论文

高浓度葡萄糖对C57小鼠视网膜神经节细胞的视觉反应特性的影响——一项离体生理研究

周源¹, 肖春霞^{2*}, 濮鸣亮^{1*}

1. 北京大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系, 北京 100191;

2. 湖南师范大学第一附属医院湖南省人民医院马王堆院区, 长沙 410005

* 联系人, E-mail: xiaochunxia-2006@163.com; mpu@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2017-08-20; 接受日期: 2017-09-10; 网络版发表日期: 2017-11-18

摘要 本研究旨在观察视网膜神经节细胞在高浓度葡萄糖下的视觉反应特性. 实验中, 视杯平铺于记录腔, Ames缓冲液灌流, 单细胞外记录小鼠(*Mus musculus*)视网膜神经节细胞. 实验结果表明, 高糖条件下, ON神经节细胞的平均感受野大小(34.1 ± 2.9 , $n=14$)明显小于OFF神经节细胞的(49.3 ± 0.3 , $n=12$) ($P<0.0001$). 高渗条件下, 可以观察到类似的模式, 即ON神经节细胞的平均感受野大小小于OFF的($P<0.0001$). ON神经节细胞的平均亮度阈值在高糖($P<0.0001$)或者高渗($P<0.0002$)条件下明显升高. OFF神经节细胞的平均亮度阈值在相同条件下(高糖: $P<0.01$; 高渗: $P<0.0002$)也有升高. 在高渗条件下, ON神经节细胞的平均对比增益明显低于OFF神经节细胞的($P<0.015$). 而在高糖条件下, ON神经节细胞的平均增益明显高于OFF神经节细胞的($P<0.0001$). 这些结果表明, 高糖可缩小神经节细胞的感受野, 降低亮度敏感度, 减弱对比增益. 高糖对ON和OFF神经节细胞的影响可能是通过不同的机制进行的.

关键词 视网膜神经节细胞, 高葡萄糖, 高甘露醇, 感受野中心大小, 亮度阈值, 对比度阈值

糖尿病在全球的患病率很高, 并且还在快速增长. 糖尿病视网膜病(diabetic retinopathy, DR)是导致工作年龄人群第一位的致盲性疾病. 糖尿病患者的视网膜最明显的形态改变是其血管的改变. 半个世纪前人们就认识到糖尿病在视网膜病中的作用^[1]. 然而近年来, 人们逐渐认识到糖尿病视网膜病不仅是一种血管病变, 视网膜神经元和神经胶质细胞的改变在整个疾病过程中可能也发挥着某些作用. 人们从精神物理、生理学、分子生物学、病理学、表观遗传学和形态学等不同侧面对糖尿病过程中视网膜神经元功能进行

了大量研究^[2-6]. 然而对糖尿病早期导致视觉功能障碍和失明的神经机制的研究却很少. 神经节细胞(retina ganglion cells, RGCs)是脊椎动物视网膜的最后一级神经元, 输出视网膜的最终信号. 这些细胞汇集视网膜内丛状层(inner plexiform layer, IPL) ON和OFF亚层的电信号, 而这些电信号来自视网膜中前级神经细胞对视觉信号的处理. 垂直通路(光感受器到双极细胞到神经节细胞链)和水平通路(光感受器到水平细胞到双极细胞到无长突细胞到神经节细胞链)上的神经元完成了大部分的信息处理, 最后将信号传到神经节细胞,

引用格式: 周源, 肖春霞, 濮鸣亮. 高浓度葡萄糖对C57小鼠视网膜神经节细胞的视觉反应特性的影响——一项离体生理研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1212–1219, doi: [10.1360/N052017-00182](https://doi.org/10.1360/N052017-00182)

英文版见: Zhou Y, Xiao C, Pu M. High glucose levels impact visual response properties of retinal ganglion cells in C57 mice—An *in vitro* physiological study. Sci China Life Sci, 2017, in press, doi: [10.1007/s11427-017-9106-6](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9106-6)

