微镜下预冷到 4℃ 的 PBS 缓冲液中于角膜缘后 2 mm 处切开, 去除眼前节, 轻剥离视网膜至视神经处剪除。将标本放入液氮中保存, 次日放入 -70℃ 冰箱中保存至检测时。用于做免疫组化的视神经和视网膜, 直接放入 10% 多聚甲醛固定。

从基因文库中检索大鼠生长相关蛋白 (GAP-43 mRNA), β -肌动蛋白 (β -actin), 应用 Primers 5.0 软件设计引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。上游引物 5'-ATGCTGTGCTGTAT-GAGAAGAACC-3', 下游引物 5'-GGCAACGTG-GAAAGCCGTTTCTTAAAGT-3', 扩增片段为 708 bp, 内参照物 β -actin 上游引物为 5'-TAAAGACCTCTAT-GCCAACAC-3', 下游引物为 5'-TAAAGCCATGCCTA-ATGTCTC 3', 扩增片段为 357 bp。大鼠视网膜组织匀浆, 按照 Trizol 试剂说明书步骤抽提组织总 RNA。所得 RNA 进行定量和纯度分析, 取 2 μ l RNA 在 20 μ l 体系中逆转录成 cDNA 模板, 用于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测。反应程式: 98℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环结束后降至 4℃。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳并成像分析, 以 Image J 软件 (NIH) 对产物条带吸光度值进行计算。结果以“目的基因灰度值/ β -actin 灰度值”比值表示。

六、免疫组织化学染色

免疫组织化学染色采用链霉亲和素 (streptavidin-

biotin complex, SABC) 法。免疫组织化学染色主要步骤:①切片常规脱蜡至水;②3% 过氧化氢-甲醇室温下孵育 10 min;③抗原修复;④封闭液封闭;⑤滴加适当比例稀释的一抗(羊抗 GAP-43 多克隆抗体 IgG 1:200), 4℃ 冰箱内过夜。以 PBS 代替一抗作阴性对照;⑥滴加生物素标记的二抗, 37℃, 孵育 1 h;⑦ DAB 显色, 显微镜下观察;⑧苏木素复染;⑨置梯度酒精脱水, 二甲苯透明, DPX 封片。每只大鼠随机选 3 张切片, 视神经切片随机取视神经周边区、旁中心区和中心区 3 个视野($\times 400$), 视网膜切片随机选 10 个高倍视野($\times 400$), 用 MetaMorph/DPI0/BX41 图像分析系统分析视网膜和视神经的免疫反应阳性物质平均积分光密度值(average integrated optical density, AIOD)。

七、统计学分析

数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 13.0 版统计软件包进行数据处理分析及 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、F-VEP 测定

大鼠 F-VEP 波形表现为 NPN 型, 即首先出现一个向上的正波 N1, 接着出现一个向下的较大的负波 P1, 最后再出现一个正波 N2, 在最后一个正波后面有一些不规则的后发波形。大鼠视神经损伤后 N1、P1、N2 波潜伏期延长, 在视神经损伤即刻, 潜伏期瞬间下降, 随后有所恢复。但是 1~3 周仍进行性下降, 3 周时下降明显, 随后有所恢复。N1 波在激光治疗 1, 3 周时与单纯损伤组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 但在治疗 6, 9 周后激光治疗组与单纯损伤组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。P1 波在激光治疗 1, 3, 6, 9 周时与单纯损伤组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 单纯损伤组与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。N2 波在激光治疗 1, 3 周时与单纯损伤组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 总的趋势说明激光可以改善视神经的传导速度。详见表 1。

二、RT-PCR 结果

表 2、图 1、图 2 显示, 视神经损伤后, 视网膜内的 GAP-43mRNA 含量在 1 周内达到高峰, 随后下降明显, 激光治疗可以明显延迟 GAP-43mRNA 的下降, 激光治疗组在治疗 1, 3, 6 周后 GAP-43mRNA 表达明显高于同一时间点单纯损伤组($P < 0.05$), 但是 9 周时, 激光治疗组与单纯损伤组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 说明激光治疗可以增加视网膜 GAP-43mRNA 的表达。

表 1 各组大鼠损伤前、损伤即刻及治疗 1, 3, 6, 9 周后 F-VEP 比较(ms, $\bar{x} \pm s$)

