

PEDF 对视神经夹伤模型大鼠视网膜组织中 NO 和 Caspase-3 表达的影响

严肖啸¹, 贾海波², 尹晓玲¹, 崔翠¹, 蒲卫星¹, 霍楠¹, 赵军波¹

作者单位:¹(056001) 中国河北省邯郸市中心医院眼科;
²(056008) 中国河北省邯郸市中心医院神经外科

作者简介:严肖啸,女,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:赵军波,男,副主任医师,研究方向:眼外伤、眼底病。

hdzxyyk@126.com

收稿日期:2017-01-16 修回日期:2017-05-09

Effect of pigment epithelium derived factor on NO and the expression of caspase-3 in retinal tissues of model rats with optic nerve crush injury

Xiao-Xiao Yan¹, Hai-Bo Jia², Xiao-Ling Yin¹, Cui Cui¹, Wei-Xing Pu¹, Nan Huo¹, Jun-Bo Zhao¹

¹Department of Ophthalmology, Handan Central Hospital, Handan 056001, Hebei Province, China; ²The Third Department of Neurosurgery, Handan Central Hospital, Handan 056008, Hebei Province, China

Correspondence to: Jun-Bo Zhao. Department of Ophthalmology, Handan Central Hospital, Handan 056008, Hebei Province, China. hdzxyyk@126.com

Received:2017-01-16 Accepted:2017-05-09

Abstract

• **AIM:** To analyze the effect of pigment epithelium derived factor (PEDF) on nitrogen monoxide (NO) and expression of cysteine-containing, aspartate-specific proteases-3 (caspase-3) in retinal tissues of model rats with optic nerve crush injury.

• **METHODS:** A total of 60 SD rats were randomly divided into the blank control group, model group and PEDF group, with 20 rats in each group. Except the blank control group, the optic nerve crush injury rat models were established in the other groups, and left eyeballs were taken as samples. After successfully modeling, the model group were treated with intravitreal injection of 5μL of balanced salt solution while PEDF group were treated with intravitreal injection of 5μL of PEDF (0.2μg/μL). Two weeks later, the retinal tissues were collected, and changes of shape were observed under microscope after HE staining. The changes of NO level were measured by colorimetry assay, the expression of caspase-3 mRNA and caspase-3 protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blot.

• **RESULTS:** HE staining showed that retinal tissues of

the blank control group arranged neatly and clearly. Retinal ganglion cells (RGCs) arranged in a monolayer, and cells were oval, uniform in size and distribution, the cell nuclei were clear, closely arranged, with clear boundaries. The retinal tissues of the model group were sparse in shape, RGCs showed vacuolar changes, the overall number of cells was reduced, and cell nuclei of residual RGCs showed pyknosis and uneven staining. RGCs in PEDF group were with slightly edema and arranged closely, and the degree of injury was significantly milder than that in the model group. Levels of Caspase-3 mRNA and protein and NO levels in the three groups showed the model group > PEDF group > blank control group (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The application of PEDF can down regulate the expression of Caspase-3 and NO in rates with optic nerve injury and reduce RGCs injury.

• **KEYWORDS:** optic nerve crush injury; pigment epithelium derived factor; nitrogen monoxide; Caspase-3

Citation: Yan XX, Jia HB, Yin XL, *et al.* Effect of pigment epithelium derived factor on NO and the expression of caspase-3 in retinal tissues of model rats with optic nerve crush injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(6):1047-1050

摘要

目的: 分析色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 对视神经夹伤模型大鼠视网膜组织一氧化氮 (nitrogen monoxide, NO)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (cysteine-containing aspartate-specific proteases-3, Caspase-3) 表达的影响。

方法: 选择 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、PEDF 组各 20 只,除空白对照组外,均建立视神经夹伤大鼠模型,均取左侧眼球为标本,造模成功后,模型组玻璃体腔内注射平衡盐溶液 5μL, PEDF 组玻璃体内注射 5μL PEDF (浓度 0.2μg/μL)。2wk 后取视网膜组织,行 HE 染色后光镜下观察视网膜形态的变化,采用比色法测定 NO 含量的变化,采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法、蛋白印迹法 (Western-blot) 检测 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达情况。

