

# NgR 在糖皮质激素诱导视网膜神经节细胞凋亡中的作用

吕利征, 刘学政

**基金项目:** 辽宁省科技厅资助项目(No. 2011225015)  
**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:** 吕利征, 硕士研究生, 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:** 2015-02-09 **修回日期:** 2015-05-15

## Role of Nogo receptor in glucocorticoids-induced apoptosis of retinal ganglion cell

Li-Zheng Lü, Xue-Zheng Liu

**Foundation item:** Funded Project from Science and Technology Agency of Liaoning Province (No. 2011225015)

Department of Anthropotomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

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

Received: 2015-02-09 Accepted: 2015-05-15

### Abstract

• **AIM:** To explore the effects and underlying mechanisms of glucocorticoid in the apoptosis of retinal ganglion cell (RGC).

• **METHODS:** RGC were cultured in 4 groups for 3d: control group, glucocorticoid group (with 0.1  $\mu\text{mol/L}$  cortisone), glucocorticoid-siNgR group [with 0.1  $\mu\text{mol/L}$  cortisone + Nogo receptor (NgR) antisense nucleotide], glucocorticoid-scRNA group (with 0.1  $\mu\text{mol/L}$  cortisone + scrambled nucleotide). The cell viability was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), the morphological features were observed with inverted microscope, apoptosis of RGC was measured with Hoechst 33342 staining, and expression of NgR was revealed by Western blot.

• **RESULTS:** Cell viability in control, glucocorticoid, glucocorticoid-scRNA and glucocorticoid-siNgR groups were (100.0 $\pm$ 0.0)%, (76.3 $\pm$ 6.8)%, (79.4 $\pm$ 9.0)% and (96.7 $\pm$ 9.8)% respectively. Decreased cell viability, reduced cell number, and increased expression of NgR were atrophic cell body detected in glucocorticoid and glucocorticoid-scRNA groups ( $P < 0.01$ ), not in glucocorticoid-siNgR group ( $P > 0.05$ ), compared with control group. RGC was showed light blue by Hoechst 33342 staining in control and glucocorticoid-siNgR groups, and exhibiting bright blue apoptotic RGC in glucocorticoid and glucocorticoid-scRNA groups.

• **CONCLUSION:** Up-regulation of NgR contributes to glucocorticoids-induced apoptosis of RGC.

• **KEYWORDS:** glucocorticoid; Nogo receptor; retinal ganglion cell; apoptosis

**Citation:** Lü LZ, Liu XZ. Role of Nogo receptor in glucocorticoids-induced apoptosis of retinal ganglion cell. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(6):976-978

### 摘要

**目的:** 探讨糖皮质激素对视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 凋亡的影响及机制。

**方法:** 分4组培养RGC, 即(1)对照组, (2)激素组(0.1  $\mu\text{mol/L}$  可的松), (3)激素-siNgR组(0.1  $\mu\text{mol/L}$  可的松+NgR反义核苷酸病毒), (4)激素-scRNA对照组(0.1  $\mu\text{mol/L}$  可的松+阴性核苷酸病毒)。3d后四甲基嘧啶蓝(Thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)检测细胞活力变化, 倒置显微镜观察细胞形态学变化, Hoechst 33342染色检测细胞凋亡, Western blot检测Nogo受体(Nogo receptor, NgR)表达。

**结果:** 对照组、激素组、激素-scRNA组及激素-siNgR组细胞活力分别为(100.0 $\pm$ 0.0)%, (76.3 $\pm$ 6.8)%, (79.4 $\pm$ 9.0)%及(96.7 $\pm$ 9.8)%, 与对照组相比, 激素组及激素-scRNA组细胞活力明显降低, 细胞密度降低, 体积缩小, NgR表达增加( $P < 0.01$ ), 而激素-siNgR组无明显变化( $P > 0.05$ )。Hoechst 33342染色显示, 对照组及激素-siNgR组细胞淡蓝色, 激素组及激素-scRNA组可见大量呈亮蓝色的凋亡细胞。

