

NgR 介导的氧化应激反应在葡萄糖诱导 RGC 凋亡中的作用

王玉波, 刘文强, 左中夫, 刘学政

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81571383)

作者单位: (121000) 中国辽宁省锦州市, 锦州医科大学解剖学教研室

作者简介: 王玉波, 在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病视网膜病变的发病机制及治疗。

通讯作者: 刘学政, 博士, 博士后, 教授, 研究方向: 糖尿病视网膜病变的发病机制及治疗. liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期: 2016-09-28 修回日期: 2016-12-20

Role of NgR mediated oxidative stress in glucose induced RGC apoptosis

Yu-Bo Wang, Wen-Qiang Liu, Zhong-Fu Zuo, Xue-Zheng Liu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81571383)

Department of Human Anatomy, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue - Zheng Liu. Department of Human Anatomy, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. liuxuezheng168@vip.sina.com

Received: 2016-09-28 Accepted: 2016-12-20

Abstract

• AIM: To investigate the effect of NgR mediated oxidative stress on the apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs) induced by glucose.

• METHODS: RGC-5 cell were divided into 3 groups: control group (DMEM high glucose medium + 10% fetal calf serum), high glucose group (DMEM high glucose medium + 10% fetal calf serum + 30mmol/L glucose), NEP1-40 group (DMEM high glucose medium + 10% fetal calf serum + 30mmol/L glucose + 1 μ mol/L NEP1-40). Detections were performed after 3d culture: the state of cell growth was observed by microscopy. Cell viability was detected by CCK-8 kit. The apoptosis rate of RGC cells was detected by flow cytometry (FCM). The intensity of ROS of the cells were detected by fluorescence microscopy. Intracellular MDA levels and SOD activity were measured by related kits. Western blot was used to detect the expressions of Bcl-2 and Bax proteins.

• RESULTS: Compared with control group, high glucose group had a poor state and cell viability decreased, cell apoptosis rate significantly increased, ROS and MDA levels were significantly enhanced, SOD activity decreased, and the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased and the expression of pro apoptotic protein Bax

was up-regulated. Compared with glucose group, after NgR expression was inhibited by NEP1-40, the oxidative stress reaction was reduced, Bcl-2/Bax was increased, the cell status was improved, the cell viability was increased, and the apoptosis rate was decreased in the NEP1-40 group ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: High concentration of glucose can induce apoptosis of RGC-5 cells by NgR mediated oxidative stress reaction.

• KEYWORDS: retinal ganglion cells; NgR; oxidative stress; apoptosis

Citation: Wang YB, Liu WQ, Zuo ZF, et al. Role of NgR mediated oxidative stress in glucose induced RGC apoptosis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(2):217-220

摘要

目的: 探讨 NgR 介导的氧化应激在葡萄糖诱导视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 凋亡中的作用。

方法: RGC-5 细胞株分 3 组培养: 正常对照组 (DMEM 高糖培养基 + 100mL/L 胎牛血清), 高糖组 (DMEM 高糖培养基 + 100mL/L 胎牛血清 + 30mmol/L 葡萄糖), NEP1-40 组 (DMEM 高糖培养基 + 100mL/L 胎牛血清 + 30mmol/L 葡萄糖 + 1 μ mol/L NEP1-40)。各组 RGC-5 细胞培养 3d 后检测各指标: 显微镜观察细胞生长状态, cell counting KIT-8 (CCK-8) 试剂盒检测细胞活力, Annexin V/PI 双染流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 检测 RGC 细胞凋亡率, 试剂盒检测线粒体内 ROS 含量的变化, 胞内 MDA 水平及 SOD 活力, Western-blot 检测凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达。

结果: 与正常对照组相比, 高糖组细胞生长状态差, 活力下降, 凋亡率显著增加, ROS 及 MDA 水平显著升高, SOD 活力下降, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低, 促凋亡蛋白 Bax 表达上调, Bcl-2/Bax 蛋白比值降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与高糖组相比, NEP1-40 组细胞抑制 NgR 表达后, 氧化应激反应减弱, Bcl-2/Bax 提高, 细胞状态改善, 细胞活力提高, 凋亡率降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 高浓度葡萄糖能通过 NgR 介导氧化应激反应诱导 RGC-5 细胞凋亡。

关键词: 视网膜神经节细胞; NgR; 氧化应激反应; 凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.2.06

引用: 王玉波, 刘文强, 左中夫, 等. NgR 介导的氧化应激反应在葡萄糖诱导 RGC 凋亡中的作用. 国际眼科杂志 2017; 17(2): 217-220