神经节细胞再将视网膜内的信息传送到大脑. 大量的研究发现, 血糖升高(血中葡萄糖的浓度增高, 即高糖)影响视网膜的功能. 高糖可促进OLETF大鼠(*Rattus norvegicus*)视网膜内A β (1-42)积累^[7], 而离体培养视网膜的神经节细胞中高糖可使Nrf2, HO-1和 γ -GCS的表达降低, 引起神经节细胞的凋亡^[8-10]. RGC-5细胞系暴露于高糖条件下可激活ERK1/2和JNK MAPK信号通路^[11], 导致线粒体功能紊乱^[12,13]. 有离体实验显示, 对高糖培养的视网膜细胞抗氧化处理可降低神经节细胞的死亡^[14]. 高糖可增强糖尿病大鼠的胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达^[15], 改变促炎性细胞因子在大鼠视网膜内的分布模式. 其中光感受器、内丛状层和神经节细胞较容易发生相应的改变^[16]. 本课题组此前的研究也证实了在体外培养的视网膜中, NADPH氧化酶抑制剂对高糖诱导的HO-1表达的抑制作用^[17]. 本课题组还观察到, 糖尿病视网膜病的早期db/db小鼠(*Mus musculus*)的神经节细胞的视觉功能发生损害^[18]. 然而高糖对神经节细胞的即刻作用未见评估, 葡萄糖对视网膜神经环路的直接影响也未见报道. 因此本课题组研究了高浓度的葡萄糖对视网膜神经节细胞视觉功能的影响. 实验结果表明, 高糖会导致神经节细胞感受野缩小, 提高亮度阈值, 并减弱对比增益.

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验使用的实验动物是雌性12周大小的C57BKS/J小鼠, 共64只. 实验动物饲养于12 h明暗交替循环、食物和水可自由采食的清洁级(CL)环境. 使用血糖仪(Accu-Chek active, Roche, 德国)测定动物日常和试验前的血糖水平. 所有的实验执行北京大学实验动物指南和美国视觉与眼科研究协会的眼科和视觉研究实验动物使用要求. 北京大学实验动物伦理与使用委员会核准动物实验流程.

1.2 离体准备

视网膜准备的详细过程按照既往文献报道操作^[18]. 其简要流程为, 实验动物眼球摘除前, 动物先在黑暗环境中暗适应40 min, 在微弱的红光灯下, 沿角巩膜缘后缘小心剪开眼球, 去除晶状体和玻璃

体. 巩膜朝下将视杯平铺在记录腔的底部, 以恒定流速(5 mL/min)灌流充氧(95% O₂/5% CO₂)的Ames缓冲液(A1420, Sigma-Aldrich Corp, 美国). 由于室温下(22°C~24°C)离体记录的神经节细胞接近于在体神经元的反应特性^[19], 因此实验中保持视网膜温度维持在22°C~24°C. 对照组视网膜的灌流液为普通Ames缓冲液, 而高糖组的葡萄糖浓度为30 mmol/L (Ames缓冲液自身含有6 mmol/L, 添加24 mmol/L), 高渗组视网膜的灌流液含有24 mmol/L的甘露醇(M9546, Sigma-Aldrich Corp).

1.3 视觉刺激

由计算机产生的视觉刺激方法参照既往文献报道^[18,20], 其主要过程为, 视觉刺激通过显卡(Matrox Millennium 3000)程序控制分辨率为5"的CRT显示器(Kristel Corp., St. Charles, 美国)产生, 再通过镀膜反射镜和透镜将光投射到显微镜的相机接口. CRT显示器的亮度通过电子辐射计(S370 Radiometer, UDT Instruments, 美国)测定, 其中最大亮度为183 cd/m², 背景亮度约为0.4 cd/m². 本实验使用的物镜为Zeiss 40 $\times$ 水镜(Carl Zeiss, 美国). 通过此物镜到达视网膜表面的最大亮度衰减为0.69 cd/m². 根据500 nm波长的光1 cd/m²=1 lumen/m²=3.68 $\times$ 10³ photons/ μ m²/s可知, 到达视网膜未经滤光的最大辐照度为2.54 $\times$ 10³ photons/ μ m²/s, 背景辐照度为5.55 photons/ μ m²/s. 此光照强度实验中再经中性滤光片(Oriel Corp., 美国)进一步减弱.