结果: HE 染色发现,空白对照组视网膜组织排列整齐且清晰,视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 呈单层细胞排列,细胞为卵圆形,大小均匀,分布均匀,细胞核清晰,排列紧密,边界清晰;模型组视网膜组织结构稀疏, RGCs 呈空泡样变化,整体细胞数量减少,残留 RGCs 细胞核固缩,染色不均。PEDF 组视网膜组织残留神经节细胞轻微水肿,但 RGCs 细胞层排列尚且紧密,且受损

程度明显轻于模型组;模型组、PEDF组 Caspase-3 mRNA和蛋白水平高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);PDEF组 Caspase-3 mRNA和蛋白水平低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组、PEDF组 NO含量高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);PEDF组 NO含量低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:采用 PEDF 干预可下调视神经损伤大鼠 Caspase-3、NO 的表达,减轻 RGCs 细胞损伤。

关键词:视神经夹伤;色素上皮衍生因子;一氧化氮;Caspase-3

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.6.09

引用:严肖啸,贾海波,尹晓玲,等. PEDF 对视神经夹伤模型大鼠视网膜组织中 NO 和 Caspase-3 表达的影响. 国际眼科杂志 2017;17(6):1047-1050

0 引言

视神经损伤是眼科多发疾病,常与颅脑损伤并发,约占头部闭合性损伤的 0.5%~5%,是引起视功能严重受损的重要原因^[1]。而视神经是由视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)轴突汇聚形成,其损伤后病理特点以神经节细胞继发性功能丧失为主,目前尚未完全明确其具体致病机制。近年有研究发现,神经毒素因子一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)大量释放及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(cysteine-containing aspartate-specific proteases-3, Caspase-3)所介导蛋白酶级联反应均在视神经损伤中有其重要作用^[2-3]。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)则为具有强神经营养作用糖蛋白,对中央神经系统有其广泛的保护作用,可保护活体感光细胞光损伤程度及氧化应激中培养视网膜细胞存活,减少局部缺血所致 RGCs 凋亡^[4]。基于此,为探讨 PEDF 对视神经夹伤大鼠视网膜组织 NO 和 Caspase-3 表达的影响,本研究建立了视神经夹伤大鼠模型,并予 PEDF 干预,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康成年 SD 大鼠 60 只(由河北医科大学实验动物中心提供,合格证号:DK0411-0095),8~10 周龄,体质量 200~250g,雌性,无眼疾,光反应敏感,双眼屈光间质清,瞳孔正常,眼底未见异常,常规饲养 3d,干湿度恒定,光线恒定,通风干燥,自由进食、饮水,符合动物保护条例。

1.1.2 主要仪器与试剂 RM-2015 型/UC-7 型切片机购于德国莱卡公司, Olympus BX51T-PHD-J11 型光学显微镜购于日本 Olympus 公司, LDZ-5 型离心机购于北京离心机厂, 三洋 MDF-328E 型低温冰箱购于日本三洋公司,左氧氟沙星滴眼液购于江苏汉晨药业有限公司, PEDF 购于美国 Peprotech 公司,氧氟沙星眼膏购于上海通用药业股份有限公司, GAPDH、Caspase-3 兔抗大鼠多克隆抗体购于美国 Sigma 公司, Taq DNA 聚合酶、Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒均购自 TakaRA 公司, Caspase-3 引物设计采用 Primer5.0 引物设计软件, NO 试剂盒购于南京建成生物工程研究所,其余试剂均为国产化学分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分组与建模 将 60 只大鼠随机分为空白对照组、模型组与 PEDF 组,每组各 20 只,除空白对照组外,均建立视神经夹伤大鼠模型,参照文献^[5]建立视神经夹伤大鼠模型,建模前 3d 左氧氟沙星滴眼液点眼,6 滴/d,禁食 12h 后腹腔注射水合氯醛(10%)麻醉(0.35mL/100g),固定大鼠于手术台,碘伏消毒左眼,铺巾,自角巩膜缘环形切开颞侧球结膜 4mm,暴露视神经眶内段,显微镜血管夹钳夹视神经 20s,夹持力 98g,见术眼瞳孔散大,光反射消失,眼底检查视网膜血管无梗塞、出血,眼压正常,未见眼球突出或眼睑闭合不全则视为造模成功,缝合球结膜,结膜囊内涂氧氟沙星眼膏。

