

腺病毒介导的脑源性神经营养因子对早期糖尿病大鼠神经视网膜病变的影响

万超, 刘宁宁, 柳力敏, 才娜, 陈蕾

基金项目: 中国辽宁省博士科研启动基金资助项目 (No. 20101145)

作者单位: (110001) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 万超, 女, 博士, 讲师, 主治医师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。

通讯作者: 陈蕾, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。 hundred2005@126.com

收稿日期: 2010-10-19 修回日期: 2010-11-15

Effect of adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of diabetic rats

Chao Wan, Ning-Ning Liu, Li-Min Liu, Na Cai, Lei Chen

Foundation item: Scientific Research Foundation for Doctoral Program of Liaoning Province, China (No. 20101145)

Department of Ophthalmology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Lei Chen. Department of Ophthalmology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. hundred2005@126.com

Received: 2010-10-19 Accepted: 2010-11-15

Abstract

• **AIM:** To observe the changes of tyrosine hydroxylase (TH) protein levels and the density of dopaminergic amacrine cells before and after the administration of adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor (Ad. BDNF) into the vitreous cavities of streptozotocin (STZ) reduced Wistar diabetic rats.

• **METHODS:** Adult male Wistar rats, 9 weeks of age, were injected intraperitoneally with STZ to create diabetes models. Two weeks after the models were established, Ad. BDNF was administered into the vitreous cavities of rats. Four weeks after the models were established, the rats were killed and the retina was removed for Western blotting and Whole-mount immunohistochemistry for TH to observe the changes of TH and dopaminergic amacrine cells in retina.

• **RESULTS:** The protein levels of TH and the number of positive staining dopaminergic amacrine cells and the staining gray scale of experimental group without Ad. BDNF were statistically lower than that of the control group, there was statistical difference between two groups. But there were no statistical differences in experimental group with Ad. BDNF and control group.

• **CONCLUSION:** In the early stage of STZ diabetic, the administration of Ad. BDNF into the vitreous cavities can increase TH protein levels and the density of dopaminergic amacrine cells in the STZ rats' retina.

• **KEYWORDS:** Wistar rats; diabetic retinopathy; tyrosine hydroxylase; brain-derived neurotrophic factor; adenovirus

Wan C, Liu NN, Liu LM, *et al.* Effect of adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of diabetic rats. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):31-33

摘要

目的: 观察玻璃体腔内注射腺病毒介导的脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 前后 STZ 糖尿病大鼠视网膜中酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的水平及多巴胺能无长突细胞数目的变化。

方法: 选取 9 周龄 Wistar 大鼠, 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) ip, 制成糖尿病模型后 2wk, 玻璃体腔内注射含有 BDNF 基因的 5 型重组腺病毒 (Ad. BDNF), 模型建立后 4wk, 处死大鼠, 取视网膜组织进行 Western blotting 及视网膜铺片免疫组织化学染色检测, 观察视网膜中 TH 水平的变化, 从而反映糖尿病大鼠视网膜中多巴胺能无长突细胞水平的变化。

结果: 实验组糖尿病大鼠未注射 Ad. BDNF 眼视网膜中 TH 蛋白水平降低, 多巴胺能无长突细胞计数及灰度低于对照组, 均有统计学差异; 实验组注射 Ad. BDNF 眼视网膜中 TH 蛋白水平、多巴胺能无长突细胞计数及灰度与对照组无统计学差异。

结论: STZ 早期糖尿病大鼠玻璃体腔内注射 Ad. BDNF 可提高视网膜中 TH 的水平, 提高多巴胺能无长突细胞的数目。

关键词: Wistar 大鼠; 糖尿病视网膜病变; 酪氨酸羟化酶; 脑源性神经营养因子; 腺病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.011