1.4 电生理记录及数据分析

全视网膜分别灌流正常Ames缓冲液(对照组)、高糖Ames缓冲液(高糖组)和高渗Ames缓冲液(高渗组). 灌流3 h后再进行相应的电生理记录. 视觉反应细胞外记录电极为玻璃微电极, 信号放大通过细胞内放大器(IR283; Neurodata Inc., 美国), 数模转换通过低噪音的模拟/数字接口(Digidata 1430; Axon Instrument, Inc., 美国). 为荧光显微镜下观察神经元, 使用了细胞核染料(Acridine orange, 0.002%, Sigma-Aldrich), 选择形态为RGA1的细胞记录^[21]. 相关参数的测定方法在本实验室之前发表的文章中有描述^[18,20]. 简单的说, 使用大小为0.2°的检测光斑画出细胞的感受野. 通过面积阈值测定法确定引起细胞最大发放的最优刺激光斑, 然后视网

膜暗适应40 min, 使用最优刺激光斑进行亮度阈值测定. CRT背景光强度和视觉刺激的强度是通过程序控制完成的, 其中背景光强度时, 到达视网膜的光强要减弱到能保持其暗适应状态. 阈值辐照度的标准反应是通过逐渐增强刺激光斑的光照强度获得的, 即在光路上放置滤光能力由大到小的中性密度滤光片以减弱投射到视网膜上的光强. 每秒两个发放的发放速率设定为阈值反应. 如果测试刺激没有产生精确的每秒两个发放, 则通过线性内插法确定阈值. 这种差异也与主观的听觉标准匹配. 根据迈克逊对比度, 移动正弦光栅的对比的定义是: $100 \times ((I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min}))$. 这里的 $I_{\max}$ 和 $I_{\min}$ 分别是波峰和波谷(0~100%)的光强度. 利用常规傅立叶分析法绘制刺激后时间柱状图(peristimulus time histogram, PSTH), 确定刺激频率(主要)和二次谐波的响应分量的振幅. 本课题组还绘制响应量级(sp/deg)对比度曲线, 其中对比度为0.02~0.33 c/deg的8个空间频率, 选择可引起最优反应的空间频率作为对比响应曲线. 对比响应函数利用Michaelis-Menten函数拟合, Michaelis-Menten函数为 $R(\alpha) = \alpha R_{\max} / (\alpha + R_{\max} / G)$, 其中 R 为在对比度为 α 时发放速率减去基线发放速率, G 是对比增益(每秒每百分之一对比度的脉冲数), $R_{\max}$ 是最大发放速率减去基线发放速率. 发放速率 R 对比度呈线性增长, 其中在低对比度时其斜率为 G . 因此斜率 G 被用作评估一个细胞的对比敏感度. 本研究选择光栅对比度小于60%的对比响应曲线的斜率作为 G 值. 获得的数据进一步的进行离线分析(pCLAMP9; Axon Corp., 美国). 利用Microsoft Excel (Microsoft Corp., 美国)进行包括快速傅立叶分析在内的数据分析.

2 实验结果

实验中共记录了12只小鼠共计92个C57BKS/J小鼠视网膜神经节细胞. 高糖处理的视网膜中记录了26个神经节细胞(其中ON 14个, OFF 12个), 高渗处理的视网膜中记录了33个神经节细胞(其中ON 18个, OFF 15个), 正常对照组收集了33个神经节细胞的数据(其中ON 16个, OFF 17个).

2.1 感受野

表1总结了ON和OFF中心神经节细胞的感受野的大小, 其中高糖组ON: $34.1^\circ \pm 2.9^\circ$, $n=14$; OFF:

$49.3^\circ \pm 0.3^\circ$, $n=12$; 高渗组ON: $36.0^\circ \pm 3.0^\circ$, $n=18$; OFF: $49.5^\circ \pm 0.3^\circ$, $n=15$, 对照组ON: $44.8^\circ \pm 2.3^\circ$, $n=16$; OFF: $47.2^\circ \pm 0.7^\circ$, $n=17$. 图1A中ON中心神经节细胞感受野大小在高糖和高渗条件下低于对照组(对照: 44.2° , 高糖 33.5° , 高渗 33.2°), 但是OFF中心神经节细胞的感受野大小在高糖和高渗条件下高于对照组(对照 52.04° , 高糖 77.31° , 高渗 66.28°). 统计分析数据得到图1B, 从图中可以看出, 与对照组相比, 在高糖和高渗灌流的条件下ON中心神经节细胞的平均感受野大小明显缩小, 而OFF中心神经节细胞的平均感受野大小却有小幅扩大. 对照实验条件下, ON和OFF神经节细胞的平均感受野大小有统计学意义上的明显差异($P=0.0003$). 高糖条件下, ON中心神经节细胞的平均感受野明显小于OFF的($P<0.0001$). 高渗条件下, ON中心神经节细胞的平均感受野大小比OFF的有同样减小模式($P<0.0001$). 相较于对照组, ON中心神经节细胞的平均感受野大小在高糖($P<0.0001$)或者高渗($P<0.0001$)条件下有明显缩小. 而OFF中心神经节细胞的平均感受野大小在高糖($P<0.0001$)或者高渗($P<0.0001$)条件下却有明显扩大.

2.2 亮度阈值

实验中选择可诱发最大放电的光斑为测定亮度阈值的刺激光斑. 记录了23个ON (对照8个, 高渗7个, 高糖8个)和25个OFF (对照8个, 高渗9个, 高糖8个)神经节细胞. 图2中每次测阈值至少使用6个不同强度的滤光片. 在光强为 $3.33 \log \text{photons}/\text{lm}^2/\text{s}$ 时, 对照组ON神经节细胞827-C3表现出很好的受光调制的发放模式(图2A). 当辐照度降低至55%($1.84 \log \text{photons}/\text{lm}^2/\text{s}$)时, 此细胞的发放速率也大幅度降低. 图2B评估的是一个高渗组的ON神经节细胞128-C1受视觉刺激诱发发放的模式. 类似的, 当辐照度降低同样的量级时, 细胞的发放速率有更明显的降低. 对于高糖组ON神经

表1 感受野中心区大小^{a)}

	记录的细胞数目		平均感受野直径 (deg)	
	ON	OFF	ON	OFF
对照	16	17	44.8 ± 2.3	47.2 ± 0.7
高甘露醇	18	15	$36.0 \pm 3.0^*$	$49.5 \pm 0.3^*$
高葡萄糖	14	12	$34.1 \pm 2.9^*$	$49.3 \pm 0.3^*$

a): 在ON和OFF型细胞平均感受野直径(deg)之间不存在统计学显著差异

图1 ON和OFF神经节细胞的感受野大小在对照(control)、高渗(HM)和高糖(HG)条件下的变化

A: ON: control (1218-C2, 偏离OD距离0.98 mm); OFF: control (1211-C1, 偏离OD距离1.17 mm); B: ON和OFF神经节细胞感受野大小在高渗和高糖条件下改变情况的直方图. 纵坐标是感受野大小(单位: deg). *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.0001$

节细胞216-C4, 光强为 $3.33 \log \text{photons}/\text{lm}^2/\text{s}$ 时, 此细胞也有类似细胞827-C3的清楚的发放, 但是当辐照度光强降低至55%时, 此细胞只有极弱的对光响应. 对照组OFF中心神经节细胞111-C1表现出强烈的受光调制的发放模式, 当辐照度降低至55%时, 其发放速率明显降低(图2D). 如图2E, 高渗组OFF神经节细胞128-C3有明显的受光调制的发放模式, 当辐照度降低时其响应量级也减低. 高糖组OFF神经节细胞120-C2发放清晰, 但辐照度降低对其发放速率的影响很小(图2F). 图2G分别总结了以上3个ON和OFF神经节细胞的对不同辐照度的响应情况. 由图中可以明显看出, 高糖和高渗大幅度地影响了神经节细胞的亮度响应特性. 结合图2H直方图, 高糖或高渗条件下tc神经节细胞的亮度阈值明显升高. 表2总结了高糖(ON: 1.97 ± 0.34 , $n=8$; OFF: 1.34 ± 0.49 , $n=8$)、高渗(ON: 2.04 ± 0.39 , $n=7$; OFF: 1.43 ± 0.11 , $n=9$)和对照组(ON: 1.02 ± 0.39 , $n=8$; OFF: 0.79 ± 0.18 , $n=8$)的神经节细胞的亮度阈值. 对照组ON和OFF神经节细胞的平均亮度阈值没有统计学意义上的差异($P=0.152$). 高糖组ON神经节细胞的平均亮度阈值高于OFF神经节细胞($P=0.0098$). 同样的, 高渗组的ON神经节细胞的平均亮度阈值高于OFF神经节细胞($P < 0.001$). 图2H的左侧显示, ON神经节细胞的平均亮度阈值受高糖($P < 0.0001$)和高渗($P=0.0002$)的影响而升高. 而图2H的右侧的直方图表明OFF神经节细胞的平均亮度阈值高糖组($P < 0.01$)和高渗组($P < 0.0002$)比对照组也有明显