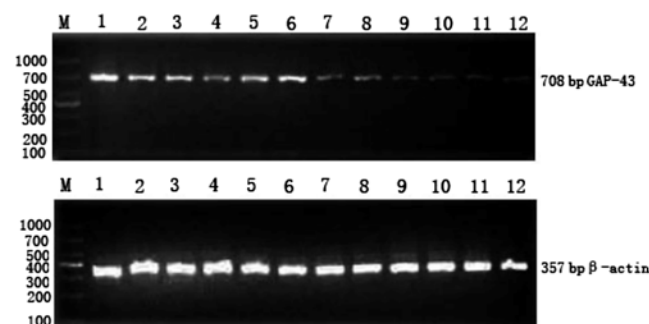
组 别	只数	N1	P1	N2
激光治疗组	40			
损伤前	40	54.91 $\pm$ 9.06	72.39 $\pm$ 9.10	90.87 $\pm$ 6.40
损伤即刻	40	82.59 $\pm$ 17.49 ^c	92.01 $\pm$ 14.53 ^c	125.88 $\pm$ 9.59 ^c
治疗 1 周	10	60.67 $\pm$ 10.4 ^a	93.91 $\pm$ 8.56 ^a	101.13 $\pm$ 8.56 ^a
治疗 3 周	10	71.25 $\pm$ 9.85 ^a	98.30 $\pm$ 9.55 ^a	111.96 $\pm$ 7.40 ^a
治疗 6 周	10	69.40 $\pm$ 5.12	82.57 $\pm$ 9.15 ^a	105.79 $\pm$ 4.94
治疗 9 周	10	63.90 $\pm$ 18.63	79.25 $\pm$ 8.94 ^a	97.50 $\pm$ 11.7
单纯损伤组	32			
损伤前	32	54.48 $\pm$ 11.23	73.56 $\pm$ 6.30	88.83 $\pm$ 4.75
损伤即刻	32	87.20 $\pm$ 12.71 ^c	97.52 $\pm$ 13.67 ^c	123.44 $\pm$ 12.02 ^c
治疗 1 周	8	68.38 $\pm$ 12.13 ^b	85.61 $\pm$ 7.21 ^b	103.27 $\pm$ 4.96 ^b
治疗 3 周	8	82.14 $\pm$ 9.51 ^b	112.2 $\pm$ 12.11 ^b	133.23 $\pm$ 9.67 ^b
治疗 6 周	8	69.60 $\pm$ 7.38 ^b	97.30 $\pm$ 8.36 ^b	107.95 $\pm$ 3.13 ^b
治疗 9 周	8	64.49 $\pm$ 4.97 ^b	94.18 $\pm$ 8.95 ^b	104.90 $\pm$ 9.14 ^b
正常对照组	16			
治疗 1 周	4	56.20 $\pm$ 9.21	69.48 $\pm$ 8.72	91.47 $\pm$ 10.24
治疗 3 周	4	57.11 $\pm$ 7.11	70.02 $\pm$ 10.60	93.35 $\pm$ 11.14
治疗 6 周	4	58.34 $\pm$ 6.13	69.55 $\pm$ 9.50	92.89 $\pm$ 9.33
治疗 9 周	4	59.24 $\pm$ 8.22	71.23 $\pm$ 9.20	94.56 $\pm$ 10.76

注: 与单纯损伤组同一时间点相比, ^a $P < 0.05$, 与正常对照组同一时间点相比, ^b $P < 0.05$, 与组内损伤前相比, ^c $P < 0.01$

表 2 各组视网膜 GAP-43mRNA 表达(目的基因灰度值/ β -actin 灰度值的比值, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	治疗 1 周	治疗 3 周	治疗 6 周	治疗 9 周
激光治疗组	20	0.77 $\pm$ 0.06 ^a	0.62 $\pm$ 0.03 ^a	0.57 $\pm$ 0.02 ^a	0.50 $\pm$ 0.06
单纯损伤组	16	0.61 $\pm$ 0.02 ^b	0.49 $\pm$ 0.05 ^b	0.42 $\pm$ 0.04 ^b	0.38 $\pm$ 0.07 ^b
正常对照组	8	0.29 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.10

注: 与单纯损伤组视网膜中 GAP-43mRNA 表达相比, ^a $P < 0.05$, 与正常对照组视网膜中 GAP-43mRNA 表达相比, ^b $P < 0.05$