万超, 刘宁宁, 柳力敏, 等. 腺病毒介导的脑源性神经营养因子对早期糖尿病大鼠神经视网膜病变的影响. 国际眼科杂志 2011; 11(1): 31-33

0 引言

糖尿病是以糖代谢紊乱为主要特征的常见病, 在糖尿病的并发症中, 发病最早、发病率最高、波及最广的应属眼部并发症, 其中又以糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 最为严重。DR 属于微血管病变, 但也是一种视网膜的神经变性类疾病。在糖尿病发生后不久, 且在血管并发症出现之前, 神经元内的分子功能就已经发生变化。糖尿病中视网膜的神经病变早于血管并发症出现, 并贯穿糖尿病的始终, 严重危害视力。神经变性后局部微环境中的神

经营养因子(neurotrophic factor, NTF)在其修复和再生的过程中发挥了重要作用,脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)就是较早被肯定的其中之一^[1]。多巴胺能神经元通过调节多巴胺的合成和释放来对多种刺激作出反应,而酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是多巴胺合成的限速酶,TH蛋白水平是视网膜多巴胺能无长突细胞的标志之一。我们采用载有BDNF基因的重组腺病毒(Ad. BDNF)注射入糖尿病大鼠玻璃体腔内,观察注射Ad. BDNF前后视网膜TH的水平及多巴胺能无长突细胞数目的变化,旨在为临床上治疗DR及BDNF的眼内应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 含有BDNF基因的5型重组腺病毒(Ad. BDNF),军事医学科学院基础研究所。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),Sigma公司。TH免疫组化染色试剂盒,武汉Boster生物有限公司。健康成年近交系9周龄雄性Wistar大鼠60只,体质量180~220g,中国医科大学实验动物部提供,眼部经裂隙灯和检眼镜检查屈光间质清晰,眼底无病变。分笼饲养,标准颗粒饲料,不限食水。饲养场所通风良好,室温18℃~25℃,相对湿度40%~70%,12h光照昼夜循环。尿糖试纸,桂林中辉科技发展有限公司。血糖仪,血糖试纸,德国罗氏公司。枸橼酸盐溶液0.1mmol/L(pH 4.5),高压灭菌,STZ浓度10g/L溶解于其中,使用前配制。大鼠禁食水12h,STZ 70mg/kg ip。其后48,72h,1wk连续3次采尾静脉血测空腹血糖,以空腹血糖>16.7mmol/L为制模成功,且1wk监测尿糖1次、每2wk监测血糖1次。

1.2 方法 以成模鼠作为实验组,对照组ip同样剂量的枸橼酸盐溶液,每组30只。大鼠成模后4wk,100g/L水合氯醛3mL/kg ip麻醉后,摘除双侧眼球备用。颈椎脱位法处死大鼠。于STZ或安慰剂ip后2wk,100g/L水合氯醛3mL/kg ip麻醉,20g/L利多卡因1滴表面麻醉成功后,随机选取大鼠一侧眼球,用微量进样器取含BDNF基因的腺病毒5μL注射入大鼠眼玻璃体腔内,对侧眼注入同样剂量的空载体Ad. LacZ。将出现玻璃体出血或眼球萎缩者剔除。

1.2.1 TH的检测 在显微镜下,将大鼠眼球去除眼前节,小心地分离出大鼠视网膜,将其放入1mL EP管中,加入裂解液,于冰上超声,4℃离心,取上清液,-70℃下保存,待检。应用酚试剂法蛋白定量,上样时确保每个样本的总蛋白量相同。兔抗-TH mAb(1:100倍稀释)作为一抗,羊抗兔IgG抗体(1:5000倍稀释)作为二抗。应用BandScan软件分析电泳条带的灰度值。