的升高.

2.3 对比增益

实验中选择正弦调制光栅的最优空间频率记录神经节细胞的发放. 对照组ON神经节细胞216-C4很好地受对比度为60%的光栅调制, 当对比度降低到20%时, 检测到的发放速率大幅降低(图3A). 高渗条件下, ON神经节细胞127-C1受对比度为60%的光栅的调制, 对比度降低时, 其发放速率也降低(图3B). 此细胞对对比度为20%的光栅表现出降低但清晰的响应, 但其自发放一定程度上增多. 高糖条件下, ON神经节细胞120-C4也很好受对比度为60%的光栅的调制, 但当对比度降为20%时, 记录不到细胞的发放(图3C). 对照组OFF神经节细胞216-C2对60%对比度的光栅的刺激发出清脆的发放, 当对比度降为20%时, 细胞表现出受光调制发放降低而自发放增强的模式(图3D). 图3E是高渗条件下OFF神经节细胞111-C2对对比度为60%和20%的反应, 细胞发放幅度几乎不可见. 而高糖处理的OFF神经节细胞126-C3对60%对比度的光栅有很好的受调制模式, 对比度降为20%时, 受调制的发放降低而自发放升高(图3F). 图3G和H总结上述细胞在不同对比度条件的发放情况. 高渗和高糖处理视网膜抑制了神经节细胞的视觉响应, 但OFF细胞表现出更强的耐受性. 图3I中的直方图表明, ON神经节细胞的对比增益在高渗条件下明显降低, 而高糖的影响却没有观

表 2 亮度阈值

感受野中心类型	对照		高甘露醇		高葡萄糖	
	ON	OFF	ON	OFF	ON	OFF
神经节细胞的数目	8	8	7	9	8	8
$\bar{x}\pm SD$	1.02 $\pm$ 0.39	0.79 $\pm$ 0.18	2.04 $\pm$ 0.39	1.43 $\pm$ 0.11	1.97 $\pm$ 0.34	1.34 $\pm$ 0.49

图 2 高渗(HM)和高糖(HG)条件下视网膜神经节辐照度阈值的改变

A: 对照条件下ON神经节细胞827-C3对两种不同辐照度刺激响应的典型发放模式; B: 高渗条件下ON神经节细胞128-C1对两种不同辐照度刺激响应的典型发放模式; C: 高糖条件下ON神经节细胞216-C4对两种不同辐照度刺激响应的典型发放模式; D: 对照条件下OFF神经节细胞111-C1对两种不同辐照度刺激响应的典型发放模式; E: 高渗条件下OFF神经节细胞128-C3对两种不同辐照度刺激响应的典型发放模式; F: 高糖条件下OFF神经节细胞120-C2对两种不同辐照度刺激响应的典型发放模式; G: A~F 6个神经节细胞对不同亮度的响应模式的概要, 纵坐标为响应强度(单位为spikes/s), 横坐标为辐照度水平(单位为log photons/ lm^2/s); H: ON和OFF神经节细胞在对照、高渗和高糖条件下的平均辐照度阈值的直方图, 纵坐标为辐照度阈值(单位为log photons/ lm^2/s). *: $P<0.05$; ***: $P<0.0001$

