

Nogo 受体在早期糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡中的作用

左中夫, 刘万鹏, 刘学政

基金项目:国家自然科学基金(No. 31140072); 辽宁省科技厅计划项目(No. 2011225015); 辽宁省自然科学基金(No. 20102140)
作者单位:(121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院人体解剖学教研室

作者简介:左中夫, 博士, 研究方向: 糖尿病视网膜病变发病机制及治疗。

通讯作者:刘学政, 教授, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变发病机制及治疗. liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期: 2013-03-25 修回日期: 2013-06-26

Role of NgR on the apoptosis of retinal ganglion cell in the early stage of diabetic rats

Zhong-Fu Zuo, Wan-Peng Liu, Xue-Zheng Liu

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 31140072); Department of Science and Technology of Liaoning Province, China (No. 2011225015); Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (No. 20102140)

Department of Human Anatomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue - Zheng Liu. Department of Human Anatomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. liuxuezheng168@vip.sina.com

Received: 2013-03-25 Accepted: 2013-06-26

Abstract

• **AIM:** To explore the role and underlying mechanisms of nogo receptor (NgR) on the apoptosis of retinal ganglion cell in rats with diabetes mellitus (DM).

• **METHODS:** SD rats were used for inducing DM models by administrating streptozotocin. Studies were performed with control group, DM group, siNgR group: DM rats intravitreal administration of anti - NgR nucleotide, and siRNA control group: DM rats intravitreally administrated with negative nucleotide. One month later, TUNEL staining was conducted to detect apoptosis of retinal ganglion cell (RGC), level of retinal malondialdehyde (MDA) were detected with kit, and expression of NgR and caspase-3 were observed with Western blot.

• **RESULTS:** The level of retinal MDA in control group, DM group, siNgR group and siRNA control group were 3.74 ± 0.49 , 7.21 ± 0.96 , 6.41 ± 1.34 and 4.02 ± 0.53 nmol/mg prot respectively. A significant increase in the number of TUNEL-positive RGC, the expression of retinal NgR and

caspase-3, and the level of retinal MDA were detected in DM and siNgR groups compared with control group ($P < 0.05$). However, the number of TUNEL-positive RGC, the expression of retinal NgR and caspase-3, and the level of retinal MDA showed no difference between control group and siNgR group ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** NgR induces retinal oxidative stress and up-regulation of retinal caspase-3, playing an important role in the apoptosis of diabetic RGC.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; retinal ganglion cell; apoptosis; nogo receptor

Citation: Zuo ZF, Liu WP, Liu XZ. Role of NgR on the apoptosis of retinal ganglion cell in the early stage of diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(7):1317-1319

摘要

目的: 探讨 Nogo 受体 (nogo receptor, NgR) 在糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 大鼠视网膜神经节细胞凋亡中的作用及机制。

方法: 链脲佐菌素诱导 SD 大鼠 DM 模型, 实验分 4 组, 对照组; DM 组; siNgR 组: DM 大鼠玻璃体内给予 NgR 反义核苷酸序列; siRNA 空白组: DM 大鼠玻璃体内给予阴性核苷酸序列。1mo 后 TUNEL 染色检测视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 凋亡, 试剂盒检测视网膜丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, Western-blot 检测视网膜 NgR 及 caspase-3 含量。

结果: 对照组、DM 组、siRNA 空白组及 siNgR 组 MDA 含量分别为 3.74 ± 0.49 , 7.21 ± 0.96 , 6.41 ± 1.34 及 4.02 ± 0.53 nmol/mg prot。与对照组相比, DM 组及 siRNA 空白组视网膜 RGC 凋亡增加, NgR 及 caspase-3 表达上调, MDA 含量升高 ($P < 0.05$), 而 siNgR 组视网膜 RGC 数量、NgR 及 caspase-3 表达、MDA 含量较对照组均无明显变化 ($P > 0.05$)。

结论: NgR 表达增加是糖尿病 RGC 凋亡的重要原因之一, 其机制可能与 NgR 诱导视网膜氧化应激、上调 caspase-3 表达有关。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 视网膜神经节细胞; 凋亡; NgR

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.07.05

引用: 左中夫, 刘万鹏, 刘学政. Nogo 受体在早期糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡中的作用. 国际眼科杂志 2013; 13(7): 1317-1319

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)的严重并发症,可导致患者视力减退,甚至失明。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)凋亡是DR的重要机制之一^[1]。Nogo受体(Nogo receptor, NgR)是抑制神经再生的重要因素,视网膜内仅表达于RGC^[2]。但DM时NgR在RGC内的表达变化及其对RGC影响尚不清楚,因此本研究拟通过观察糖尿病早期,NgR在RGC的表达情况以探讨其在RGC凋亡过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠40只,雌雄各半,体质量200~230g(辽宁医学院实验动物中心),siNgR慢病毒包装液(吉玛生物公司),TUNEL及MDA试剂盒(碧云天生物公司),NgR及caspase-3抗体(Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 SD大鼠腹腔注射2%链脲佐菌素60mg/kg,48h尾静脉血糖>16.7mmol/L即为DM模型。动物随机分4组($n=10$ /组):对照组;DM组;siNgR组;DM大鼠玻璃体内注射10 μ L慢病毒包装的NgR反义核苷酸序列;siRNA空白组;DM大鼠玻璃体内给予10 μ L慢病毒包装的阴性核苷酸序列。1mo后进行指标检测。

