

NgR-Rock 信号通路在高糖损伤 RGC 中的作用

韩玉芝, 刘学政, 左中夫

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 31140072); 辽宁省科技厅计划项目 (No. 2011225015)

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院解剖学教研室

作者简介: 韩玉芝, 在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病眼底并发症的发病机制及治疗。

通讯作者: 刘学政, 医学博士, 解剖学教授, 博士研究生导师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变的发病机制和防治. liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期: 2013-11-04

修回日期: 2013-12-26

Effects of NgR-Rock signaling pathway for impaired retinal ganglion cells cultured with high glucose concentration

Yu-Zhi Han, Xue-Zheng Liu, Zhong-Fu Zuo

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 31140072); Department of Science and Technology of Liaoning Province, China (No. 2011225015)

Department of Human Anatomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

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

Received: 2013-11-04

Accepted: 2013-12-26

Abstract

• AIM: To investigate the role of NgR-Rock signaling pathway in the retinal ganglion cells (RGCs) which are damaged by high concentration of glucose.

• METHODS: Studies were performed with control group, high glucose concentration (HGC) group, SiNgR group (HGC medium including AAV2-SiNgR virus) and SiRNA control group (HGC medium including the negative sequence of nucleotides). Three days after culture, RGCs was observed by microscope, expressions of NgR, Rock and F-actin were detected by Western blot, cell vitality was determined by MTT, and cell morphology was also detected by F-actin immunohistochemical staining.

• RESULTS: Compared with control group, in HGC and control SiRNA groups, cell volume decreased with less processes, light refraction was strengthened, and the expressions of Rock and NgR were significantly increased ($P < 0.05$, respectively), while the expression of F-actin was reduced ($P < 0.05$); Compared with control group, there was no obvious difference in the expression of NgR, Rock and F-actin, and cell vitality between SiNgR group and control group ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: The activation of NgR-Rock signaling

pathway may plays an important role in HGC impairing RGCs.

• KEYWORDS: retinal ganglion cell; NgR; Rock; F-actin; cell vitality

Citation: Han YZ, Liu XZ, Zuo ZF. Effects of NgR-Rock signaling pathway for impaired retinal ganglion cells cultured with high glucose concentration. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14(2):207-209

摘要

目的: 探讨 NgR-Rock 信号通路在高浓度葡萄糖损伤视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 中的机制。

方法: 实验分 4 组: 对照组、高糖组、SiNgR 组 (高糖培养基中加入 AAV2-siNgR 病毒) 和 SiRNA 空白组 (高糖培养基中加入阴性核苷酸序列)。在培养的第 3d 观察细胞生长状态; Western blot 检测 NgR、Rock 及 F-actin 的表达; MTT 法检测细胞活力; 利用 F-actin 免疫组织化学染色显示细胞形态。

结果: 与对照组相比, 高糖组及 SiRNA 空白组细胞体积缩小, 突起较少, 细胞折光性增强; NgR 及 Rock 的表达明显上调, F-actin 表达减少, 细胞活力下降 ($P < 0.05$); 而 SiNgR 组与对照组相比 NgR、Rock 及 F-actin 的表达, 细胞活力无明显改变 ($P > 0.05$)。

结论: NgR-Rock 信号通路激活可能是导致高糖环境中 RGC 损伤的重要机制之一。

关键词: 视网膜神经节细胞; NgR; Rock; F-actin; 细胞活力

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.02.03

引用: 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

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见的并发症之一, 现已成为成年人致盲的主要原因。视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 是投射轴突并形成视神经的唯一神经元^[1]。RGCs 损伤后再生困难是 DR 患者视力损害不完全可逆的主要因素^[2]。Nogo 是一个与中枢髓磷脂结合的特异性的抑制因子, 与其受体 (Nogo Receptor, NgR) 结合可抑制生长锥的延长。本课题组已有的研究表明, DR 状态下 NgR 表达上调, 同时伴有 RGC 凋亡增加, 提示 RGC 凋亡与 NgR 激活有关, 但其作用机制尚不确定^[3]。本实验通过 SiNgR 抑制 RGC 的 NgR 表达, 探讨了 NgR-Rock 信号通路在 RGC 凋亡过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 RGCs 细胞 (上海瑞鹿生物科技有限公司), 细胞培养箱 (Healforce 公司), 超净操作台 (Healforce 公司),