察到; OFF神经节细胞的对比增益在高渗条件下几乎无变化, 但高糖却可使其降低。表3是图3I的数据, 对照组的ON和OFF神经节细胞的平均对比增益没有明显差异($P=0.595$)。高渗处理的视网膜的ON神经节细胞的平均对比增益低于OFF细胞的($P=0.009$), 而高糖处

理时, ON神经节细胞的平均对比增益高于OFF细胞的($P<0.015$)。与对照相比, 高糖组的ON神经节细胞的平均对比增益几乎没有改变($P=0.7$), 而高渗组的ON神经节细胞的平均对比增益却出现降低($P<0.0006$)。对于OFF神经节细胞, 高糖处理可以降低其平均对比增

表 3 对比增益

感受野中心类型	对照		高甘露醇		高葡萄糖	
	ON	OFF	ON	OFF	ON	OFF
神经节细胞数目	10	10	10	13	10	10
$\bar{x}\pm SD$	12.19 $\pm$ 1.40	13.04 $\pm$ 4.82	6.73 $\pm$ 4.11	12.44 $\pm$ 5.12	11.63 $\pm$ 4.22	2.37 $\pm$ 1.22

图 3 高渗(HM)和高糖(HG)条件下视网膜神经节细胞对比增益的改变

A: 对照条件下, ON神经节细胞216-C4对两种不同对比度的移动光栅刺激的典型发放模式; B: 高渗条件下, ON神经节细胞127-C1对两种不同对比度的移动光栅刺激的典型发放模式; C: 高糖条件下, ON神经节细胞120-C4对两种不同对比度的移动光栅刺激的典型发放模式; D: 对照条件下, OFF神经节细胞216-C2对两种不同对比度的移动光栅刺激的典型发放模式; E: 高渗条件下, OFF神经节细胞111-C2对两种不同对比度的移动光栅刺激的典型发放模式; F: 高糖条件下, OFF神经节细胞126-C3对两种不同对比度的移动光栅刺激的典型发放模式; G: A~C 3个ON神经节细胞对不同对比增益的响应模式的概要, 纵坐标为反应强度(单位为spikes/s), 横坐标为对比度; H: D~F 3个OFF神经节细胞对不同对比度的响应模式的概要, 纵坐标为反应强度(单位为spikes/s), 横坐标为对比度; I: ON和OFF神经节细胞在对照、高渗和高糖条件下平均对比增益的直方图, 纵坐标为对比增益. *: $P<0.05$; ***: $P<0.0001$

益($P<0.0001$), 而高渗处理对其改变不大($P=0.793$).

3 讨论

本实验结果表明, 高浓度葡萄糖会扰乱视网膜神

经环路, 影响神经节细胞的视觉功能. 高糖和高渗对 ON和OFF细胞的影响存在着差异. 高糖和高渗大幅缩小了ON细胞的感受野大小, 而对OFF细胞的感受野影响相对很小. 高糖和高渗对ON和OFF细胞的亮度阈值

的影响表现一致,即升高阈值,这提示渗透压升高是亮度阈值改变的原因.高糖和高渗对ON和OFF细胞的对比增益的影响是不同的.高渗抑制ON细胞的对比增益,而仅轻微地改变OFF细胞的对比增益.高糖对ON细胞的对比增益改变甚轻,但却明显地抑制了OFF细胞的.因此,高糖对视网膜神经环路的影响是多因素的而非简单事件.

3.1 高糖和高渗对视网膜神经环路的影响

如前文所述,已有大量实验证明高糖诱导视网膜分子和细胞功能紊乱,然而高糖对视网膜神经环路的功能的影响此前未见报道.本实验提示高糖和高渗缩小感受野大小(图1),降低亮度敏感度(图2),降低对比增益(图3).其中高糖和高渗对神经节细胞的亮度阈值的影响一致,这提示亮度阈值的改变是由于渗透压提高造成的.本研究中,虽然其程度有不同,但高糖和高渗对视网膜神经节细胞有类似的影响,因此视觉功能的改变可能不能仅归结于高血糖,渗透压的改变也可能是重要因素.但是这些功能失常的神经机制尚不明确.渗透压的升高可能扰乱了细胞膜上的水通道,从而引起视觉功能的恶化.水通道蛋白9(AQP9)是一种表达在视网膜神经节细胞上的水通道^[22-24].AQP9与能量平衡有关,它是甘油-乳酸通道,调节神经节细胞的细胞容积.有实验在RGC-5中检测到渗透压诱导神经元上的AQP9改变^[22].因此本研究中观察到的现象可能是由于AQP9受损引起的.糖尿病人的视网膜不仅直接受高糖高渗的影响,还受到其他因素,如眼内压^[25-27]等的影响,因此在体的视网膜神经环路的变化可能与本实验有差异,需要进一步的具体实验探索.

