

大鼠视网膜发育过程中 GAP-43 表达的差异性

王迎彬¹, 王新¹, 朱益华²

作者单位:¹(450003)中国河南省郑州市,郑州人民医院卓美眼科;²(350005)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院眼科

作者简介:王迎彬,硕士,研究方向:眼科临床。

通讯作者:朱益华,博士,硕士研究生导师,研究方向:青光眼。
zhuyihua889@163.com

收稿日期:2010-10-18 修回日期:2010-11-08

Expression of GAP-43 in the retina of rats during development phase

Ying-Bin Wang¹, Xin Wang¹, Yi-Hua Zhu²

¹Department of Zhuomei Ophthalmology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Yi-Hua Zhu, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. zhuyihua889@163.com

Received: 2010-10-18 Accepted: 2010-11-08

Abstract

• AIM: To investigate the expression of GAP-43 in the retina of normal rats during the development phase.

• METHODS: RT-PCR method was used to detect the expression of mRNA in the retina of normal rats at the different age of postnatal. Immunohistochemical method was used to detect protein. And statistical analysis was performed on the experimental results.

• RESULTS: The result of RT-PCR showed that GAP-43 continually rose before the 21st day of postnatal development and then reduced to a low level in the adulthood. With the development, the expression of GAP-43 got to highest at the age of P21 and then reduced to a low level in the adulthood. There was significance among different groups ($P < 0.01$)

• CONCLUSION: In the retina of normal rats and the time course of the critical period during development, GAP-43 mRNA and GAP-43 protein expression continually rise before the 21st day of postnatal development and then reduce to a low level in the adulthood.

• KEYWORDS: GAP-43; development; retina; RT-PCR; immunohistochemistry

Wang YB, Wang X, Zhu YH. Expression of GAP-43 in the retina of rats during development phase. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(12):2259-2261

摘要

目的:研究 GAP-43 在正常大鼠视网膜发育过程中差异表达。

方法:采用 RT-PCR 方法检测正常大鼠生后不同时期视网膜发育过程中 GAP-43 mRNA 水平的表达差异;通过免疫组化检测其蛋白水平的表达差异,并对实验结果进行统计分析。

结果:大鼠视网膜 GAP-43 mRNA 表达量在生后逐渐升高,在 P21 表达量最多,之后逐渐下降,到成年时维持在一个较低水平。各组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

结论:正常大鼠视网膜发育过程中 GAP-43 mRNA 及 GAP-43 蛋白水平的表达在生后逐渐升高,之后逐渐下降。

关键词:GAP-43;发育;视网膜;实时荧光定量 RT-PCR;免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.12.009

王迎彬,王新,朱益华. 大鼠视网膜发育过程中 GAP-43 表达的差异性. *国际眼科杂志* 2010;10(12):2259-2261

0 引言

GAP-43 是一种磷酸蛋白,属于钙调素 (calmodulin, CaM) 结合蛋白,分子质量 43kD,由神经元胞体合成,通过快速轴流转运到神经末梢。GAP-43 与神经系统的发育、突触的形成、神经的可塑性和神经的再生密切相关。由于 GAP-43 在神经纤维的生长、发育、轴突再生以及突触功能的维持等方面起着重要作用,并参与神经递质释放的调节,被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子^[1]。我们通过 RT-PCR 和免疫组化的方法研究 GAP-43 mRNA 和蛋白在视网膜发育过程的表达差异和时空表达规律,探讨 GAP-43 在视觉发育过程中的变化及其意义。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新生雄性 Sprague-Dawley 大鼠 70 只,清洁级。饲养室温 18 ~ 25℃,空气流通,相对湿度 40% ~ 70%;哺乳期幼鼠与母鼠同笼饲养;动物自由摄食饮水,饲料为鼠颗粒饲料。引物由 Takara 公司合成,PAGE 级纯化(表 1)。

