

糖尿病早期大鼠视网膜神经细胞凋亡与 caspase-3 表达的关系

李晓艳¹, 张卯年², 皮裕琍¹

作者单位:¹(100048)中国北京市,中国人民解放军总医院第一附属医院眼科;²(100853)中国北京市,中国人民解放军总医院眼科

作者简介:李晓艳,主治医师。

通讯作者:张卯年,教授. zhangmaonian@msn. com

收稿日期:2010-03-18 修回日期:2010-04-26

Relationship between the apoptosis of retinal neurons and change of caspase-3 expression in early diabetic rats

Xiao-Yan Li¹, Mao-Nian Zhang², Yu-Li Pi¹

¹Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ²Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Mao-Nian Zhang, Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. zhangmaonian@msn. com

Received:2010-03-18 Accepted:2010-04-26

Abstract

• **AIM:** To probe the relationship between the apoptosis of diabetic rats' retinal neurons and change of caspase-3 expression in early diabetic rats.

• **METHODS:** Eighteen male 8-week-aged SD rats were injected with a single dose of streptozotocin (60mg/kg) to induce the diabetic model, and then they were divided into 3 groups at 4, 8 and 12 weeks (each group, $n = 6$). Another 18 male 8-week-aged SD rats were the normal control group, and were raised at the same time without any intervention, also divided into 3 groups at 4, 8 and 12 weeks (each group, $n = 6$). Apoptosis of retinal neurons was detected by TdT-mediated dUTP nick end label (TUNEL) assay. The protein expression of caspase-3 was detected by immunohistochemistry. Caspase-3 mRNA levels were determined by SYBR Green Realtime PCR Master Mix.

• **RESULTS:** There were no apoptosis neurons in control groups' retina at 4, 8, 12 weeks. Apoptosis of the retinal neurons occurred 4 weeks after the onset of diabetes, and the apoptosis degrees were significantly higher than that of age-matched control groups at 8 and 12 weeks. The apoptosis of the retinal neurons located in the retinal ganglion cells layer (GCL) and the inner nuclear layer (INL). Caspase-3 protein expression was not observed in the control rats' retina at 4, 8, 12 weeks. Positive staining of caspase-3 occurred 4 weeks after the onset of diabetes,

and enhanced at 8 and 12 weeks. In control rats at 4, 8 and 12 weeks, caspase-3 mRNA levels were 1.6 ± 0.6 , 1.5 ± 0.5 , 1.6 ± 0.3 respectively. Caspase-3 mRNA levels in diabetic rats that had diabetes for 4, 8 and 12 weeks were 5.7 ± 1.2 , 12.6 ± 2.3 , 14.3 ± 2.1 respectively, which were greater than that in the control groups ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The apoptosis of the retinal neurons in diabetic rats may be related with the enhance of the caspase-3 expression.

• **KEYWORDS:** diabetes; retina; neuron; apoptosis; caspase-3

Li XY, Zhang MN, Pi YL. Relationship between the apoptosis of retinal neurons and change of caspase-3 expression in early diabetic rats. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(5):847-849

摘要

目的: 观察糖尿病早期大鼠, 视网膜神经细胞凋亡与 caspase-3 表达变化的关系。

方法: 健康雄性 8 周龄 SD 大鼠 36 只, 建立糖尿病大鼠模型 18 只, 正常对照 18 只。再各自分为 4, 8, 12wk 3 组, 每组 6 只大鼠。TdT 介导 DNA 缺口末端的 dUTP 标记 (TUNEL) 法检测视网膜神经细胞的凋亡程度; 免疫组织化学方法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 蛋白表达水平, 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 法检测 caspase-3 mRNA 表达情况。