3.2 高糖和高渗对视网膜神经节细胞功能的影响

(1) 感受野大小.本研究的结果证实高糖和高渗可以改变ON和OFF细胞的感受野的大小.相较于对照组,高糖和高渗条件下ON细胞的平均感受野大小明

显缩小.而对于OFF细胞,平均感受野的大小在高糖和高渗条件下出现增大(图1B).这些结果与本课题组此前在db/db小鼠上观察到的结果一致,即ON细胞的平均感受野缩小,而OFF细胞的增大^[18].而ON细胞的感受野大小变化幅度大于OFF细胞的也与本课题组在其他视网膜退行性动物模型中的观察类似,即ON细胞的感受野大小对各种病理性损伤更敏感^[20,28,29].本研究还证明渗透压和高血糖对ON和OFF细胞的感受野大小都具有即刻效应.

(2) 亮度阈值.高糖和高渗条件下ON细胞的平均亮度阈值明显高于OFF细胞(图2);而与对照组相比,高糖和高渗提高了ON和OFF细胞的平均亮度阈值.这些结果与此前的报道吻合^[18,20,28].

(3) 对比增益.本研究表明,高糖和高渗对ON和OFF细胞的对比增益的损伤是不同的(图3).高渗对ON细胞的对比增益有明显的抑制作用,而对OFF细胞却仅有极小的影响.高糖明显地抑制OFF细胞的对比增益,但对ON细胞却几乎没有作用.因此高糖和高渗对ON和OFF视网膜神经节细胞对比增益的截然不同的影响需要后续进一步研究.AQP9作为甘油-乳酸通道与能量平衡有关,它调控视网膜神经节细胞的容积^[22-24].因此,ON和OFF细胞的AQP9对渗透压的敏感性不同可能是高渗对它们的对比增益的影响不同的解释.视网膜的ON通路可能对渗透压的改变更敏感,而OFF通路可能比较不敏感.但是高糖对ON细胞的对比增益的改变很小,而对OFF细胞的对比增益明显.这提示OFF通路对高血糖所致损伤易感,实验结果提示ON细胞的对比增益在高渗条件下明显受到抑制,而不受高糖影响(图3I).相反,OFF细胞表现出完全不同的响应模式.OFF细胞在高糖条件下对比增益下降剧烈,而高渗几乎不改变其对比增益.目前的研究还不能解释这种不同是否反映了渗透压还是高血糖,亦或是两者的联合作用不同.而这种不同细胞间反应模式差异以及视网膜神经环路中类似的改变是值得进一步研究的.

参考文献

- 1 Bloodworth J M. Diabetic retinopathy. *Diabetes*, 1962, 11: 1-22
- 2 Ewing F M E, Deary I J, Strachan M W J, et al. Seeing beyond retinopathy in diabetes: electrophysiological and psychophysical abnormalities and alterations in vision. *Endocr Rev*, 1998, 19: 462-476