注: M 为 DNA Marker 带, 1~4 分别为治疗 1, 3, 6, 9 周的激光治疗组, 5~8 分别为治疗 1, 3, 6, 9 周的单纯损伤组, 9~12 分别为治疗 1, 3, 6, 9 周的正常对照组

图 1 各组大鼠治疗 1, 3, 6, 9 周后视网膜 GAP-43mRNA 的表达

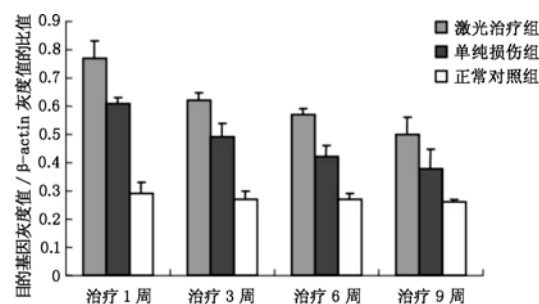


图 2 GAP-43mRNA 的半定量分析($\bar{x} \pm s$)

三、免疫组化结果

如表 3、图 3 所示,正常视网膜组织中 GAP-43 几乎不表达,单纯损伤组可以看出 GAP-43 蛋白的含量在 1 周时达到高峰,并且在神经节细胞层、内外网状层和内外核层都有表达,随后下降,激光治疗后 1,3,6 周与同一时间单纯损伤组相比 GAP-43 蛋白的含量有所提高($P < 0.05$),但是 9 周激光治疗组与 9 周单纯损伤组相比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明激光治疗可以提高视网膜 GAP-43 蛋白的表达,与 GAP-mRNA 的表达一致。如图 4、表 3 所示,正常视神经几乎无 GAP-43 的表达,损伤后可增加其表达的量,在激光治疗组可以看见大量的轴突着色,并且表达的趋势和同一时间视网膜 GAP-43 蛋白表达一致,损伤后 1 周内达到高峰,随后下降。说明激光治疗可以增加

表 3 激光治疗组与单纯损伤组视网膜及视神经 GAP-43 蛋白表达(平均积分光密度, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	视网膜	视神经
激光治疗组	20		
治疗 1 周	5	0.334 ± 0.016^a	0.360 ± 0.0148^b
治疗 3 周	5	0.316 ± 0.011^a	0.276 ± 0.025^b
治疗 6 周	5	0.276 ± 0.015^a	0.227 ± 0.027^b
治疗 9 周	5	0.246 ± 0.017	0.220 ± 0.019
单纯损伤组	16		
治疗 1 周	4	0.281 ± 0.010	0.259 ± 0.012
治疗 3 周	4	0.262 ± 0.008	0.243 ± 0.027
治疗 6 周	4	0.255 ± 0.011	0.217 ± 0.012
治疗 9 周	4	0.235 ± 0.010	0.205 ± 0.043