0 引言

视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 轴突构

成了视神经,是将视网膜的视觉信号传递到脑的唯一神经元,RGC病理性改变在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)的发生发展中起着重要作用^[1]。Nogo受体(NgR)分布于中枢神经系统众多类型神经元中,属于胞膜外糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白,是多种神经再生神经抑制因子的共同受体,其阳性表达能抑制神经元轴突生长,诱导神经元凋亡^[2]。本实验室前期研究发现,在视网膜多层神经元中,NgR仅表达在内层神经元RGC细胞,且糖尿病时在高血糖的刺激下,NgR阳性表达,诱导了RGC凋亡。此时氧化应激重要检测指标丙二醛(MDA)也发生相应变化^[3-4]。这提示NgR诱导RGC凋亡可能与氧化应激反应有关。因此,本研究拟探讨NgR介导的氧化应激在葡萄糖诱导视网膜RGC凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

RGC-5细胞(上海钰博生物科技有限公司),NEP1-40(Sigma公司),DMEM高糖培养基、1.25g/L胰蛋白酶(Hyclone公司),Bcl-2、Bax一抗(Abcam公司),胎牛血清(杭州四季青公司),CCK-8(Dojindo公司),Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司),活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒、丙二醛(malonaldehyde,MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 RGCs细胞株传代培养及分组处理

RGC-5细胞株置于37℃、50mL/L CO₂饱和湿度孵箱中,含100mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基培养,待单层细胞生长至80%~90%融合后传代培养。参照文献^[5],RGC-5细胞株分3组培养:正常对照组(DMEM高糖培养基+100mL/L胎牛血清),高糖组(对照组培养基添加30mmol/L葡萄糖)、NEP1-40组(高糖组培养基中添加1μmol/L NEP1-40)。

1.2.2 观察细胞生长状态并用CCK-8法检测细胞活力

各组处于指数生长期RGC-5细胞种植于96孔培养板内,每个实验条件设置6个复孔,每孔加入100μL培养基和1.0×10⁵个细胞,37℃孵育。倒置相差显微镜观察各组RGC-5细胞形态及细胞生长状态,实验结束后吸去上清液,更换培养液,每孔加入20μL CCK-8试剂。在细胞培养箱内继续孵育2h,用酶标仪检测OD值,计算细胞生长活力。细胞活力=(实验组OD值-空白组OD值)/(正常对照组OD值-空白组OD值)×100%。

1.2.3 流式细胞仪测定各组RGC-5细胞凋亡率

不含EDTA、1.25g/L胰酶消化收集各组指数生长期RGC-5细胞后,800r/min离心,预冷PBS洗2次,离心弃上清,吸取试剂盒内的Binding buffer 100μL重悬细胞,向细胞悬液内加入5μL Annexin V-FITC和5μL PI Staining Solution于冰上、避光反应10min后,加入400μL预冷Binding buffer轻轻混匀,30min流式细胞仪检测。Flowjo软件进行数据分析。AnnexinV⁺/PI⁻为早期凋亡,AnnexinV⁺/PI⁺为晚期凋亡,两者之和为总凋亡率。

1.2.4 荧光显微镜测定细胞内ROS荧光强度

不同因素处理各组细胞后,用无血清培养液1:1000稀释DCFH-DA,使终浓度为10μmol/L,去除细胞培养液,加入适当1mL稀释好的DCFH-DA,以能充分盖住细胞为宜。37℃细胞培养箱内孵育20min后,用无血清细胞培养液洗涤细胞3次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。使用

表1 各组RGC-5细胞活力和凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	细胞活力(%)	凋亡率(%)
正常对照组	100.00±0.00	4.18±1.08
高糖组	61.54±5.26 ^b	32.61±4.26 ^b
NEP1-40组	90.69±8.55 ^d	13.48±0.68 ^d
<i>F</i>	9.545	8.225
<i>P</i>	0.002	0.004

注:^b*P*<0.01 vs 正常对照组;^d*P*<0.01 vs 高糖组。

表2 各组RGC-5细胞ROS平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	平均荧光强度
正常对照组	6.36±1.58
高糖组	40.87±5.77 ^b
NEP1-40组	13.48±2.56 ^d
<i>F</i>	3.728
<i>P</i>	0.048