结果: 正常对照组 4, 8, 12wk 大鼠均未见视网膜神经细胞凋亡。糖尿病组大鼠于建模后 4wk 即出现视网膜神经细胞凋亡, 8wk 和 12wk 大鼠视网膜神经凋亡程度较同期正常对照组大鼠均明显增强。神经细胞凋亡主要位于视网膜神经节细胞层及内核层。正常对照组 4, 8, 12wk 大鼠视网膜均未见 caspase-3 蛋白阳性表达, 糖尿病组大鼠 4wk 即可见 caspase-3 蛋白阳性表达, 8 和 12wk 时表达增强。正常对照组 4, 8, 12wk 大鼠 caspase-3 mRNA 表达 RQ 值分别为 1.6 ± 0.6 , 1.5 ± 0.5 , 1.6 ± 0.3 ; 糖尿病组 4, 8, 12wk 大鼠 caspase-3 mRNA 表达 RQ 值分别为 5.7 ± 1.2 , 12.6 ± 2.3 , 14.3 ± 2.1 ; 较同期对照组均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 糖尿病早期视网膜神经细胞凋亡可能与 caspase-3 表达增强有关。

关键词: 糖尿病; 视网膜; 神经细胞; 凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.05.008

李晓艳, 张卯年, 皮裕琍. 糖尿病早期大鼠视网膜神经细胞凋亡与 caspase-3 表达的关系. 国际眼科杂志 2010;10(5):847-849

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的慢性并发症之一,以往,众多学者认为DR是微血管病变,其视功能的下降是由于微血管的损伤。然而,近年来越来越多的研究表明,DR不仅存在视网膜微血管病变,同时也有视网膜神经元的损伤^[1,2],主要表现为高血糖引起的视网膜神经细胞凋亡。因而,探讨DR神经病变的发病机制,从而寻找安全有效的神经保护措施,对于提高糖尿病患者的视功能状态具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 实验用封闭群雄性健康 Sprague-Dawley (SD)大鼠36只,8周龄,军事医学科学院实验动物中心提供。随机抽取18只大鼠诱导糖尿病大鼠模型,建模成功后再于建模后4,8,12wk 3个时间点分为3组,每组各6只大鼠。另外18只大鼠作为正常对照组不进行干预,与糖尿病组大鼠同时饲养,也按糖尿病组相同时间点分为4,8,12wk 3组,每组各6只大鼠。每组6只大鼠中,取双眼:左眼眼球制作石蜡组织病理学切片行TUNEL检测及caspase-3免疫组化检测;右眼眼球提取视网膜组织RNA后行基因检测。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司);原位细胞凋亡(TUNEL)检测试剂盒、兔抗鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)多克隆抗体(武汉博士德生物技术有限公司);SYBR Green Realtime PCR Master Mix试剂;引物(北京奥科生物技术有限公司合成):大鼠caspase-3序列^[3](U49930):5'-AAT TCA AGG GAC GGG TCA TG-3'(上游),5'-GCT TGT GCG CGT ACA GTT TC-3'(下游);大鼠 β -actin序列^[4](V01027):5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA-3'(上游),5'-CTG ACC GAG CGT GGC TAC-3'(下游)。柱式动物RNA提取试剂盒(天泽基因工程有限公司),逆转录试剂盒(Promega公司),Real Master Mix(SYBR Green)(天根生化科技公司)。

1.2 方法 STZ按60mg/kg一次性ip诱导糖尿病模型。模型建立标准:给药后48h剪尾法测血糖、尿糖试纸测尿糖,血糖>16.7mmol/L,尿糖+++以上者为糖尿病大鼠模型建立成功;给药后48h测血糖,均>16.7mmol/L,尿糖均在++以上。实验过程中,无血糖自行恢复者。每日饮水量、尿量明显多于同期对照组,随鼠龄增加体重初期改变不明显或略有增加,之后呈逐渐下降趋势,最终呈现消瘦状态。100g/L水合氯醛麻醉大鼠,快速取出左眼球固定于40g/L多聚甲醛固定液中15~20min后,从角膜缘剪开眼球、小心去除眼前节和部分玻璃体,余下“眼杯”再次固定2h左右,依次梯度乙醇脱水、二甲苯透明后浸蜡包埋。连续4 μ m切片,切片位置选择在距视盘2mm处,用于caspase-3免疫组织化学染色和TUNEL法凋亡细胞检测。