1.2.2 视网膜TUNEL染色 常规制备视网膜石蜡切片,根据试剂盒说明书进行操作。封片后镜下观察视网膜神经节细胞层TUNEL阳性RGC表达。

1.2.3 视网膜MDA含量检测 麻醉大鼠取视网膜,以生理盐水制备5%组织匀浆,4000r/min离心取上清,按试剂盒操作流程及公式检测视网膜组织匀浆中MDA含量。

1.2.4 Western-blot检测NgR及caspase-3表达 制备视网膜匀浆,裂解后以12000r/min离心15min,收集上清液行SDS-PAGE电泳,电转移至PVDF膜,以NgR,caspase-3及 β -actin一抗37 $^{\circ}$ C孵育2h,再以辣根过氧化物酶标记的二抗室温分别孵育1h,试剂盒显影。

统计学分析:数据均采用均数 \pm 标准差表示,采用SPSS 17.0进行单因素方差分析,LSD- t 检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 NgR在DM大鼠视网膜的表达变化及其对caspase-3表达的影响 以 β -actin为内对照,与对照组相比,DM组及siRNA空白组大鼠视网膜NgR及caspase-3表达明显上调,siNgR组NgR及caspase-3表达无明显变化(图1)。

2.2 NgR对DM大鼠视网膜氧化应激的影响 视网膜MDA含量检测显示,对照组、DM组、siRNA空白组及siNgR组MDA含量分别为 3.74 ± 0.49 , 7.21 ± 0.96 , 6.41 ± 1.34 及 4.02 ± 0.53 nmol/mg prot。DM组及siRNA空白组视网膜MDA含量较对照组明显升高($P<0.05$),而siNgR组较对照组无明显变化($P>0.05$)。

2.3 NgR对DM大鼠视网膜RGC凋亡的影响 视网膜TUNEL染色显示,1mo后,DM组及siRNA空白组视网膜TUNEL阳性RGC较对照组明显增加,而siNgR组视网膜TUNEL阳性细胞数较DM组明显减少(图2)。

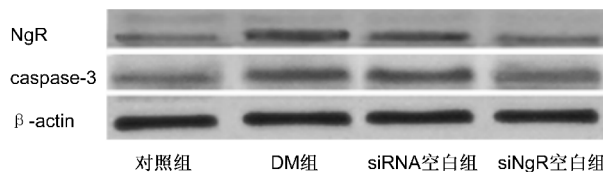


图1 Western-blot检测各组大鼠视网膜NgR及caspase-3蛋白表达。

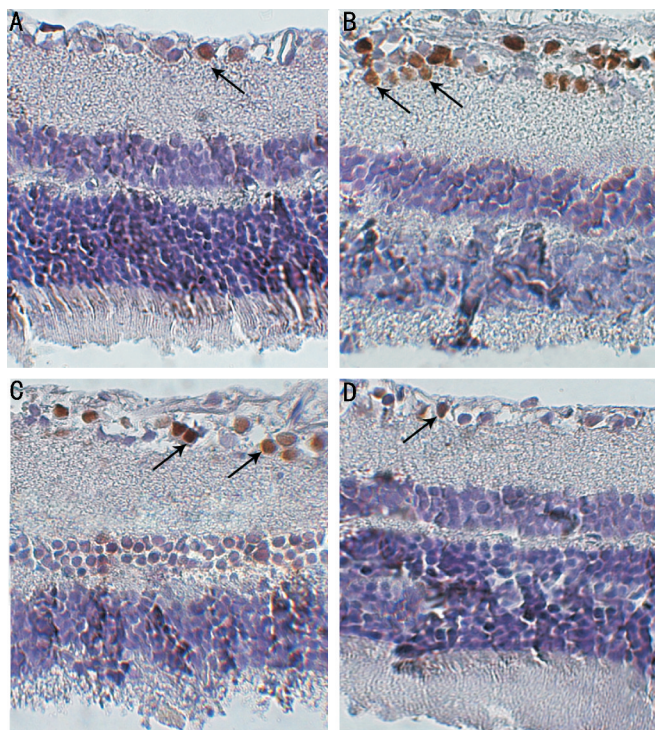


图2 各组大鼠视网膜TUNEL染色阳性的凋亡RGC(箭头示, $\times 200$) A:对照组;B:DM组;C:siRNA空白组;D:siNgR组。

3 讨论

DR是糖尿病视网膜膜的主要并发症之一,是成年人致盲的首要因素。视网膜微血管病变及视网膜神经系统病变是DR的主要病理变化。DR早期,包括RGC在内的视网膜神经元及胶质细胞结构及功能均发生了明显的病理变化,导致患者视力受损、视力下降^[1]。