1.2 方法 采用完全随机设计,分为 7 组,每组 10 只。1 组出生当天 (postnatal 0 days, P0) 取材,其余 6 组相同条件下分别饲养至生后 3d (P3), 7d (P7), 14d (P14), 21d (P21), 28d (P28) 和 60d (P60) 取材,每次 5 只用于 Real time PCR,其余 5 只用于免疫组织化学实验。各实验组大鼠饲养到相应天龄,速眠新麻醉剂 0.3mL/kg im 麻醉后,消毒眼周皮肤,无菌条件下摘除眼球,置于高压过的 PBS 中。每个时间点取其中 5 只大鼠眼球在显微镜下迅速取出视网膜放入 Trizol 1mL 中,用于 RT-PCR。每个时间点取其中 5 只大鼠取出眼球放入 40g/L 多聚甲醛中固定,用于免疫组织化学染色。另用进行视网膜组织总 RNA 的提取,

表1 引物序列

| 基因名称 | 序列 | 解链温度(°C) | 碱基长度(bp) |
|----------|-------------------------------|----------|----------|
| Gap-43-F | 5'-AACCAAAATTCAGGCTAGCTTCC-3' | 62.02 | 148 |
| Gap-43-R | 5'-TCTCCCTCCTTCTTCTCCACAC-3' | 62.05 | 148 |
| Gapdh-F | 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3' | 64.421 | 143 |
| Gapdh-R | 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3' | 62.807 | 143 |

图1 GAP-43在SD大鼠视网膜上的表达(DAB×200) A:P0;B:P3;C:P7;D:P14;E:P21;F:P28;G:P60。

逆转录(RT),实时定量聚合酶链反应,两步法PCR扩增条件:95°C预变性10s;扩增95°C 5s,40个循环;退火延伸60°C 31s。再制作石蜡切片,二步法免疫组织化学染色。根据绘制各曲线图,分别以GAP-43与GAPDH mRNA水平的相对比值进行统计学分析。利用Image-pro Plus 6.0计算机图像分析软件测定GAP-43免疫反应的吸光度A值,每个时间点选取5张切片,每张切片选取5个区域进行测定。

统计学分析:采用SPSS 11.5统计软件进行分析,各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。各时间点之间采用单因素方差分析进行统计学分析,两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 GAP-43 mRNA的表达 GAP-43 mRNA表达量在生后有逐渐升高,在生后21d表达量最多,之后逐渐下降,到成年时维持在一个较低水平。各正常发育组GAP-43 mRNA的表达量进行单因素方差分析 $F = 56.48, P < 0.01$,各组表达量之间的差异有统计学意义。各组间任意两组进行两两比较,经LSD-t检验,各组间GAP-43 mRNA表达量的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 GAP-43蛋白的表达 P0(图1A)时,大鼠仅视网膜的神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)出现分化,其余的神经细胞排列成1层,细胞形态基本一致,称之为外成神经细胞层。内、外两层由不太明显的内丛状层(inner plexiform layer, IPL)分隔, GCL在出生时已基本形成, RGC分布疏散,大致排列成2~4层,而感光细胞的内外节尚未发育,内核层(inner nuclear layer, INL)、外核层(outer nuclear layer, ONL)尚未分出。此时GAP-43主要在GCL, NFL及不太明显的IPL表达,且染色较淡;P3(图1B)时,内成神经细胞层内的细胞开始分化成节细胞,外层成神经细胞层外侧与内侧的细胞出现形态上的差异, IPL变得明显。此时GAP-43主要在GCL, 视网膜NFL以及IPL表达,染色较P0为强;P7(图1C)时,外成神经细胞层内的细胞开始分化,出现INL和ONL。此时,二者间的分界线不很明显,开始出现外丛状层(outer plexiform layer, OPL)的初步结构,外层是由体积较小、圆形和椭圆形深染的细胞核组成;内层的细胞核染色稍淡,大小不一,排列较稀疏, GCL大致呈单层排列,较整齐。此时GAP-43主要在单层的GCL, 视网膜NFL, IPL和INL的部分细胞表达;P14(图1D)时GAP-43主要在单层的GCL, 视网膜NFL, IPL和INL的部分细胞表达,染色较P7时深;P21(图1E)时的大