注:^b*P*<0.01 vs 正常对照组;^d*P*<0.01 vs 高糖组。

488nm激发波长,525nm发射波长荧光显微镜直接观察细胞内荧光强弱,每孔随机选取5个区域测定平均荧光强度。

1.2.5 RGC-5细胞MDA含量和SOD活力检测

不同因素处理各组细胞后,收集细胞。按照MDA和SOD试剂盒的操作说明测定各组RGC-5细胞培养液中MDA的含量及SOD活力。

1.2.6 Western-blot分别检测RGC-5细胞Bcl-2和Bax蛋白水平

同上法测定上清液蛋白浓度后,配平并上样(上样前需60℃水浴5min),15%聚丙烯酰胺凝胶电泳转移至PVDF膜,封闭液(1×TBST,1% BSA)37℃封闭1.5h,分别加入一抗Bcl-2和Bax,4℃孵育过夜,分别用辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育2h,ECL显影,上机检测。

统计学分析:利用SPSS17.0软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组显著性检验行单因素方差分析,方差齐性检验*P*>0.05,两两比较采用LSD-*t*检验;*P*<0.05采用Games-Howell检验。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组RGC-5细胞形态及细胞生长状态

与正常对照组(图1A)相比,高糖组(图1B)细胞生长缓慢,折光性增强,漂浮细胞增多,细胞体积、密度低,细胞突起数目少,突起萎缩。NEP1-40组(图1C)与正常对照组相比无明显差别。

2.2 各组RGC-5细胞活力及凋亡率

与正常对照组相比,高糖组细胞活力显著降低,细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义(*P*<0.05),而NEP1-40组细胞活力增加,凋亡率显著低于高糖组,差异有统计学意义(*P*<0.05,图2,表1)。

2.3 各组RGC-5细胞ROS含量

高糖组ROS含量与正常对照组相比,差异均有统计学意义(*P*<0.05),但NEP1-40组ROS含量显著低于高糖组,差异有统计学意义(*P*<0.05,图3,表2)。

2.4 各组RGC-5细胞MDA含量和SOD活力

与正常对照组相比,高糖组抗氧化酶SOD活力降低,MDA含量显著高于正常对照组(*P*<0.05),而NEP1-40抑制NgR表达后,SOD活力显著升高,MDA含量降低,NEP1-40组与高糖组相比,差异均有统计学意义(*P*<0.05,表3)。