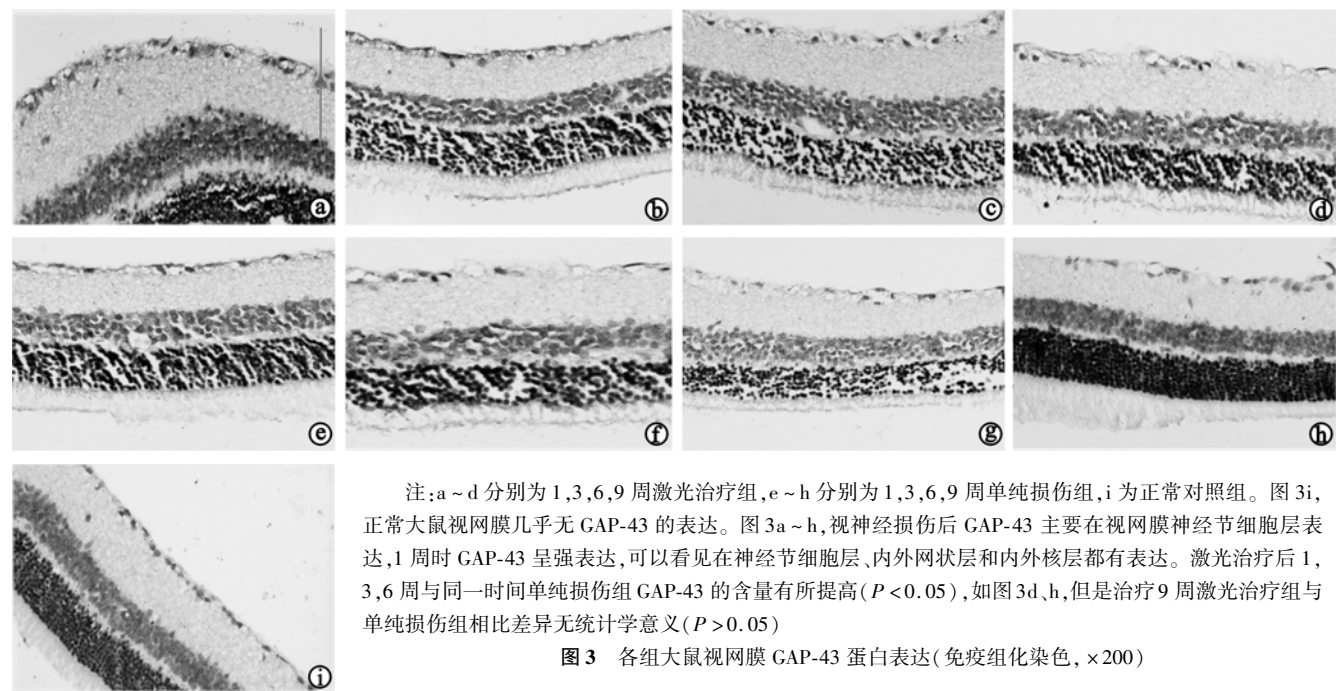
注:与单纯损伤组同一时间点视网膜中 GAP-43 表达相比,^a $P < 0.05$,与单纯损伤组视神经中 GAP-43 表达相比,^b $P < 0.05$

视神经 GAP-43 蛋白的表达,有助于视神经的再生。

讨 论

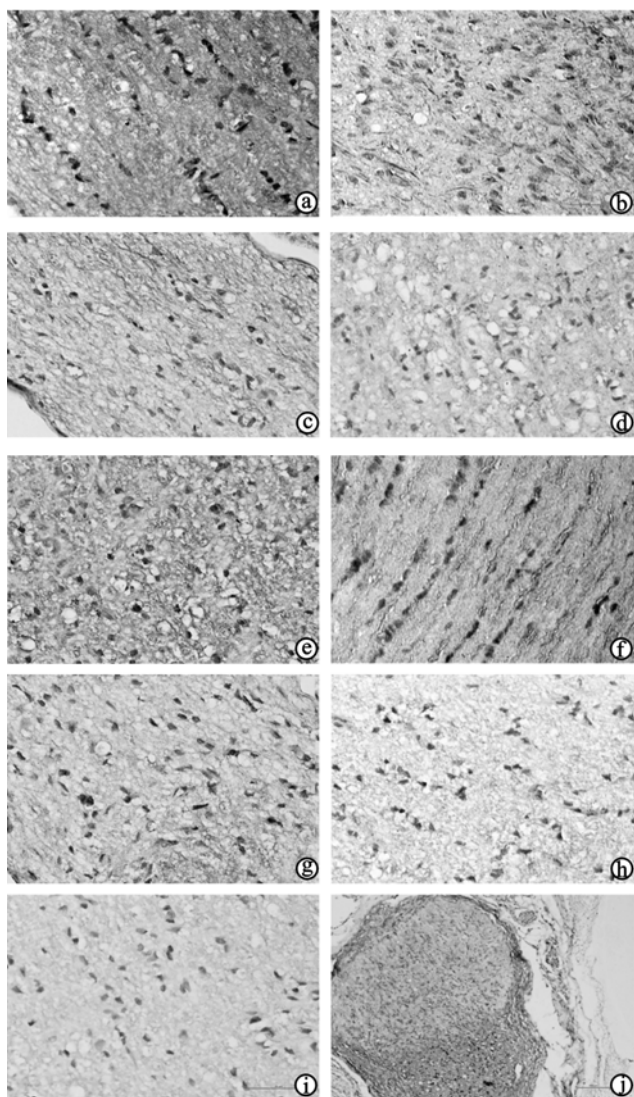
应用低强度激光或发光二极管,波长为远红外到近红外光(630 ~ 1000 nm)的低能量光子辐射可以调节多种细胞内生物学过程^[17],如细胞增殖、胶原合成和生长因子的释放^[18]。这种光的生物学刺激现象可以加速创伤的愈合和缺血心肌的恢复^[19-20]。文献报道红光至近红外光的在细胞水平上的生物学刺激作用可能归因于其对线粒体呼吸链的部分激活,以及由此引起的细胞增殖^[17,21];Karu^[17]证明细胞色素氧化酶是红光和近红光的主要光受体。