1.2.2 给药方法 空白对照组不予药物干预,模型组建模成功后玻璃体腔内注射平衡盐溶液 5 μ L, PEDF 组经玻璃体腔内注射 PEDF 5 μ L(浓度 0.2 μ g/ μ L),术后 7、14d 模型组和 PEDF 组分别注入相应溶液。

1.2.3 标本取材及处理 术后 14d 处死大鼠,10%水合氯醛(0.35mL/100g)腹腔注射麻醉三组大鼠,仰卧,固定四肢,剪胸部毛发,沿胸部正中偏左处垂直切开,分离皮下组织,剪肋骨,暴露心脏,左心室进管,灌注生理盐水+多聚甲醛磷酸缓冲液(4%),见黏膜苍白、肢体僵直,口腔鼻腔内见清亮液体流出后停止,摘除眼球,保留球后神经 5mm,眼球角膜划口,4%多聚甲醛固定 24h,剪去眼前段,采用镊子取出晶状体、玻璃体,保留眼环,固定 4h,石蜡包埋,视网膜组织切片。

1.2.4 观察指标 (1)视网膜组织形态观察:切片常规 HE 染色,光镜下观察视网膜形态变化及 RGCs 形态、数量变化。(2)Caspase-3 表达测定:采用 Trizol 试剂盒抽提视网膜总 RNA,采用紫外分光光度计测定总 RNA 含量,采用 RT-PCR 试剂盒逆转录合成 cDNA,行 PCR 扩增, Caspase-3 上游引物序列:5'-AGAGCTGCACTGCGGTATTGAG-3',下游引物序列:5'-GAACCATGACCCGTCCCTTG-3'; GAPDH 内参上游引物序列:5'-ATCTTCCAGGAGCGAGAT-3',下游引物序列:5'-TAAGCAGTTGGTGGTGCA-3',取扩增产物,电泳,采用凝胶图像分析仪作光密度分析,计算其光密度积分比反映 Caspase-3 mRNA 表达水平。将剩余样本离心 30min,取上清,测定总蛋白浓度,加浓缩胶,恒压,分离胶,恒压,湿转,恒压,摇床封闭(37 $^{\circ}$ C),洗膜 10min \times 3 次,加兔抗鼠抗体 Caspase-3(1:50)过夜,洗膜 5min \times 4 次,加山羊抗兔抗体(1:200),摇床孵育 90min(37 $^{\circ}$ C),洗膜 5min \times 4 次,洗膜 10min, DAB 显色,采用图像分析仪测定量化 Caspase-3 灰度积分比值,作为 Caspase-3 蛋白相对表达量。(3)NO 水平测定:采用比色法测定视网膜组织 NO 水平,剥离视网膜后称重,置于 2mL 玻璃匀浆器内,加 9 倍视网膜重量预冷生理盐水,研磨 10min,并将匀浆转移至离心管,高速冷冻离心 20min,取上清液,测定 NO 含量。

统计学分析:采用 SPSS20.0 统计学软件进行处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行独立样本 t 检验,多组比较进行单因素方差分析,组内比较行 LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜组织形态学变化 空白对照组视网膜组织排列整齐,从内至外依次为 RGCs 层、双极细胞层与感光细