DMEM 高糖培养液、胎牛血清、2.5g/L 胰蛋白酶(均购自 Hyclone 生物科技有限公司),多聚赖氨酸(Sciencell 公司),AAV2-SiNgR(上海吉玛制药技术有限公司),NgR、Rock 及 F-actin 抗体(Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RGCs 细胞传代培养及分组处理 将 RGCs 细胞置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度孵箱中,以基础培养基(DMEM+10% FBS)培养,48h 后按照 1:3 进行传代培养。于相差显微镜下将细胞悬液计数 1×10⁶/L 密度接种于培养瓶中。给予不同处理因素,分为对照组、高糖组、SiNgR 组、SiRNA 空白组(表 1)于培养的第 3d 检测有关指标。

1.2.2 观察细胞生长状态并用 MTT 法检测细胞活力 调整 RGCs 细胞悬液为 1×10⁴/200μL,置于 96 孔板,每组添加 3 个复孔,24h 后按分组要求处理,在培养第 3d 倒置显微镜观察细胞生长状态,分别换成相应的 100μL 无血清培养基,培养 3h 后加入 MTT 溶液 20μL(5mg/mL)3h 后弃溶液,加二甲亚砜并充分振荡至结晶物溶解。用酶联免疫检测仪检测 490nm 波长各孔光吸收值(A 值),按公式计算细胞活力(细胞活力=实验组 A 值/正常组 A 值×100%)。

1.2.3 Western blot 检测 NgR、Rock 及 F-actin 的表达 收集细胞置于 EP 管内,超声裂解细胞后离心 2min。用考马斯亮蓝方法测定上清液蛋白浓度,均调至等浓度上样(上样前需 100℃ 水浴 2min),电泳转移到硝酸纤维,用封闭液(1×TBST,5% 脱脂奶粉)37℃ 封闭 90min,分别加入一抗 NgR、Rock 及 F-actin,4℃ 孵育过夜。TBST 洗 3 次,分别用辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 1h,充分漂洗 15min,用 Electro-Chemi-Luminescence(ECL)试剂盒显影,观察结果。

1.2.4 F-actin 免疫组织化学染色显示细胞形态 6 孔培养板中放入用多聚赖氨酸(0.01%)包被的无菌盖玻片,接种 RGCs 细胞悬液于盖玻片上,细胞贴壁之后分组处理,第 3d 弃培养基,用 4% 多聚甲醛固定后,依次以 3% H₂O₂ 灭活、3% BSA 封闭 30min,加 F-actin 抗体(1:100)4℃ 孵育过夜,加二抗 37℃ 30min 后,用 DAB 显色 3min 后,流水冲 0.5h,酒精梯度脱水、二甲苯透明,甘油封片,显微镜观察并照相。

统计学分析:利用 SPSS 18.0 软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察细胞生长状态 与对照组(图 1A)相比,高糖组及 SiRNA 空白组细胞密度降低,体积缩小,折光性增强,细胞突起数目少,突起萎缩变短(图 1B,C)。SiRNA 组(图 1D)细胞生长状态与对照组无明显差别。

2.2 MTT 法检测细胞活力 MTT 检测法显示,与对照组相比高糖组和 SiRNA 空白组细胞活力明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 SiNgR 组与对照组细胞活力差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

2.3 Western blot 检测 NgR、Rock、F-actin 的表达

Western blot 检测结果显示,以 β-actin 为内对照,与对照组相比,高糖组和 SiRNA 空白组 NgR 及 Rock 蛋白的表达明显上调,F-actin 表达显著减少,SiNgR 组 NgR、Rock 及 F-actin 的表达与对照组相比无明显变化(图 2)。