本研究应用 810 nm 的低能量激光经皮局部治疗,治疗参数为 60 mW,3 min,照射直径 5 mm,每日 1 次激光治疗,并运用神经生理学方法,分别在基因和蛋白水平上证明低能量镱铝砷激光可以促进视神经钳夹伤后的再生。Ma 等^[13]应用 810 nm 二极管激光器经瞳孔照射治疗视神经损伤,治疗参数 60 mW,持续 60 s,照射直径 500 μm ,分别给予 7,14,28 d 的照射,结果显示激光照射可以显著提高视网膜神经节细胞的存活率。虽然该研究应用电镜观察 60 mW,60 s 的经瞳孔照射对视神经及外周视网膜没有影响,但是已有文献报道神经修复所需的能量远远大于视网膜损伤的阈值^[15]。所以研究中我们将治疗方式改进为经皮对损伤局部进行激光治疗。研究的结果显示,经皮激光治疗可以缩短 F-VEP 的 N1,P1,N2 波潜伏期,增加视神经挫伤后视网膜及视神经 GAP-43 的表达。



注:a~d 分别为 1,3,6,9 周激光治疗组,e~h 分别为 1,3,6,9 周单纯损伤组,i 为正常对照组。图 3i,正常大鼠视网膜几乎无 GAP-43 的表达。图 3a~h,视神经损伤后 GAP-43 主要在视网膜神经节细胞层表达,1 周时 GAP-43 呈强表达,可以看见在神经节细胞层、内外网状层和内外核层都有表达。激光治疗后 1,3,6 周与同一时间单纯损伤组 GAP-43 的含量有所提高($P < 0.05$),如图 3d、h,但是治疗 9 周激光治疗组与单纯损伤组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)

图 3 各组大鼠视网膜 GAP-43 蛋白表达(免疫组化染色, $\times 200$)



注:a~d 分别为 1,3,6,9 周激光治疗组,e~h 分别为 1,3,6,9 周单纯损伤组,i 为正常对照组,j 为 9 周激光治疗组($\times 200$)。图 4i 正常大鼠视神经几乎无 GAP-43 的表达,图 4e,视神经损伤后 1 周 GAP-43 呈强阳性表达,可见大量轴突染成深棕黄色。激光治疗后 1,3,6 周与同一时间单纯损伤组 GAP-43 的含量有所提高($P < 0.05$),图 4b,f,在治疗后 3 周可见视神经内纤维束着色,但是激光治疗组表达的明显多于单纯损伤组。图 4d,h,治疗 9 周后激光治疗组与单纯损伤组相比较无统计学意义($P > 0.05$)。图 4j 提示视神经损伤后,在轴突的近端 GAP-43 表达较少,远端较多

图 4 各组大鼠视神经 GAP-43 蛋白表达(免疫组化染色, $\times 400$)

我们运用 F-VEP 观察大鼠视功能的恢复,F-VEP 是视网膜受闪光或图形刺激后,在枕叶视皮质产生的电活动。VEP 是眼科常用的电生理检查,从视网膜到视皮质任何部位神经纤维病变都可产生异常的 VEP,因此能够客观地评价视路的功能状态^[22]。F-VEP 在一定的光强刺激下,当刺激频率 < 4 次/s 都可以记录到典型的 3~5 个峰的波形,前 3 个波为初发反应,以后为继发反应。初发反应是 F-VEP 的主要观察部分,我们引出的大鼠的 F-VEP 的波形为典型的 NPN 波