**结论:** 糖皮质激素能通过NgR表达增加诱导RGC凋亡。

**关键词:** 糖皮质激素; Nogo受体; 视网膜神经节细胞; 凋亡  
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.6.09

**引用:** 吕利征, 刘学政. NgR在糖皮质激素诱导视网膜神经节细胞凋亡中的作用. 国际眼科杂志 2015;15(6):976-978

### 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病患者常见的眼部并发症之一, 不仅是欧美等发达国家成年人致盲的主要原因<sup>[1,2]</sup>, 也是我国成年人新发致盲的主要原因<sup>[3]</sup>。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)轴突形成视神经将视觉冲动传递至中枢, RGC受损可导致视力下降, 甚至失明, 是DR的重要原因之一<sup>[4]</sup>。糖皮质激素与视网膜神经元的结构、功能、存活及凋亡关系密切<sup>[5]</sup>, 糖皮质激素浓度长时间增加是细胞凋亡的重要原因之一<sup>[6]</sup>。Nogo受体(Nogo receptor, NgR)是多种神经生长抑制因子的共同受体, 能抑制神经元突起的延长, 诱导神经元凋亡<sup>[7,8]</sup>。我们前期研究也证实, NgR在视网膜仅表达于RGC, NgR表达上调诱导了RGC凋亡<sup>[9-11]</sup>。糖尿病时糖皮质激素水平增加, 因此本研究拟探讨大剂量糖皮质

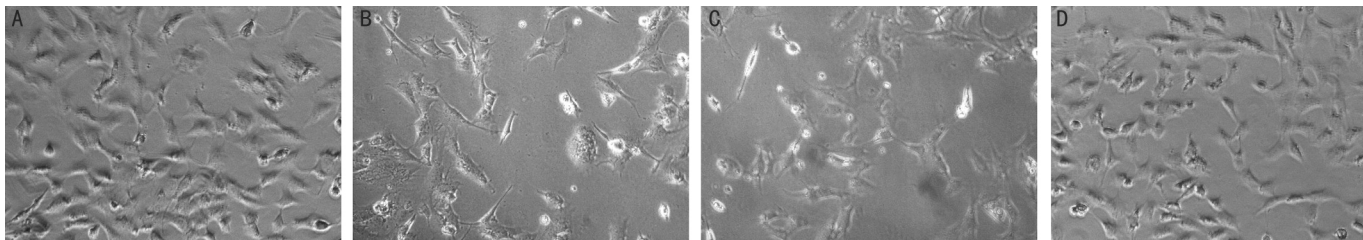


图1 各组细胞生长状态( $\times 200$ ) A:对照组;B:激素组;C:激素-scRNA组;D:激素-siNgR组。

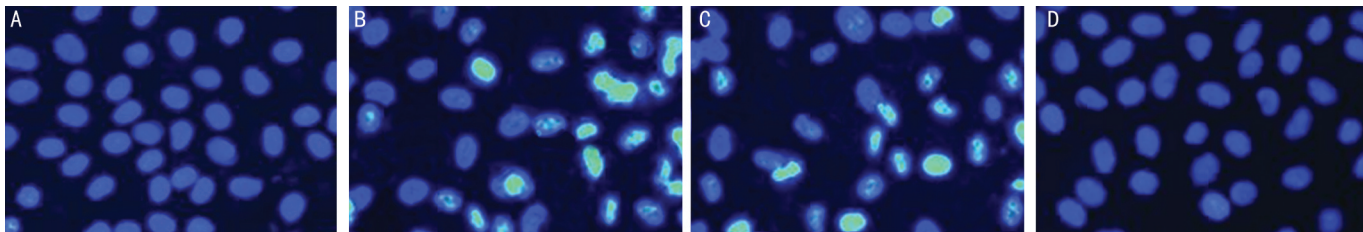


图2 Hoechst 33342染色( $\times 400$ ) 亮蓝色为凋亡细胞 A:对照组;B:激素组;C:激素-scRNA组;D:激素-siNgR组。

激素对RGC凋亡的影响及机制,为糖皮质激素在糖尿病患者治疗中的合理应用提供理论参考。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RGC细胞(上海瑞鹿生物科技有限公司),胎牛血清(杭州四季青生物公司),四甲基噻唑蓝(Thiazolyl blue tetrazolium bromide,MTT)及Hoechst 33342染色液(北京碧云天生物科技有限公司),Nogo蛋白受体(Nogo receptor,NgR)反义及阴性核苷酸病毒包装液(上海吉玛生物公司,siNgR反义寡核苷酸序列为5'-AATGACTCTCCATTGGGACT-3'),氢化可的松(Sigma公司),NgR及 $\beta$ -actin抗体(Abcam公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 传代RGC覆盖率达70%时分4组培养,即对照组、激素组(0.1 $\mu$ mol/L可的松)、激素-siNgR组(0.1 $\mu$ mol/L可的松+NgR反义核苷酸病毒)及激素-scRNA对照组(0.1 $\mu$ mol/L可的松+阴性核苷酸病毒)。