1.2.2 多巴胺能无长突细胞检测 将大鼠视网膜固定,脱脂,置1g/L PBS液中水合后,将视网膜切成若干瓣,注意使内界膜面向上,平铺于载玻片上。将标本放于含兔抗-TH mAb(1:100倍稀释)、5g/L Triton X-100的PBS液中4℃孵育72h,PBS洗后,于羊抗兔IgG抗体(1:100倍稀释)中4℃孵育24h,DAB显色。中性树胶封片,置显微镜下观察。可分辨出多巴胺能无长突细胞。每张铺片计数5个高倍视野中标记的细胞数目。

统计学分析:计数资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS 12.0数据分析软件包,组间比较采用t检验对数据进行处理,取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 视网膜中TH蛋白水平 TH蛋白水平用同一泳道的

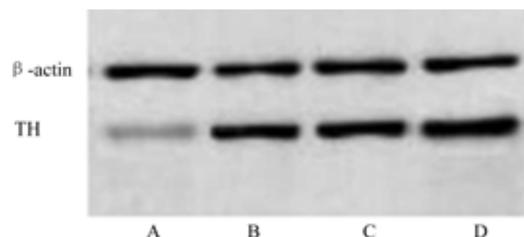


图1 大鼠视网膜TH蛋白Western blotting检测 A:实验组未注射Ad. BDNF眼;B:实验组注射Ad. BDNF眼;C:对照组未注射Ad. BDNF眼;D:对照组注射Ad. BDNF眼。

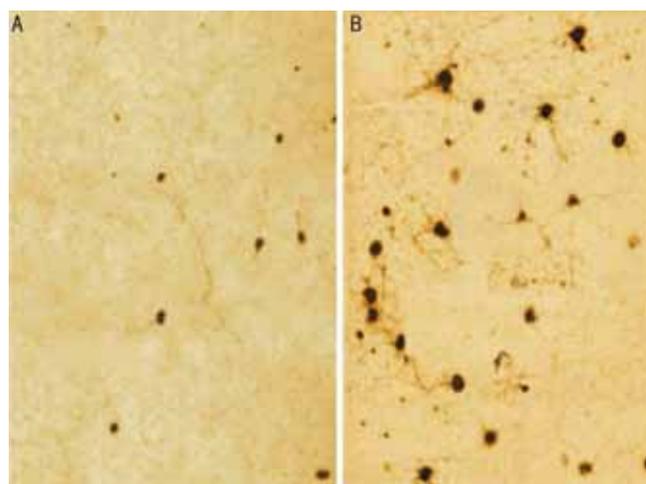


图2 实验组大鼠视网膜TH的表达(SABC×400) A:未注射Ad. BDNF眼;B:注射Ad. BDNF眼。

表1 视网膜中TH的表达 $\bar{x} \pm s$

| | Ad. BDNF | |
|----------------------|---------------------------|------------|
| | 未注射 | 注射 |
| Western blotting 灰度值 | | |
| 实验组 | 20.7 ± 4.3 ^{b,d} | 40.5 ± 4.5 |
| 对照组 | 54.2 ± 4.8 | 57.5 ± 2.6 |
| 阳性细胞数 | | |
| 实验组 | 14.3 ± 3.5 ^{b,d} | 35.2 ± 3.5 |
| 对照组 | 37.5 ± 6.2 | 36.2 ± 6.8 |
| 阳性细胞灰度值 | | |
| 实验组 | 37.9 ± 4.4 ^{b,d} | 75.3 ± 2.2 |
| 对照组 | 80.2 ± 1.7 | 82.3 ± 3.9 |

^b $P < 0.01$ vs实验组注射Ad. BDNF;^d $P < 0.01$ vs对照组。

β -actin水平来标准化可见,实验组大鼠未注射Ad. BDNF眼TH蛋白灰度明显低于对侧眼和对照组眼($P < 0.01$)。而实验组大鼠注射Ad. BDNF眼、对照组注射与未注射Ad. BDNF眼三者间两两相比较,TH蛋白水平无统计学差异(图1,表1)。