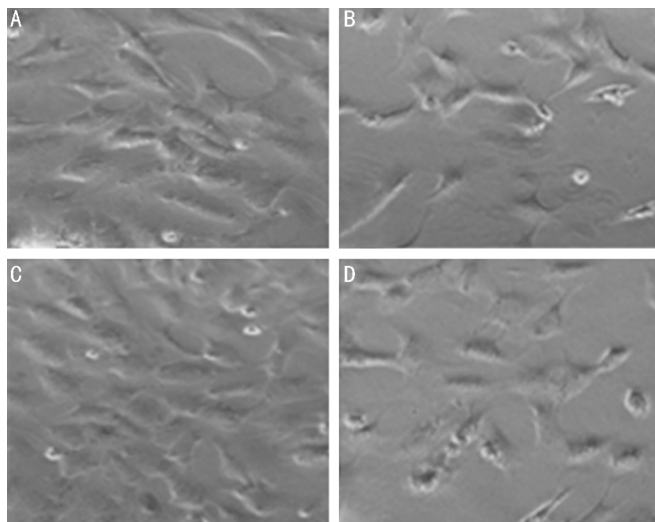


图 1 培养第 3d 时各组细胞形态(×200) A:对照组;B:高糖组;C:SiNgR 组;D:SiRNA 空白组。

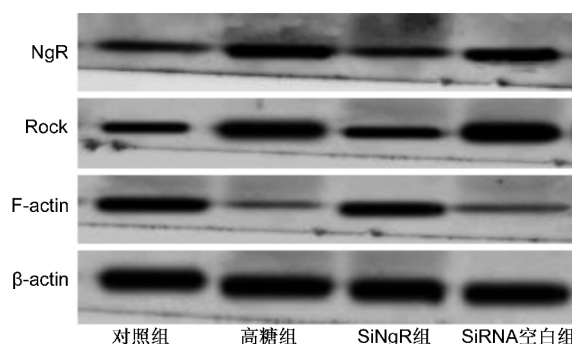


图 2 Western blot 检测各组细胞 NgR、Rock、F-actin 的表达。

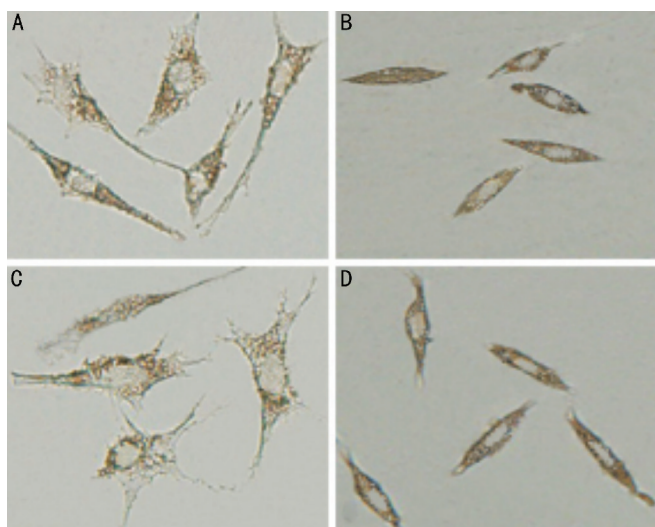


图 3 F-actin 免疫组织化学染色显示细胞形态(×400) A:对照组;B:高糖组;C:SiNgR 组;D:SiRNA 空白组。

表 1 实验分组及各组细胞活力比较

组别	处理因素	细胞活力($\bar{x} \pm s, \%$)
对照组	病毒稀释液	100.00±0.00
高糖组	葡萄糖 15mmol/L+病毒稀释液	52.32±3.57
SiNgR 组	葡萄糖 15mmol/L+AAV2-siNgR	85.71±7.61
SiRNA 空白组	葡萄糖 15mmol/L+ LV 阴性对照	50.69±4.84

2.4 F-actin 免疫组织化学染色显示细胞形态 与对照组(图 3A)相比,高糖组及 SiRNA 空白组细胞体积缩小,可见突起萎缩、变形,细胞突起较少,突起短小(图 3B,C)。SiRNA 组(图 3D)细胞形态与对照组相比无明显差别。

3 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病最常见的并发症之一,严格控制血糖并进行综合治疗也不能完全阻止糖尿病视网膜病变发生。糖尿病视网膜病变患者可出现多种视网膜神经病变的表现,如视网膜电图电位异常、视网膜神经节细胞层厚度降低及视觉功能异常等。