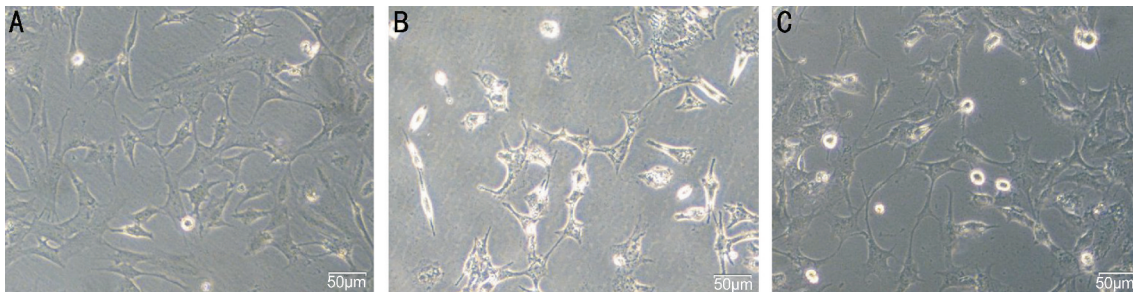


图1 各组 RGC-5 细胞培养 3d 时生长状态 (×200) A:正常对照组;B:高糖组;C:NEP1-40 组。

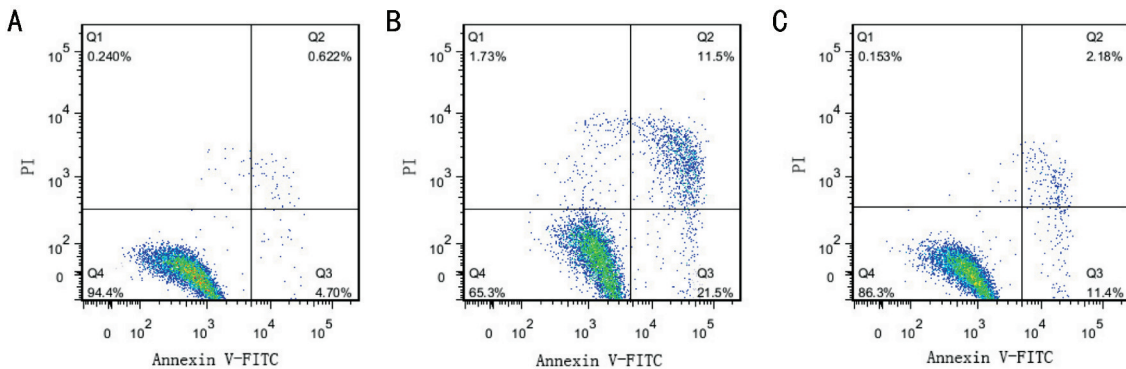


图2 各组 RGC-5 细胞凋亡率 A:正常对照组;B:高糖组;C:NEP1-40 组。

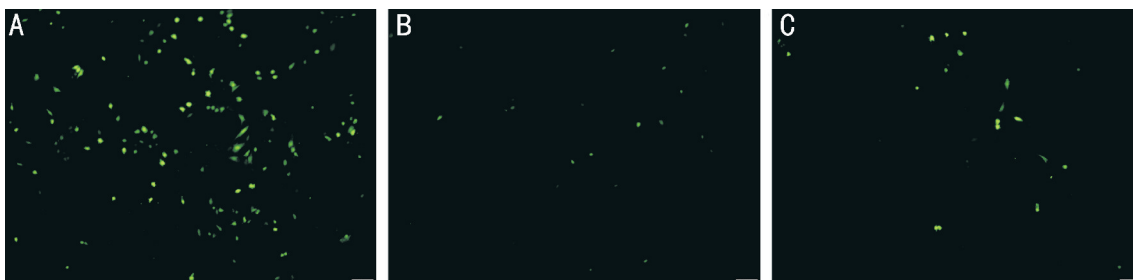


图3 各组 RGC-5 细胞 ROS 平均荧光强度 A:正常对照组;B:高糖组;C:NEP1-40 组。

表3 各组 RGC-5 细胞 MDA 含量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	SOD(U/mL)	MDA($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
正常对照组	169.22±7.13	6.36±1.58
高糖组	103.19±12.97 ^b	15.87±1.77 ^b
NEP1-40 组	155.22±6.83 ^d	7.48±2.16 ^d
<i>F</i>	0.920	0.636
<i>P</i>	0.420	0.543

注:^b $P<0.01$ vs 正常对照组;^d $P<0.01$ vs 高糖组。

2.5 各组 RGC-5 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 Western-blot 结果显示,与正常对照组相比,高糖组 Bcl-2 蛋白表达降低,Bax 蛋白表达明显上调,Bcl-2/Bax 比值降低($P<0.05$),而 NEP1-40 组 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达与高糖组相比,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4,表 4)。

3 讨论

视神经由于其中枢神经系统不可再生特性,已成为国内外科学家研究的难点及热点。Nogo 受体(NgR)分布于中枢神经系统众多类型神经元中,属于胞膜外糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白,是多种神经再生神经抑制因子的作用受体,其阳性表达能抑制神经元轴突生长,诱导神经细胞凋亡^[2]。在视网膜多层神经元中,NgR 仅表达在内层神经元 RGC 细胞^[3]。NEP1-40 是 NgR 的竞争性拮抗剂,能阻断上述三种神经生长抑制因子与 NgR 结合,从而阻断

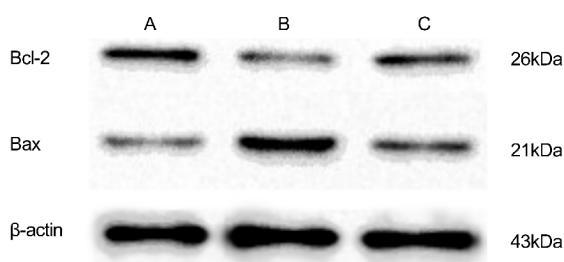


图4 Western-blot 检测各组 RGC-5 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 A:正常对照组;B:高糖组;C:NEP1-40 组。

表4 各组 RGC-5 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白相对表达量

组别	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
正常对照组	0.73±0.17	0.36±0.08
高糖组	0.39±0.05 ^a	0.75±0.19 ^a
NEP1-40 组	0.62±0.16 ^c	0.48±0.12 ^c
<i>F</i>	5.300	4.228
<i>P</i>	0.018	0.035

注:^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 高糖组。

其介导神经元凋亡,促进神经元再塑和功能的恢复^[5]。本研究中,我们也证实了高糖状态下,视网膜神经节细胞株 RGC-5 细胞生长状态差,活力明显降低,且 NgR 上调,诱