NgR是Nogo蛋白、髓鞘相关糖蛋白以及少突胶质细胞髓鞘糖蛋白等髓鞘脂相关蛋白的受体,广泛表达于神经系统,是抑制神经再生,促进神经元凋亡等的重要因素^[3]。在大鼠视网膜NgR仅表达于RGC细胞^[2],与RGC的损伤后修复关系密切,青光眼时视网膜RGC细胞内NgR表达明显上调,是视网膜RGC凋亡,突触功能减退的重要机制,抑制NgR表达可恢复视网膜突触功能,抑制RGC细胞凋亡^[4]。本研究发现,DM视网膜NgR明显上调的同时,RGC细胞发生了明显凋亡,利用siNgR抑制NgR表达可显著抑制视网膜RGC凋亡。NgR诱导DR视网膜RGC细胞凋亡机制尚不完全清楚,Nogo-A可影响心肌细胞线粒体膜电位,导致心肌细胞内钙离子超载及氧自由基堆积,上调凋亡相关基因caspase-3表达,从而诱导心肌细胞凋亡,NgR是Nogo-A亲和力最高的受体,因此NgR可能通过上述途径诱导细胞凋亡^[5]。DM时,高血糖可诱发氧化应激,MDA是反应视网膜氧化应激的重要指标之一。本

实验证实,DM 时视网膜 MDA 含量增高,抑制 NgR 表达可明显降低视网膜 MDA 水平,研究结果提示 DM 视网膜发生了明显的氧化应激,NgR 表达增加是 DM 视网膜氧化应激的重要因素。此外,本研究还发现,DM 时,视网膜凋亡相关基因 caspase-3 表达明显增加,而抑制 NgR 表达显著抑制了视网膜 caspase-3 表达。因此,NgR 上调是 caspase-3 表达增加的重要机制之一,DM 时视网膜 NgR 表达上调可能通过诱发氧化应激,增加凋亡相关蛋白 caspase-3 表达等途径诱导 RGC 凋亡,参与 DR 的发生与发展。

视网膜 RGC 凋亡是 DR 的重要机制,RGC 形态及突触可塑性改变也是 DR 的重要机制之一^[6],RGC 参与 DR 的发病机制及其复杂,深入探讨 RGC 病理性改变在 DR 中的作用及机制,对于 DR 的临床治疗具有重要意义。

参考文献

1 Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, *et al.* Neurodegeneration and

neuroprotection in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci* 2013;14(2):2559-2572

2 Yin X, Chen C, Yuan R, *et al.* An immunofluorescence-histochemistry study of the Nogo receptor in the rat retina during postnatal development. *Ann Ophthalmol (Skokie)* 2007;39(2):140-144

3 El Asrar AM, Dralands L, Missotten L, *et al.* Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(8):2760-2766

4 Fu QL, Liao XX, Li X, *et al.* Soluble Nogo-66 receptor prevents synaptic dysfunction and rescues retinal ganglion cell loss in chronic glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(11):8374-8380

5 Sarkey JP, Chu M, McShane M, *et al.* Nogo-A knockdown inhibits hypoxia/reoxygenation-induced activation of mitochondrial-dependent apoptosis in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50(6):1044-1055

6 Kern TS, Barber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol* 2008;586(Pt 18):4401-4408

科技期刊对论文题目的要求

题名,是论文的总纲,是能反映论文最主要的特定内容的最恰当、最简明的词语的逻辑组合。

首先,题名应准确得体。应以最恰当的词语反映论文的特定内容,把论文的主题明白无误地告诉读者,并且使之起到画龙点睛、启迪读者阅读兴趣的作用。题目的用词十分重要,它直接关系到读者对论文取舍的态度,务必字字斟酌。题名不能使用笼统和华而不实的词语,一般也不用主、谓、宾齐全的完整句子,而用以名词性词组做中心语的偏正词组并切忌写成标语口号似的“题名”。

其次,题名应简短精练。GB/T 7713-1987 规定,论文题名一般不超过 20 个汉字。在拟定题名或编辑加工时,应删去多余的词语,避免存在无用的字和词。这是为了醒目,便于记忆和引用。使用简短的题名而语意未尽时,或系列工作分篇报道时,可借助于副题名,以补充题名之不足。

第三,题名应便于检索。题名所用的词语必须有助于选定关键词和编制题录、索引等二次文献,以便为检索提供特定的实用信息。这就要求题名中一定要有反映论文特定内容的关键词,关键词多一些更好。

第四,题名应容易认读。题名中应当避免使用数学公式、化学结构式,以及非共知共用的缩略词、首字母缩写字、字符、代号等。

摘自《科学技术期刊编辑教程》