鼠视网膜光镜所见结构与正常成年鼠基本一致。此时除了视网膜 ONL 外均可看到 GAP-43 染色阳性细胞,而且表达量达到最高;P28(图 1F)时可以看到 GAP-43 主要在单层的 GCL,视网膜 NFL, IPL 和 INL 的部分细胞,染色较淡;P60(图 1G)时大鼠 GAP-43 的表达主要集中在 IPL。阴性对照组 GAP-43 未见阳性表达。对 GAP-43 的各个时间点的 A 值进行单因素方差分析 $F = 67.42, P < 0.01$, 认为各组表达量之间的差异有统计学意义。各组间任意两组进行两两比较,经 LSD-*t* 检验,各组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

哺乳动物、两栖动物及鱼类的 RGCs 都能表达 GAP-43。杨新光等^[2]研究发现,在正常兔眼视网膜内丛状层中存在 GAP-43 的表达。GAP-43 首先在 RGCs 合成,然后迅速转运到未成熟的轴突末梢,成熟的突触联系建成后, GAP-43 的水平迅速下降。RGC 轴突生长在视交叉有延滞现象,体外培养 GAP-43 缺如的视网膜神经元细胞,其轴突及生长锥与正常小鼠无明显差异,认为 GAP-43 对轴突及生长锥本身的形成并非必需,而可能对轴突的导向性生长信号起放大作用。基因敲除小鼠(靶破坏 GAP-43 外显子 I)的视觉系统发育时,其视神经节细胞轴突迷失于视交叉,不能与靶组织建立正常的投射关系,从而认为 GAP-43 在轴突导向性生长及空间塑型中可能起关键作用,其详细机制还有待深入研究。

大鼠在持续黑暗的环境中生存 10d 后,其外层有再生潜能的光感受器细胞中的 GAP-43 表达处于较高水平,而一旦给予强光刺激, GAP-43 在 IPL 的表达达到最高。表明 GAP-43 可能参与光损伤视网膜的修复与再生^[3]。Ju 等^[4]发现,在正常视网膜, GAP-43 免疫反应活性主要局限于 IPL,短暂升高眼压诱导的缺血再灌注损伤的大鼠视网膜, GAP-43 的免疫活性出现在 RGCs,免疫印迹定量测

定证实损伤后 3dGAP-43 的表达达高峰(190%),7d 后轻微下降,认为一些 RGC 通过 GAP-43 上调有再生的潜能,崔志利等^[5]发现,视神经夹伤能上调视网膜上 GAP-43 mRNA 表达。目前的一些研究表明, GAP-43 可以促进发育中视网膜轴突向上丘的定向投射和立体视觉的形成,可以提高受损神经元的存活,抑制轴突变性、刺激轴突出芽、生长延伸,抵制生长锥的回缩、促进神经递质合成。我们的研究显示, GAP-43 mRNA 表达量在生后逐渐升高, P21 表达量最多,之后逐渐下降,到成年时维持在一个较低水平,并与视网膜切片 GAP-43 免疫组织化学染色测定结果相一致。

视网膜的发育是一个在机体内调控机制的作用下有序的发育和分化过程, GAP-43 在视网膜、神经纤维的生长、发育、轴突再生以及突触功能的维持等方面起着重要作用,并参与神经递质释放的调节,但对其作用机制、表达调控机制以及与其相关的信号传导还需进一步研究。

参考文献

- 1 Mason MR, Campbell G, Caroni P, *et al.* Overexpression of GAP-43 in thalamic projection neurons of transgenic mice does not enable them to regenerate axons though peripheral nerve grafts. *Exp Neurol* 2000; 165 (1):143
- 2 杨新光,王颖维,金文亮,等.慢性高血压兔模型视网膜中生长相关蛋白-43 表达的变化. *国际眼科杂志* 2008;8 (1):50-52
- 3 Lopez-Costa JJ, Goldstein J, Mangeaud M, *et al.* Expression of GAP-43 in the retina of rats following protracted illumination. *Brain Res* 2001; 900: 332-336
- 4 Ju WK, Gwon JS, Park SJ, *et al.* Growth-associated protein 43 is up-regulated in the ganglion cells of the ischemic rat retina. *Neuroreport* 2002;13:861-865
- 5 崔志利,康军,王琳,等.神经营养因子影响视神经夹伤后视网膜 GAP-43mRNA 表达变化. *国际眼科杂志* 2005;5(5):902-906