导了 RGC-5 细胞凋亡, Nogo 受体竞争性拮抗剂 NEP1-40 处理后, NgR 表达降低, RGC-5 活力恢复、细胞凋亡率显著降低。这提示高糖状态能上调 NgR 表达, 诱导 RGC 凋亡, 但 NgR 诱导 RGC 凋亡的具体机制尚不清楚。

氧化应激(oxidative stress)是指机体氧化与氧化修复系统之间失衡, 产生较多活性氧物质(reactive oxygen species, ROS), 导致细胞凋亡和组织损伤^[6]。ROS 具有高度的反应性, 可以与周围物质迅速发生反应, 故根据其脂质、蛋白质反应后的氧化代谢产物和体内抗氧化酶的测定, 可通过检测丙二醛(MDA)、SOD 的含量来间接反应氧化应激损伤的程度。MDA 是不饱和脂肪酸脂质过氧化作用的代谢终产物^[7], SOD 能催化氧自由基形成过氧化氢, 被认为是清除超氧阴离子自由基的主要抗氧化剂, 在清除自由基、保护生物膜、阻断和防止自由基引发的氧化和过氧化反应中发挥着重要的作用^[8]。本研究发现, 高糖状态下 NgR 表达上调的同时, RGC-5 细胞氧化应激水平升高, 胞内 ROS 及 MDA 显著升高, 抗氧化酶 SOD 活力明显降低, 而 NEP1-40 竞争性抑制 NgR 表达后, 明显抑制了 RGC-5 细胞氧化应激反应, RGC-5 细胞 ROS 及 MDA 水平降低, SOD 活力显著升高。这提示 NgR 介导了高糖诱导 RGC-5 的氧化应激反应, 诱导 RGC-5 凋亡。

Bcl-2 家族成员在氧化应激介导的细胞凋亡途径中起到重要作用。Bcl-2 为抗凋亡蛋白, Bax 为促凋亡蛋白, Bax 和 Bcl-2 两者之间的比值影响着细胞的凋亡状态^[9]。当机体受到细胞凋亡信号刺激时比如氧化应激, Bcl-2 和 Bax 之间的平衡改变, Bcl-2/Bax 比值降低, 导致细胞凋亡^[10]。本研究中我们发现, 高糖状态下 Bcl-2 蛋白表达降低, Bax 表达上调, Bcl-2/Bax 蛋白比值降低, 与 RGC-5 细胞凋亡增加相一致, 而抑制 NgR 表达后, Bcl-2/Bax 蛋白比值升高, RGC-5 细胞凋亡率降低。以上结果提示, 高浓度葡萄糖诱导了 RGC-5 细胞凋亡, 可能是通过上调

NgR 表达, 高表达的 NgR 促进了细胞氧化应激反应, 引起 Bcl-2/Bax 蛋白比值下降, 从而诱导 RGC-5 细胞凋亡。

视网膜神经节细胞的凋亡是 DR 的重要因素, 本研究深入探讨了 NgR 介导的氧化应激在葡萄糖诱导视网膜神经节细胞凋亡中的作用, 但 NgR 在 DR 病理改变中的作用仍待进一步研究。

参考文献

- 1 Kern TS, Barber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol* 2008;586(Pt18):4401-4408
- 2 Brittis P, Flanagan J. Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration. *Neuron* 2001;30(1):11-14
- 3 Liu XZ, Zuo ZF, Liu WP, et al. Upregulation of Nogo receptor expression induces apoptosis of retinal ganglion cells in diabetic rats. *Neural Regen Res* 2014;9(8):815-820
- 4 朱德森, 刘学政. 三七三醇皂苷对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的保护作用. *天津医药* 2013;11:1103-1105
- 5 Zhai P, Chen XB, Schreyer DJ. An *in vitro* study of peptide-loaded alginate nanospheres for antagonizing the inhibitory effect of Nogo-A protein on axonal growth. *Biomed Mater* 2015;10(4):045016
- 6 Maiese K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015(875961):1547-1560
- 7 Rudnicki M, Silveira MM, Pereira TV, et al. Protective effects of Passiflora alata, extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2007;45(4):656-661
- 8 Singh PP, Chandra A, Mahdi F, et al. Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Ind J Clin Biochem* 2010;25(3):225-243
- 9 Volkman N, Marassi FM, Newmeyer DD, et al. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ* 2014;21(2):206-215
- 10 Zhou X, Su CF, Zhang Z. Neuroprotective Effects of Methyl 3,4-dihydroxybenzoate Against H2O2-Induced Apoptosis in RGC-5 Cells. *J Pharmacol Sci* 2014;125(1):51-58