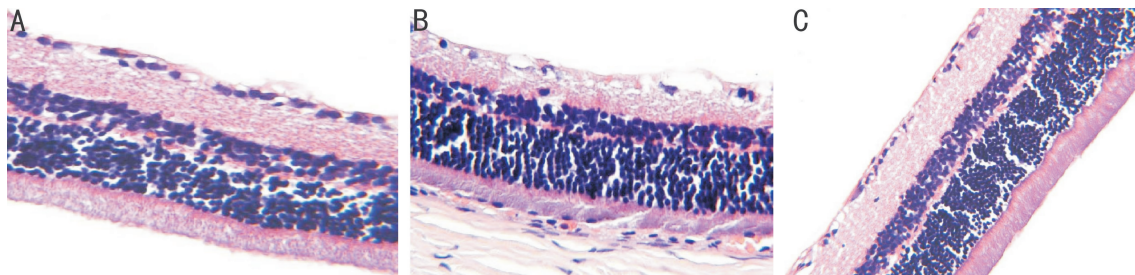


图1 三组大鼠视网膜组织形态学变化(HE×400) A:空白对照组;B:模型组;C:PEDF组。

表1 三组视网膜组织 Caspase-3 表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	眼数	Caspase-3 mRNA	Caspase-3 蛋白
空白对照组	20	0.51±0.12	0.95±0.07
模型组	20	2.33±0.48 ^a	3.45±0.33 ^a
PEDF组	20	1.25±0.28 ^{a,c}	2.14±0.11 ^{a,c}
<i>F</i>		6.417	7.658
<i>P</i>		<0.05	<0.05

注:^a*P*<0.05 vs 空白对照组;^c*P*<0.05 vs PEDF组。



图2 三组大鼠视网膜组织中 Caspase-3 mRNA 的表达(从左至右依次为模型组、PEDF组、空白对照组)。

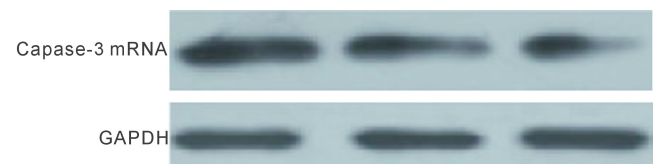


图3 三组大鼠视网膜组织中 Caspase-3 蛋白表达(从左至右依次为模型组、PEDF组、空白对照组)。

胞层,排列较为清晰,RGCs呈单层细胞排列,细胞为卵圆形,大小均匀,分布均匀,细胞核清晰,排列紧密,细胞与细胞边界清晰,无坏死细胞及炎细胞浸润(图1A);模型组视网膜组织结构稀疏,RGCs呈空泡样变化,整体细胞数量减少,残留RGCs细胞核见固缩,染色不均(图1B)。PEDF组视网膜组织残留神经节细胞轻微水肿,但RGCs细胞层排列尚且紧密,且受损程度明显轻于模型组(图1C)。

2.2 三组大鼠视网膜组织 Caspase-3 表达比较 各组 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达分别见图2~3,模型组、PEDF组 Caspase-3 mRNA ($t=16.450、10.863$)和蛋白水平($t=33.1424、40.816$)高于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),PEDF组 Caspase-3 mRNA 和蛋白水平低于模型组,差异有统计学意义($t=8.691、16.841$,均 $P<0.05$,表1)。

2.3 三组大鼠视网膜组织 NO 含量比较 三组大鼠 NO 含量对比,差异有统计学意义($F=5.789, P<0.05$),模型组($2.19 \pm 0.11 \mu\text{mol/g}$)、PEDF组($1.92 \pm 0.04 \mu\text{mol/g}$)NO含量高于空白对照组($1.52 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$),差异有统计学意义($t=27.127、43.386$,均 $P<0.05$),PEDF组 NO 含量低于模型组,差异有统计学意义($t=10.316, P<0.05$)。