1.2.1 视网膜神经细胞凋亡的检测 石蜡切片常规脱蜡至水化;30mL/L H₂O₂室温处理10min;Proteinase K 37 $^{\circ}$ C消化10min;取TdT和DIG-d-UTP各1 μ L,加入18 μ L标记缓冲液混匀后滴加至标本片,37 $^{\circ}$ C湿盒内标记2h;加封闭液室温处理30min;用抗体稀释液1:100稀释生物素化抗地高辛抗体,混匀后加至标本片,37 $^{\circ}$ C湿盒内反应30min;用抗体稀释液1:100稀释SABC,混匀后加至标本片,37 $^{\circ}$ C湿盒内反应30min;DAB显色;Mayer苏木素轻度复染;水洗、脱水、透明、封片,显微镜观察。

1.2.2 caspase-3 表达的检测 石蜡切片常规脱蜡至水化;30mL/L H₂O₂抑制内源性过氧化物酶;将切片浸入

0.01mol/L枸橼酸钠缓冲液(pH=6.0)95 $^{\circ}$ C水浴10min,自然冷却后滴加复合消化液修复抗原;滴加正常山羊封闭血清;滴加1:300稀释的兔抗鼠caspase-3多克隆抗体4 $^{\circ}$ C过夜;生物素化山羊抗兔IgG 37 $^{\circ}$ C孵育30min;辣根酶标记链霉卵白素试剂37 $^{\circ}$ C孵育15min;AEC显色剂室温下显色;Mayer苏木素衬染细胞核;水溶性封片剂封片,显微镜观察。另麻醉后的大鼠,迅速摘除右眼眼球,显微镜下剥离视网膜,标记分装至冻存管中置于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存待测。视网膜组织总RNA的提取:采用柱式动物RNA提取方法。所有实验用品均预先进行去RNA酶处理,整个过程在冰浴中进行。逆转录:采用逆转录酶及随机引物进行逆转录,严格按Promega公司逆转录试剂盒说明书操作。Real Master Mix(SYBR Green) Real-Time PCR的扩增步骤:采用高温启动法进行实时荧光定量PCR循环,扩增的每个标准均作内参对照,每个指标均有正常组作对照。7500型荧光定量PCR仪进行PCR循环扩增(40个循环),循环条件(两步法,退火/延伸温度60 $^{\circ}$ C)。取相对定量RQ值作结果进行统计分析。

统计学分析:应用SPSS 13.0统计软件进行数据分析。本研究中的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,正常对照组与糖尿病组大鼠各时间点视网膜caspase-3 mRNA表达水平采用两因素方差分析,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜神经细胞凋亡 正常对照组视网膜未见明显神经细胞凋亡;糖尿病组4wk可见散在的凋亡细胞分布于内核层,大部分神经节细胞层未见明显凋亡,仅偶见零散凋亡细胞,外核层细胞未见明显凋亡细胞,细胞核呈深蓝色(图1A);糖尿病组8wk可见内核层凋亡细胞增多、密度增大,神经节细胞层也出现明显染色阳性的凋亡细胞(图1B);糖尿病组12wk视网膜神经节细胞层及内核层可见凋亡细胞明显增多(图1C)。糖尿病组大鼠于建模后4wk即出现视网膜神经细胞凋亡,8和12wk大鼠视网膜神经细胞凋亡程度较同期正常对照组大鼠均明显增强。神经细胞凋亡主要位于视网膜神经节细胞层及内核层。