RGCs 是视网膜中唯一能把视觉信息传递到视觉中枢的传出神经元,也是唯一可以投射轴突并形成视神经的神经元^[4]。RGCs 损伤后再生困难是糖尿病视网膜病变患者视力损害不完全可逆的主要因素^[2]。有研究表明,糖尿病患者和糖尿病小鼠早期均出现了 RGC 凋亡及节细胞层变薄等病理改变^[5]。组织学方法也证实糖尿病视网膜病变患者的神经细胞层的厚度明显削减,RGCs 细胞数量减少,揭示 RGCs 在糖尿病状态下出现死亡^[6]。本实验发现,高糖环境下,RGC 细胞活力降低,折光性增强,细胞突起萎缩变形,细胞突起较少,生长缓慢。结果提示,高浓度葡萄糖是 RGC 受损的重要原因之一,但其具体机制尚不清楚。

NgR 是一种特异性的抑制因子,在视网膜中,NgR 主要表达于 RGCs。在成年哺乳动物的中枢神经系统中,NgR 的功能主要是防止神经在不必要的区域出芽从而保持中枢神经系统稳定性,这种作用阻止了成年哺乳动物损伤中枢神经元的轴突再生。研究显示,抑制脑梗死大鼠 NgR 表达,病灶区域的轴突延长,有新的突触联系形成,相应区域神经系统的功能有一定程度的改善。高糖刺激下出现神经退行性变,导致轴突溃变,释放出大量的髓磷脂相关生长抑制蛋白,能特异性的激活 NgR,启动信号级联,通过 Rock 促使肌动蛋白解聚,改变神经突起的形态和稳定性,导致突起萎缩、变形^[7]。NgR-Rock 信号通路激活是神经损伤后抑制神经修复和再生的重要因素之一^[8]。在大鼠慢性高眼压模型中,抑制 NgR 表达有利于受损伤的视神经再生^[9]。研究发现敲除鼠的 NgR 基因,视神经损伤后其神经节细胞可以再生^[10]。本实验采用 SiRNA 抑制 RGC 的 NgR 表达,结果显示 Rock 的表达也出现相应减少,可见明显的细胞突起,细胞突起生长较快,大部分细胞存活,少量细胞死亡,存活的细胞活力良好。结果表明,

NgR 表达上调是葡萄糖损伤 RGC 的重要分子机制之一。抑制高糖环境中 RGC 的 NgR 表达,有利于受损伤的 RGC 修复。

综上所述,高糖可增加 NgR 在 RGC 内的表达,启动 NgR-Rock 信号通路,导致细胞突起塌陷,抑制突起延长,细胞活力降低。而抑制 NgR 表达,可阻断 NgR-Rock 信号通路,有利于受损伤的 RGC 修复。

参考文献

- 1 Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, *et al.* Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci* 2013;14 (2): 2559-2572
- 2 Guo ML, Xue B, Jin DZ, *et al.* Dynamic downregulation of Nogo receptor expression in the rat forebrain by amphetamine. *Neurochem Int* 2013;63 (3):195-200
- 3 左中夫,刘万鹏,刘学政. Nogo 受体在早期糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡中的作用. *国际眼科杂志* 2013;13(7):1318-1319
- 4 Wang YX, Gu JX, Feng XM, *et al.* Effects of Nogo - A receptor antagonist on the regulation of the Wnt signaling pathway and neural cell proliferation in newborn rats with hypoxic ischemic encephalopathy. *Mol Med Rep* 2013;8(3):883-886
- 5 吴兰香,孙长凯,范明. Nogo 与 Nogo 受体研究. *生物化学与生物物理进展* 2002;29(6):834-836
- 6 邓辉,金明,潘琳,等. 红参对糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞生长因子表达及神经节细胞凋亡的影响. *中日友好医院学报* 2010;24 (2):94-96
- 7 Gonzenbach RR, Schwab ME. Disinhibition of neurite growth to repair the injured adult CNS focusing on Nogo. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(1): 161-176
- 8 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
- 9 Yin X, Chen C, Yuan R, *et al.* An immunofluorescence - histochemistry study of the Nogo receptor in the rat retina during postnatal development. *Ann Ophthalmol (Skokie)* 2007;39 (2):140-144
- 10 Su Y, Wang F, Teng Y, *et al.* Axonal regeneration of optic nerve after crush in Nogo66 receptor knockout mice. *Neurosci Lett* 2009;460 (3): 223-226