3 讨论

视神经损伤是眼科常见疾病,且其发病机制复杂,炎症反应、颅脑外伤、颅内肿物挤压、青光眼等均与视神经损伤有关^[6]。早期常采用保守疗法或手术干预视神经损伤,皮质类固醇类药物冲击治疗是目前治疗视神经损伤的常用方案,但其疗效有其个体差异性,效果不尽理想^[7-8]。近期也有研究^[9]发现,视神经损伤后 RGCs 数量减少是引起患者视觉功能降低的主要原因,同时细胞凋亡及坏死则是引起 RGCs 数量减少的原因。林琳等^[10]表示,水肿、炎症、钙离子内流、神经营养因子水平降低、脂质过氧化反应均与 RGCs 细胞凋亡有关。而 Caspase-3 则为凋亡级联反应中最为关键的酶,正常生理条件下,其以无活性前 Caspase-3 形式存在于细胞内,而细胞凋亡时,其受上游蛋白酶切割活化的影响, Caspase-3 活化,切割下游底物,促使其参与 DNA 损伤修复过程,导致 DNA 依赖性蛋白激酶活性丧失,引起细胞凋亡形态学变化,导致染色质浓缩,并激活核酸酶,参与 DNA 断裂过程,并出现核固缩表现^[11]。本研究发现,模型组、PEDF组 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平均高于空白对照组,与何家全等^[12]研究结果一致,表明 Caspase-3 在视神经损伤病理过程中有其重要作用,参与视神经损伤的发病过程。

NO 则为人体内广泛存在的、多功能、可扩散的信使分子,其与细胞凋亡的关系近年来引起较多研究者的关注^[13-14]。王爽等^[15]发现,NO 由一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸脱羧基而产生,对损伤神经节细胞有其较强的细胞毒性,可诱导细胞凋亡。在正常生理条件下,NO 主要通过神经元型(nNOS)与内皮型一氧化氮合酶(eNOS)催化形成,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)一般未发挥作用。在病理状态下,受到缺氧、缺血或创伤刺激,iNOS 表达增多,经诱导合成释放大量 NO,加重 RGCs 损伤,促进其凋亡。视神经横断后,其内部小胶质细胞及 Muller 细胞 iNOS 表达水平上调,NO 合成增多,诱导神经损伤。此外,高水平 NO 可影响脑源性神经营养因子神经保护作用,而清除 NO 则可改善其神经营养作用。本研究发现,模型组与 PEDF 组视网膜组织 NO 水平明显高于正常对照组,与相关研究^[16]结论相符。

PEDF 则为从视网膜色素上皮细胞内提取的神经营养物质,其与大部分神经营养因子类似,广泛表达于人体脑组织、脊髓、心脏、血管内皮细胞、骨骼肌及成骨细胞内^[17],可抗氧化、抗炎症、抗血管生成,同时有显著的神经保护作用,其可通过与细胞表层特异性受体结合触发细胞内级联反应,发挥抗凋亡作用。动物实验^[18]发现, PEDF 对神经元具备较强的保护作用,其可抑制神经元萎缩。Rogers 等^[19]表示, PEDF 可明显减轻患者运动神经元变性。但目前尚未明确其对视神经节细胞凋亡数量减少的

机制。一般视神经损伤后视觉功能的保留及恢复主要取决于RGCs存活数量,而采用PEDF干预后,其对受损视神经具备明显保护作用,且可抑制RGCs细胞凋亡。本研究中,PEDF大鼠在进行PEDF干预2wk后,视神经损伤程度较模型组明显减轻,且RGCs数量多于模型组,Caspase-3 mRNA和蛋白表达水平及NO表达水平低于模型组,肯定了PEDF在视神经损伤中的治疗作用,可能与PEDF可发挥神经保护作用、抑制视神经损伤后Caspase-3表达、减少视神经细胞凋亡有关。此外,PEDF同时具备抗氧化效应,可减少视神经组织氧耗,抗血管生成,抑制炎症因子表达,快速清除NO,阻断NO合成,减轻RGCs细胞损伤。

综上所述,Caspase-3、NO均参与视神经损伤病理过程,是诱导RGCs细胞凋亡的重要原因,而采用PEDF干预可发挥视神经保护作用,下调Caspase-3、NO表达,减轻RGCs细胞损伤。