形^[23-24]。理论上讲,F-VEP 的峰潜伏期主要是反映视神经的传导机能,振幅主要反映视网膜的感受机能^[25]。视神经损伤,不仅引起了传导障碍,同时也由于 RGCs 的逆行性变性而影响了视网膜的功能。VEP 的改变与视神经的损伤程度相一致,是真正能体现视神经状态的功能指标^[26]。因此,本实验采用 F-VEP 以评价大鼠视神经的损伤及功能恢复情况。外伤性视网膜病变的 VEP 改变与视神经损害程度是相一致的。外伤后如果 F-VEP 的振幅降低 $< 50\%$,不伴有潜伏期的延长,则 67% 的眼视力预后可达 0.1 以上,36% 的眼视力会 > 0.5 ;如果 F-VEP 的振幅降低达 50%,或潜伏期延长 30 ms 以上,则 94% 眼日后会发展成失明^[23]。因为 VEP 的振幅变异很大,不仅个体之间,而且同一人在不同时间里记录的结果也有很大不同^[24]。因此,研究中我们对 F-VEP 的 N1,P1,N2 波潜伏期进行测量。本实验发现轴突损伤即刻 N1,P1,N2 波潜伏期下降明显,在随后的 1 周潜伏期有所恢复,表明视神经损伤后,存在一定的自我修复功能,但是损伤后 1 周还在进行性下降,考虑此现象的出现,可能是钳夹伤后的视神经处于急性水肿期,RGCs 的轴突传导功能下降。3 周后有所恢复,但 9 周后仍不能恢复到正常,尽管由于个体的差异,N1,P1,N2 波在激光治疗组和单纯损伤组潜伏期的变化不同,但是总的趋势为低能量激光治疗后,激光治疗组与对照组相比潜伏期缩短,证实激光治疗有助于视功能的恢复。

研究中我们发现,低能量的激光治疗可以增加视网膜神经节细胞表达 GAP-43。GAP-43 是一种镶嵌在细胞骨架上的磷蛋白^[27],作为神经元发育、神经生长、再生、突触形成和重建的标志性蛋白,在神经生长和发育区表达非常丰富^[28]。近年研究表明,GAP-43 与神经系统的发育、突触形成、可塑性及神经再生有密切关系,在引导轴突生长和调节轴突形成新的联系上起关键作用,因此受到普遍重视^[29]。在视神经轴突生长和突触形成时,视网膜神经节细胞表达 GAP-43 增加,发育成熟时减少^[22,30-31]。神经元轴突转运 GAP-43 仅仅产生于损伤后再生的突触中,在活体动物 GAP-43 与轴突生长和再生有紧密的连锁关系,作为蛋白激酶 C 的基质介导 NGF 信号通道^[32]。与先前的研究结果相似,本研究结果显示,损伤后 1 周视网膜与视神经中的 GAP-43 的含量达到最高,随后降低,视网膜与视神经中 GAP-43 呈强阳性表达,这可看作是视神经对损伤的反应。视神经轴突受损伤后,启动了一系列视网膜神经节细胞胞体的反应,包括核质的增加、RNA 及蛋白合成的启动、轴突芽生引发的 GAP-43 重新表达等。本研究中 GAP-43 基因水平表达与蛋白水平表达在时间上的一致性也证实了这一点。激光治疗可以显著增加

GAP-43 的表达,但是我们发现,在激光治疗 9 周后视网膜、视神经 GAP-43 的表达在基因和蛋白水平与单纯损伤组相比较无统计学意义。Shin 等^[33]的研究中也发现经过低能量激光治疗后可以提高损伤的坐骨神经轴突中 GAP-43 表达的含量,但是持续治疗 5 周后,激光治疗组与对照组相比较差异无统计学意义,所以对于激光的远期治疗效果有待于进一步研究。

总之,本实验结果表明,应用低能量 810 nm 镱铝砷半导体激光治疗可以改善视神经挫伤后的视功能的恢复,增加视网膜和视神经 GAP-43 的表达,但是确切的机制还不清楚,推测可能与低能量激光激活视神经巨噬细胞的吞噬作用、星形胶质细胞释放神经营养物质等有关,有待于进一步实验证实。