2.2 TH阳性细胞 每张铺片分别计数5个高倍视野的TH阳性细胞数值,并取其平均值,实验组未注射Ad. BDNF眼的TH阳性细胞平均值明显低于对侧眼和对照组眼($P < 0.01$)。而实验组大鼠注射Ad. BDNF眼、对照组注射与未注射Ad. BDNF眼TH阳性细胞平均值无统计学差异(图2,表1)。TH阳性细胞的染色灰度值,并取其平均值,实验组未注射Ad. BDNF眼的TH阳性细胞染色灰度平均值明显低于对侧眼和对照组眼($P < 0.01$)。而实验组大鼠注射Ad. BDNF眼、对照组注射与未注射Ad. BDNF眼TH阳性细胞的染色灰度平均值无统计学差异(表1)。

3 讨论

BDNF 主要在视网膜光感受器细胞层、内核层、神经节细胞和神经纤维层中表达,大部分由视网膜自身分泌,对神经节细胞的存活起重要作用,无长突细胞可能是其主要来源^[2]。Cui 等^[3]研究发现视神经损伤后,BDNF 基因表达上调,BDNF 对视网膜和视神经损伤、视网膜缺血及化学性损伤、光感受器细胞的损伤后恢复及再生等方面具有十分重要的作用。目前,它被认为是抗凋亡剂、钙通道阻滞剂和抗氧化剂。

多巴胺与人体许多基本功能相关,在视网膜,多巴胺由无长突细胞释放,并激活分布于视网膜上的多巴胺受体发挥作用,它在视网膜的功能中发挥重要和复杂的作用。目前的研究认为^[4],神经视网膜与多巴胺能系统之间的相互作用是一个双向的通路,多巴胺可能是神经视网膜细胞间相互反馈的信使。多巴胺有 D₁ 和 D₂ 两个受体,多巴胺能无长突细胞的末梢与水平细胞成突触,释放多巴胺作用到水平细胞的 D₁ 受体上,降低水平细胞对光的反应。多巴胺 D₂ 受体属于多巴胺神经元的自身受体,具有突触前负反馈的功能,可以调节多巴胺能神经元的多巴胺释放。D₁ 和 D₂ 受体之间相互作用完成多巴胺的生理功能,多巴胺可与众多神经活性物质发生相互作用,多巴胺能神经元释放多巴胺到光感受器和视网膜色素上皮细胞上的多巴胺受体上,通过与 D₁ 结合引起视网膜光感受器细胞的变化,多巴胺是从视网膜到视网膜色素上皮细胞的传导媒介。此外多巴胺又通过 D₂ 抑制腺苷酸环化酶 (AC) 的活性,降低 cAMP 水平,反馈抑制多巴胺的释放。因此,多巴胺在视网膜起神经-激素作用。此过程中的关键角色是多巴胺合成的限速酶 TH,它和多巴胺一样,都分布于整个细胞,包括最为精细的突起和末梢。因此本实验采用 TH 蛋白水平的检测来反映视网膜多巴胺能无长突细胞的功能,采用 TH 阳性的细胞来反映视网膜多巴胺能无长突细胞的数目。

糖尿病中多巴胺能无长突细胞发生变性的可能机制为:(1)严重的胰岛素剥夺,见于 STZ 所致的糖尿病。研究认为,胰岛素是体外无长突细胞生存的重要因子。(2)高血糖。体外培养结果表明,过量的糖破坏视网膜中胰岛素刺激细胞的生存和胰岛素受体的信号传递。(3)视网膜 Müller's 细胞功能障碍。Li 等^[5]和 Carrasco 等^[6]认为糖尿病时,Müller's 细胞中谷氨酸-天冬氨酸转运功能降低,并且天冬氨酸的合成遭到破坏,这些功能障碍导致视网膜谷氨酸水平增加,对无长突细胞具有毒性。在本实验中,我们检测到 STZ 大鼠视网膜 TH 水平和视网膜多巴胺能无长突细胞的数目较非糖尿病大鼠明显降低。