参考文献

- 1 刘晓坤,张晓宇,王赟,等.米诺环素对大鼠视神经挫伤后视网膜Caspase-3表达的影响.眼科新进展 2013;33(12):1132-1135
- 2 Goldenberg-Cohen N,Dratviman-Storobinsky O,Dadon Bar EIS, et al. Protective effect of Bax ablation against cell loss in the retinal ganglion layer induced by optic nerve crush in transgenic mice. *J Neuroophthalmol* 2011;31(4):331-338
- 3 刘恬,刘奕志,钟惟德,等.色素上皮衍生因子对晶状体上皮细胞生长的促进作用及其机制.中华实验眼科杂志 2015;33(4):342-346
- 4 秦柏,管怀进,张俊芳,等.视神经夹伤合并晶状体损伤大鼠视网膜中神经元型一氧化氮合酶的表达.眼科新进展 2013;33(12):1128-1131
- 5 安晶,殷浩,张作明,等.两种常用大鼠视神经钳夹伤模型造模效果的比较.中华实验眼科杂志 2016;34(4):305-311
- 6 张顺立,白倩,张倩,等.醛糖还原酶基因敲除促进视神经损伤后巨噬细胞向M2方向极化并促进视神经功能恢复.细胞与分子免疫学杂志 2014;30(5):505-508

- 7 张俊琦,胡丽荣,邢达勇,等.兔视神经损伤后视网膜一氧化氮的表达与神经节细胞凋亡关系的研究.中华眼外伤职业眼病杂志 2013;35(10):726-730
- 8 Joachim SC,Mondon C,Gramlich OW, et al. Apoptotic retinal ganglion cell death in an autoimmune glaucoma model is accompanied by antibody depositions. *J Mol Neurosci* 2014;52(2):216-224
- 9 林琳,王茜,买买江·阿不力孜,等.视神经减压及地塞米松干预视神经损伤模型兔视网膜Nogo-A Caspase-3的变化.中国医药导刊 2015;17(4):390-396
- 10 林琳,买买江·阿不力孜,张永辉,等.视神经减压术干预兔视神经损伤模型视网膜Caspase-3变化.中华神经外科疾病研究杂志 2016;15(1):82-84
- 11 张静,李平华.米诺环素对急性视神经炎视神经轴突及Caspase-3表达的影响.国际眼科杂志 2011;11(8):1337-1339
- 12 何家全,杨忠,蔡文琴,等.大鼠视神经的发育学研究.西部医学 2015;27(4):486-489
- 13 李芸,高玲,杨竹林,等.视网膜母细胞瘤组织中claudin-1和snail的表达及意义.医学临床研究 2013;30(3):464-466,469
- 14 Estíbaliz GF,María Victoria SG,Alberto PS, et al. A₃ Adenosine Receptors Mediate Oligodendrocyte Death and Ischemic Damage to Optic Nerve. *Glia* 2014;62(2):199-216
- 15 王爽,梁申芝,万光明,等.高度近视对糖尿病豚鼠视网膜血管内皮生长因子和色素上皮衍生因子表达的影响.中华实验眼科杂志 2014;32(5):398-402
- 16 陈禾君,沈玺.色素上皮衍生因子(PEDF)——一个具有临床潜力多功能因子.中国实用眼科杂志 2016;34(7):653-656
- 17 Li C,Zhou Y,Liu Z, et al. Spatiotemporal expression of postsynaptic density 95 in rat retina after optic nerve injury. *J Mol Neurosci* 2012;46(3):595-605
- 18 杨艳芳,汪海平,黄莉钧,等.色素上皮衍生因子PEDF全基因敲除诱导脂肪堆积的作用及机制.中山大学学报(医学科学版) 2016;37(3):351-358
- 19 Rogers R,Dharsee M,Ackloo S, et al. Proteomics analyses of activated human optic nerve head lamina cribrosa cells following biomechanical strain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(7):3806-3816