- 3 Camera A, Hopps E, Caimi G. Diabetic microangiopathy: physiopathological, clinical and therapeutic aspects. *Minerva Endocrinol*, 2007, 32: 209–229
- 4 Kern T S, Barber A J. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol*, 2008, 586: 4401–4408
- 5 Barber A J. Diabetic retinopathy: recent advances towards understanding neurodegeneration and vision loss. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 541–549
- 6 Kowluru R A, Mishra M. Contribution of epigenetics in diabetic retinopathy. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 556–563
- 7 Nagai N, Tanino T, Ito Y. Excessive interleukin 18 relate the aggravation of indomethacin-induced intestinal ulcerogenic lesions in adjuvant-induced arthritis rat. *Biol Pharmaceut Bull*, 2015, 38: 1580–1590
- 8 Hao M, Li Y, Lin W, et al. Estrogen prevents high-glucose-induced damage of retinal ganglion cells via mitochondrial pathway. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 253: 83–90
- 9 Cao Y, Li X, Wang C J, et al. Role of NF-E2-related factor 2 in neuroprotective effect of l-carnitine against high glucose-induced oxidative stress in the retinal ganglion cells. *Biomed Pharmacother*, 2015, 69: 345–348
- 10 Cao Y, Wang L, Zhao J, et al. Serum response factor protects retinal ganglion cells against high-glucose damage. *J Mol Neurosci*, 2016, 59: 232–240
- 11 Hu J, Wu Q, Li T, et al. Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. *Exp Eye Res*, 2013, 109: 31–39
- 12 Fu D, Wu M, Zhang J, et al. Mechanisms of modified LDL-induced pericyte loss and retinal injury in diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 2012, 55: 3128–3140
- 13 Hao M, Kuang H Y, Fu Z, et al. Exenatide prevents high-glucose-induced damage of retinal ganglion cells through a mitochondrial mechanism. *Neurochem Int*, 2012, 61: 1–6
- 14 Shanab A Y, Nakazawa T, Ryu M, et al. Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. *Neurobiol Dis*, 2012, 48: 556–567
- 15 Liu J, Yeung P K K, Cheng L, et al. *Epac2*-deficiency leads to more severe retinal swelling, glial reactivity and oxidative stress in transient middle cerebral artery occlusion induced ischemic retinopathy. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 521–530
- 16 Scuderi S, D'amico A G, Federico C, et al. Different retinal expression patterns of IL-1 α , IL-1 β , and their receptors in a rat model of type 1 STZ-induced diabetes. *J Mol Neurosci*, 2015, 56: 431–439
- 17 He M, Pan H, Xiao C, et al. Roles for redox signaling by NADPH oxidase in hyperglycemia-induced heme oxygenase-1 expression in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54: 4092–4101
- 18 Xiao C, He M, Nan Y, et al. Physiological effects of superoxide dismutase on altered visual function of retinal ganglion cells in db/db mice. *PLoS ONE*, 2012, 7: e30343
- 19 Sagdullaev B T, McCall M A. Stimulus size and intensity alter fundamental receptive-field properties of mouse retinal ganglion cells *in vivo*. *Vis Neurosci*, 2005, 22: 649–659
- 20 Xia H, Nan Y, Huang X, et al. Effects of tauroursodeoxycholic acid and alpha-lipoic-acid on the visual response properties of cat retinal ganglion cells: an *in vitro* study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56: 6638–6645
- 21 Sun W, Li N, He S. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*, 2002, 451: 115–126
- 22 Dibas A, Yang M H, Bobich J, et al. Stress-induced changes in neuronal Aquaporin-9 (AQP9) in a retinal ganglion cell-line. *Pharmacol Res*, 2007, 55: 378–384
- 23 Miki A, Kanamori A, Negi A, et al. Loss of Aquaporin 9 expression adversely affects the survival of retinal ganglion cells. *Am J Pathol*, 2013, 182: 1727–1739
- 24 Jang S Y, Lee E S, Ohn Y H, et al. Expression of Aquaporin-6 in rat retinal ganglion cells. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36: 965–970
- 25 侯若武, 章征, 杨迪亚, 等. 颅内压与眼内压的相关性及对视神经的影响: 北京颅眼压力研究(iCOP). *中国科学: 生命科学*, 2016, 46: 1413–1422
- 26 李猛, 王怀洲, 刘玥, 等. 时域、频域和扫频OCT测量离体房水细胞的对比研究. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47: 285–291
- 27 Sang J, Jia L, Zhao B, et al. Association of three single nucleotide polymorphisms at the SIX1-SIX6 locus with primary open angle glaucoma in the Chinese population. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 694–699
- 28 Pu M, Xu L, Zhang H. Visual response properties of retinal ganglion cells in the royal college of surgeons dystrophic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47: 3579–3585
- 29 Nan Y, Xiao C, Chen B, et al. Visual response properties of Y cells in the detached feline retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51: 1208–1215