研究认为多巴胺能无长突细胞的变性可能导致 BDNF 水平的降低,小鼠 BDNF 基因的零突变可以导致多巴胺能无长突细胞的萎缩^[7]。在黑质及体内、外培养的视网膜无长突细胞中,BDNF 可以阻止多巴胺能神经元的死亡^[8]。Agudo 等^[9]和 Weber 等^[10]研究发现,在成人视网膜中,超过 90% 的神经节细胞在轴索切断后 2wk 内死亡,如果于切断视神经即刻向玻璃体腔内注射 BDNF,神经节细胞就能够存活。但是这种方式只是暂时的,只能使神经节细胞的死亡延缓约 3d 的时间。

由于 BDNF 不能通过血-脑屏障,因此,神经营养因子的局部应用优于全身应用,故局部应用能直接或通过局部血液循环在微环境中维持较高的浓度,还能避免全身应用的副作用,但局部应用往往需反复注射,若应用基因治疗的办法,可以通过导入外源基因在体内表达,在一段时间内持续提供高浓度的蛋白药物治疗,这对中枢神经系统有极大的优越性。因此,向玻璃体腔内局部注射腺病毒可有效地将外源基因转染到视网膜细胞。因此采用重组腺病毒作为载体来延长 BDNF 发挥作用的时间的方法就具有可能性和实用性。本实验中,我们应用腺病毒介导的 BDNF 玻璃体腔内注射的方法能够使视网膜 BDNF 表达增加,旨在提高视网膜中 TH 的水平,提高多巴胺能无长突细胞的数目。

在本研究中,我们将应用腺病毒的空载体 Ad. LacZ 玻璃体腔内注射的对照组眼 TH 蛋白水平及 TH 阳性细胞的平均数与未注射 Ad. BDNF 的对照组眼相比较,其结果无统计学差异。因此,我们认为,玻璃体腔内注射 Ad. BDNF 引起的 TH 蛋白水平及无长突细胞平均数的增加并非腺病毒载体本身的作用。

综上,通过腺病毒介导外源性 BDNF 基因的转染,可以获得 BDNF 蛋白的高效、长效表达,这将为进一步修复视神经损伤和恢复一定程度的视功能提供前提条件,随着研究进一步深入,BDNF 为临床应用奠定了实验基础。

参考文献

- 1 Takano M, Horie H, Iijima Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor enhances neurite regeneration from retinal ganglion cells in aged human retina *in vitro*. *Exp Eye Res* 2002;74(2):319-323
- 2 Isenmann S, Kretz A, Cellerno A. Molecular determinants of retinal ganglion cell development survival and regeneration. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(4):483-543
- 3 Cui IL, Kang J, Wang L, et al. Effect of neurotrophic factors on the expression of retinal growth associated protein-43 mRNA in retina after optic nerve injuries. *Int J Ophthalmol* 2005;5(5):902-906
- 4 Brandies R, Yehuda S. The possible role of retinal dopaminergic system in visual performance. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32(4):611-656
- 5 Li Q, Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(9):3109-3116
- 6 Carrasco E, Hernandez C, de Torres I, et al. Lowered cortistatin expression is an early event in the human diabetic retina and is associated with apoptosis and glial activation. *Mol Vis* 2008;15(14):1496-1502
- 7 Loeliger MM, Briscoe T, Rees SM. BDNF increases survival of retinal dopaminergic neurons after prenatal compromise. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(3):1282-1289
- 8 Cusato K, Bosco A, Linden R, et al. Cell death in the inner nuclear layer of the retina is modulated by BDNF. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;139(2):325-330
- 9 Agudo M, Pérez-Marín MC, Lönnngren U, et al. Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis* 2008;14(6):1050-1063
- 10 Weber AJ, Harman CD, Viswanathan S. Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina. *J Physiol* 2008;586(9):4393-4400