参 考 文 献

- [1] Ott I, Schwager K, Hagen R, et al. Traumatic optic neuropathy: a review of the literature in the light of personal experiences. *Laryngorhinootologie*, 2010, 89: 647-652.
- [2] Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, et al. Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24: 656-672.
- [3] Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration of adult injured central nervous system neurons in vivo. *J Neurochem*, 2005, 93: 72-83.
- [4] Pernet V, Di Polo A. Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy in vivo. *Brain*, 2006, 129: 1014-1026.
- [5] Douglas MR, Morrison KC, Jacques SJ, et al. Off-target effects of epidermal growth factor receptor antagonists mediate retinal ganglion cell disinhibited axon growth. *Brain*, 2009, 132: 3102-3121.
- [6] Fu QL, Hu B, Wu W, et al. Blocking LINGO-1 function promotes retinal ganglion cell survival following ocular hypertension and optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49: 975-985.
- [7] McDonald JW, Howard MJ. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. *Prog Brain Res*, 2002, 137: 299-309.
- [8] Lorber B, Berry M, Logan A. Lens injury stimulates adult mouse retinal ganglion cell axon regeneration via both macrophage- and lens-derived factors. *Eur J Neurosci*, 2005, 21: 2029-2034.
- [9] Ohlsson M, Mattsson P, Wamil BD, et al. Macrophage stimulation using a group B-streptococcus exotoxin (CM101) leads to axonal regrowth in the injured optic nerve. *Restor Neurol Neurosci*, 2004, 22: 33-41.
- [10] Ni YQ, Gan DK, Xu HD, et al. Neuroprotective effect of transcorneal electrical stimulation on light-induced photoreceptor degeneration. *Exp Neurol*, 2009, 219: 439-452.
- [11] Morimoto T, Miyoshi T, Matsuda S, et al. Transcorneal electrical stimulation rescues axotomized retinal ganglion cells by activating endogenous retinal IGF-1 system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 2147-2155.
- [12] Fernández E, Avilés-Trigueros M. Transpupillary thermotherapy: new observations on neuroprotection of retinal ganglion cells. *Neurosci Lett*, 2010, 476: 1-2.
- [13] Ma J, Jiang L, Zhong Y, et al. Neuroprotective effect on retinal ganglion cells by transpupillary laser irradiation of the optic nerve head. *Neurosci Lett*, 2010, 476: 3-8.
- [14] Wang R, Xu J, Xie J, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning promotes survival of retinal ganglion cells in a rat model of optic nerve crush. *J Neurotrauma*, 2010, 27: 763-770.
- [15] Sliney D, Wolbarsht M. Safety with laser and other optical sources. New York: Plenum Press, 1980: 293.
- [16] Wang H, Liu ZL, Zhuang XT, et al. Neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin on optic nerve injury in rats. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122: 2008-2012.
- [17] Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*, 2010, 62: 607-610.
- [18] Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, et al. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*, 2001, 19: 29-33.
- [19] Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *J Clin Laser Med Surg*, 2003, 21: 67-74.
- [20] Oron U, Yaakobi T, Oron A, et al. Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low-energy laser irradiation. *Lasers Surg Med*, 2001, 28: 204-211.
- [21] Wong-Riley MT, Bai X, Buchmann E, et al. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport*, 2001, 12: 3033-3037.
- [22] Ohlsson M, Svensson M. Early decompression of the injured optic nerve reduces axonal degeneration and improves functional outcome in the adult rat. *Exp Brain Res*, 2007, 179: 121-130.
- [23] 杨培增, 陈家祺. 眼科学基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 241-243.
- [24] 宋振英. 眼科诊断学. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 206-209.
- [25] 王焯, 郭守一. 临床电生理学. 西安: 陕西科学技术出版社, 1993: 105-108.
- [26] 吴乐正, 吴德正. 临床视觉电生理. 北京: 科学出版社, 1999: 330-349.
- [27] Nozumi M, Togano T, Takahashi-Niki K, et al. Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 17211-17216.
- [28] Oh SJ, Kim KY, Lee EJ, et al. Inhibition of nitric oxide synthase induces increased production of growth-associated protein 43 in the developing retina of the postnatal rat. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 136: 179-183.
- [29] Korshunova I, Mosevitsky M. Role of the growth-associated protein GAP-43 in NCAM-mediated neurite outgrowth. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 663: 169-182.
- [30] Hauk TG, Leibinger M, Müller A, et al. Stimulation of axon regeneration in the mature optic nerve by intravitreal application of the toll-like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51: 459-464.
- [31] Su Y, Wang F, Teng Y, et al. Axonal regeneration of optic nerve after crush in Nogo66 receptor knockout mice. *Neurosci Lett*, 2009, 460: 223-226.
- [32] Holahan M, Routtenberg A. The protein kinase C phosphorylation site on GAP-43 differentially regulates information storage. *Hippocampus*, 2008, 18: 1099-1102.
- [33] Shin DH, Lee E, Hyun JK, et al. Growth-associated protein-43 is elevated in the injured rat sciatic nerve after low power laser irradiation. *Neurosci Lett*, 2003, 344: 71-74.

(修回日期: 2011-03-08)

(本文编辑: 松 明)