**1.2.2 MTT法检测RGC活力** 调整RGC细胞悬液浓度 $1 \times 10^4/200\mu$ L,吸取200 $\mu$ L细胞悬液于96孔板内,24h后分组培养,每组设置4个复孔,在培养第3d倒置显微镜观察细胞形态。以无血清培养基培养3h再加入20 $\mu$ L的MTT溶液(5mg/mL)静置3h,加二甲亚砜振荡至结晶物溶解。酶联免疫检测仪(490nm波长)检测各孔的吸光度(A值),计算细胞活力(细胞活力=实验组A值/正常组A值 $\times 100\%$ )。

**1.2.3 Hoechst 33342染色检测细胞凋亡** 分组培养3d后,4%多聚甲醛固定15min,PBS洗涤后加入Hoechst 33342染色液孵育10min,PBS洗涤后荧光显微镜观察,计数凋亡细胞百分比。

**1.2.4 Western blot检测NgR表达** 分组培养3d后,细胞刮收集细胞,裂解后12000r/min离心15min,考马斯亮蓝法测定上清蛋白浓度,调节蛋白浓度均等后100 $^{\circ}$ C水浴10min,电泳后转移至PVDF膜,以NgR及 $\beta$ -actin一抗室温孵育2h,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1h,试剂盒显影。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计软件进行实验数据分析,所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示。对于各组数据先进行正态性检验和方差齐性检验,组间整体比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

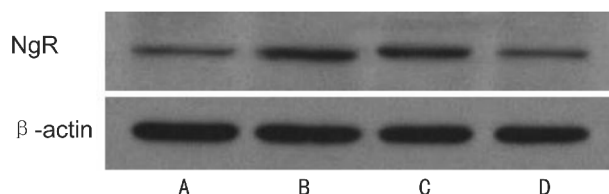


图3 Western blot检测NgR表达 A:对照组;B:激素组;C:激素-scRNA组;D:激素-siNgR组。

## 2 结果

**2.1 抑制NgR可恢复RGC细胞活力** 对照组、激素组、激素-scRNA组及激素-siNgR组细胞活力分别为(100.0 $\pm$ 0.0)%,(76.3 $\pm$ 6.8)%,(79.4 $\pm$ 9.0)%及(96.7 $\pm$ 9.8)%,4组间差异显著( $F = 202.464, P < 0.01$ )。与对照组相比,激素组及激素-scRNA组细胞活力明显降低( $P < 0.01$ ),激素-siNgR组细胞活力无明显变化( $P > 0.05$ )。激素-siNgR组细胞活力较激素组明显增高( $P < 0.01$ )。

**2.2 抑制NgR能改善RGC细胞生长状态** 显微镜下观察发现,与对照组相比,激素组及激素-scRNA组细胞稀疏,体积缩小,细胞贴壁不牢,边界折光性增强。激素-siNgR组细胞形态较对照组差异不明显(图1)。

**2.3 下调NgR表达可抑制RGC凋亡** 凋亡细胞膜通透性强,Hoechst 33342容易通过细胞膜,着色细胞呈亮蓝色,且凋亡细胞核皱缩,出现了染色质凝集、核碎裂等变化(图2)。对照组、激素组、激素-scRNA组及激素-siNgR组细胞凋亡率分别为(2.6 $\pm$ 0.0)%,(30.4 $\pm$ 3.2)%,(28.1 $\pm$ 2.9)%及(3.5 $\pm$ 1.4)%,4组间差异显著( $F = 213.582, P < 0.01$ )。与对照组相比,激素组及激素-scRNA组RGC凋亡率增高( $P < 0.01$ ),激素-siNgR组细胞凋亡率无明显改变( $P > 0.05$ )。与激素组及激素-scRNA组相比,激素-siNgR组细胞凋亡率明显降低(均 $P < 0.01$ )。

**2.4 糖皮质激素能上调NgR的表达** 以 $\beta$ -actin为内对照,对照组、激素组、激素-scRNA组及激素-siNgR组NgR蛋白相对表达量分别为0.22 $\pm$ 0.02,0.33 $\pm$ 0.04,0.32 $\pm$ 0.04,0.22 $\pm$ 0.03,4组间差异显著( $F = 228.389, P < 0.01$ )。与对照组相比,激素组及激素-scRNA组NgR表达有所增加( $P < 0.01$ ),而激素-siNgR组的NgR蛋白表达变化不明显( $P > 0.05$ ,图3)。