2.2 视网膜 caspase-3 表达 对照组大鼠4,8,12wk视网膜未见caspase-3阳性表达;糖尿病组4wk视网膜内核层及神经节细胞层均可见caspase-3表达(图2A);8wk及12wk caspase-3表达逐渐增强(图2B,C)。正常对照组大鼠随鼠龄增长视网膜caspase-3 mRNA表达量均无明显变化,其差异无统计学意义(4,8,12wk为 $1.6 \pm 0.6, 1.5 \pm 0.5, 1.6 \pm 0.3, P > 0.05$)。糖尿病组随着糖尿病病程的延长,视网膜caspase-3 mRNA表达量(RQ值)呈逐渐增强趋势,在4wk(5.7 ± 1.2)与同期对照组相比即出现明显差异($P < 0.01$),至8wk(12.6 ± 2.3)及12wk(14.3 ± 2.1)差异更为显著。

3 讨论

DR包括视网膜微血管病变及神经病变,在糖尿病患者^[4,5]和动物实验^[6]中,都证实在未出现视网膜微血管病理改变之前,已存在视网膜神经组织的损伤及功能改变,并认为,DR不仅仅是微血管病变,它还是一种神经变性疾病,其病理生理改变可能与微血管病变相关^[7,9],甚至是微血管病变的启动因素^[10]。视网膜神经细胞凋亡是DR早期最主要的病理表现形式。TUNEL法是近年来出现的将分子生物学与形态学相结合的细胞凋亡原位检测技术,主要用于早期凋亡的检测,其敏感性高、特异性强,而且能

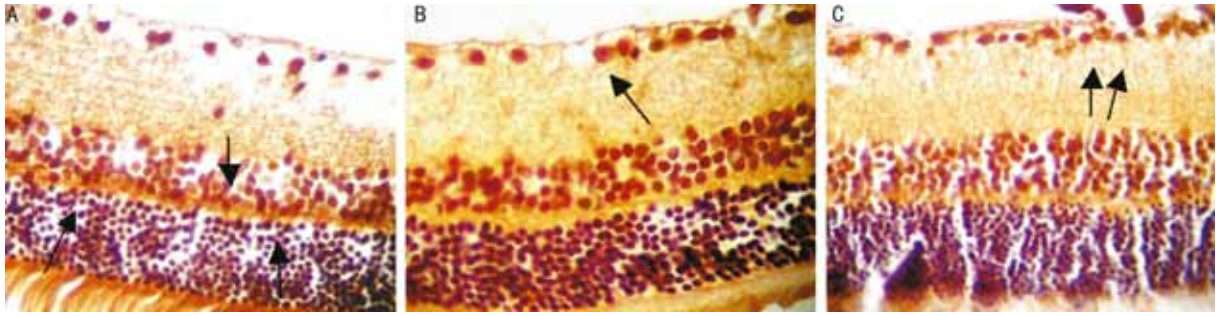


图1 糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡(TUNEL×400) A:4wk; B:8wk; C:12wk。