### 3 讨论

RGC 结构及功能异常是糖尿病视网膜病变的重要原因<sup>[4]</sup>,糖尿病视网膜病变已经成为工业化国家成年人致盲的首要因素<sup>[12]</sup>。糖皮质激素生物学作用复杂,能调节神经元的存活及凋亡<sup>[13]</sup>。糖皮质激素已用于糖尿病视网膜病变的治疗,局部注射能减轻视网膜微循环障碍,治疗视网膜黄斑水肿,但长期注射糖皮质激素反而能引发多种眼部并发症,能损害视网膜神经元,对 RGC 的影响有待进一步明确<sup>[14]</sup>。

糖皮质激素能通过多种途径诱导细胞凋亡,细胞凋亡是糖皮质激素诱发多种疾病的重要原因之一<sup>[6]</sup>。NgR 是多种髓磷脂相关蛋白的共同受体,如 Nogo 蛋白、髓鞘相关糖蛋白以及少突胶质细胞髓鞘糖蛋白等都能与 NgR 结合,抑制神经再生,促进神经元凋亡<sup>[15]</sup>。在体研究证实,NgR 表达增加是糖尿病大鼠及青光眼动物模型 RGC 凋亡的重要机制之一<sup>[16,17]</sup>。本研究发现,高浓度糖皮质激素促进 NgR 蛋白在 RGC 内的表达,诱导了 RGC 凋亡,特异性下调 NgR 的表达能抑制糖皮质激素诱导的细胞凋亡。该结果提示,糖皮质激素能通过促进 NgR 表达而诱导 RGC 凋亡。NgR 诱导细胞凋亡的机制很多,如影响线粒体膜电位,细胞内钙离子超载,氧自由基堆积,凋亡因子表达增加等<sup>[18]</sup>,但相关机制仍待进一步探讨。

本研究观察了高浓度糖皮质激素诱导的 RGC 凋亡,利用 RNA 干扰手段探讨了 NgR 在糖皮质激素诱导 RGC 凋亡中的作用。证实了 NgR 是糖皮质激素诱导 RGC 凋亡的重要分子机制之一,为糖皮质激素在糖尿病视网膜病变甚至其他视网膜病变治疗中的合理应用提供了理论参考。

参考文献

- 1 Marozas LM, Fort PE. Diabetic retinopathy - update on prevention techniques, present therapies, and new leads. *US Ophthalmic Rev* 2014; 7(1):54-58
- 2 Mysona BA, Shanab AY, Elshaer SL, et al. Nerve growth factor in diabetic retinopathy: beyond neurons. *Expert Rev Ophthalmol* 2014; 9(2):99-107
- 3 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版). 中国糖尿病杂志 2014;22(8):2-22

- 4 Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, et al. Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci* 2013;14(2):2559-2572
- 5 Forkwa TK, Tamm ER, Ohlmann A. Ambiguous role of glucocorticoids on survival of retinal neurons. *Adv Exp Med Biol* 2014;801:365-371
- 6 Kfir-Erenfeld S, Yefenof E. Non-genomic events determining the sensitivity of hemopoietic malignancies to glucocorticoid - induced apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63(1):37-43
- 7 Li Q, Cheng Y, Bi MJ, et al. Effects of N-Butylphthalide on the expressions of Nogo/NgR in rat brain tissue after carbon monoxide poisoning. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015;39(2):953-961
- 8 Zhang Z, Xu X, Xiang Z, et al. LINGO-1 receptor promotes neuronal apoptosis by inhibiting WNK3 kinase activity. *J Biol Chem* 2013;288(17):12152-12160
- 9 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
- 10 韩玉芝, 刘学政, 左中夫. NgR-Rock 信号通路在高糖损伤 RGC 中的作用. 国际眼科杂志 2014; 14(2):207-209
- 11 付云杰, 刘学政. NgR-Rhoa-Rock 信号通路在早期糖尿病大鼠 RGC 凋亡中的作用. 国际眼科杂志 2014; 14(9):1570-1573
- 12 Song SJ, Wong TY. Current concepts in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab J* 2014; 38(6):416-425
- 13 Gomez - Sanchez E, Gomez - Sanchez CE. The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Compr Physiol* 2014;4(3):965-994
- 14 Arevalo JF. Diabetic macular edema: changing treatment paradigms. *Curr Opin Ophthalmol* 2014;25(6):502-507
- 15 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
- 16 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
- 17 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
- 18 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