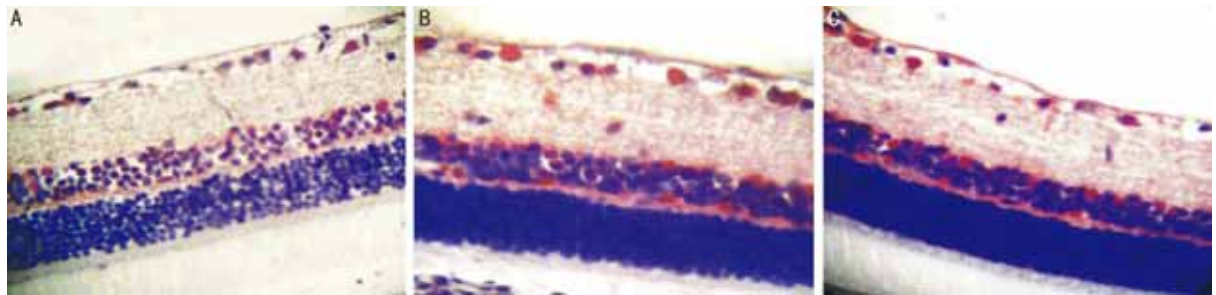


图2 大鼠视网膜 caspase-3 表达(SP×400) A:4wk; B:8wk; C:12wk。

够定量的表现细胞凋亡的程度,因而是目前广泛应用的细胞凋亡检测方法。我们发现,正常对照组大鼠视网膜未见神经细胞凋亡,而糖尿病组大鼠发病4wk时视网膜内核层可见散在的标记阳性的凋亡细胞,此时神经节细胞凋亡不甚明显,随着病程的延长,视网膜神经节细胞层及内核层的凋亡细胞逐渐增多,表明:糖尿病早期首先出现视网膜内层神经细胞凋亡,凋亡程度可能与糖尿病病程有关。视网膜神经节细胞是视觉信息传递的第三级神经元,其数量和功能的改变与视功能状态关系密切,视网膜神经节细胞及内核层细胞的凋亡最终可能导致视功能的下降。在细胞凋亡途径中,caspase-3占有至关重要的地位,它是细胞凋亡途径下游的关键执行分子,因此在细胞凋亡中caspase-3的表达变化具有重要意义。本结果显示糖尿病组大鼠4wk时caspase-3免疫组织化学染色即出现阳性表达,主要位于视网膜内核层及神经节细胞层,8wk及12wk时表达逐渐增强,这与TUNEL法检测糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡的发生位置、及随病程延长逐渐加重的发展变化趋势相一致。实验还发现在糖尿病4wk时,在神经节细胞层TUNEL法未出现明显染色阳性的细胞时,caspase-3已出现较为明显的阳性表达,提示caspase-3的激活早于TUNEL法检测到的细胞凋亡,从而也对caspase-3是细胞凋亡执行分子的观点加以解释。Caspase-3与细胞凋亡关系密切,目前已作为一项细胞凋亡的检测指标广泛应用于各种研究之中。除了应用免疫组化方法对caspase-3定性及定位的检测外,我们还对caspase-3的基因表达进行了定量分析以评估其随糖尿病病程发展变化的严重程度,发现糖尿病4wk时视网膜caspase-3的基因表达较正常大鼠相比明显增强,至8wk及12wk时更为显著,说明随糖尿病病程延长,caspase-3的基因表达逐渐增强,并与细胞凋亡

的严重程度呈正相关,因而可以推测糖尿病大鼠早期视网膜神经细胞的凋亡与caspase-3的表达增强有关,抑制其表达可能通过减轻视网膜神经细胞凋亡而达到神经保护的目的。

参考文献

- 1 李维业,徐国彤. 凋亡是糖尿病视网膜微血管病变和神经元病变的细胞病理学基础. 国际眼科纵览 2008; 32(2):73-77
- 2 Park JW, Park SJ, Park SH, et al. Up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase in experimental diabetic retina. *Neurobiol Dis* 2006;21:43-49
- 3 Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2003;243(1-2):147-152
- 4 Han Y, Adams AJ, Bearse MA Jr, et al. Multifocal electroretinogram and short-wavelength automated perimetry measures in diabetic eyes with little or no retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2004;122(12):1809-1815
- 5 Neckell A. Adaptometry in diabetic patients. *Ophthalmologia* 2007;51:95-97
- 6 Hancock HA, Kraft TW. Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(3):1002-1008
- 7 Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(2):283-290
- 8 Feit-Leichman RA, Kinouchi R, Takeda M, et al. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(11):4281-4287
- 9 Serrabassa PD, Dias AF, Vieira MF. New concepts on diabetic retinopathy: neural versus vascular damage. *Arq Bras Ophthalmol* 2008;71(3):459-463
- 10 Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, et al. Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des* 2007;13(26):2699-2712