

基础研究

脂联素及其受体在正常和 I 型糖尿病小鼠视网膜中的表达

蔺涛,何峰,雷博

重庆医科大学附属第一医院眼科//重庆市眼科学重点实验室,重庆 400016

摘要:目的 研究脂联素(APN)及其受体(AdipoRs)在正常和 I 型糖尿病(T1DM)小鼠视网膜中的表达。方法 C57BL/6 小鼠随机分为对照组和实验组,通过链脲佐菌素腹腔注射,建立 T1DM 小鼠模型。建模 2 月后,分离出对照组和实验组小鼠的视网膜、脉络膜,分别提取总蛋白和总 RNA。采用 BCA 法和 ELISA 检测视网膜、脉络膜中总蛋白和 APN 浓度;采用 qPCR 检测视网膜和脉络膜中 APN 受体 mRNA 表达水平;采用 Western blotting 检测视网膜中 AdipoRs 的表达情况。结果 APN 及其受体在小鼠视网膜、脉络膜中呈现阳性表达;与对照组相比,APN、AdipoR1 在实验组小鼠视网膜中表达量上升,AdipoR2 表达量无明显变化。结论 APN、AdipoR1 可能在 I 型糖尿病视网膜病变病理过程中起重要作用。

关键词:糖尿病视网膜病变;糖尿病;脂联素;脂联素受体;视网膜

中图分类号:R329.26;R587.1 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)11-1543-05

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.11.003

Expressions of adiponectin and its receptors in the retina of normal and type 1 diabetic mice

LIN Tao, HE Feng, LEI Bo

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the expression of adiponectin and its receptors (AdipoRs) in the retina of normal mice and mice with type 1 diabetes mellitus (T1DM). **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control group and streptozotocin-induced T1DM group. Two months after the modeling, the total protein and adiponectin protein expression in the retina and choroid were measured using BCA method and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. Quantitative RT-PCR was performed to detect the mRNA expressions of AdipoRs in the retina and choroid, and Western blotting was employed to examine the protein expressions of AdipoRs in the retina. **Results** Adiponectin and AdipoRs proteins were expressed in the retina and choroid in normal mice. The expressions of adiponectin and AdipoR1 were up-regulated in the retina of mice with T1DM while AdipoR2 expression exhibited no significant changes. **Conclusion** Adiponectin and AdipoR1 may play an important role in the evolvement of type 1 diabetic retinopathy.

Key words: diabetic retinopathy; diabetes mellitus; adiponectin; adiponectin receptors; retina

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病(DM)患者最常见的并发症之一,也是目前世界范围内导致成年人失明的主要原因之一^[1]。DR的主要病理特征为视网膜新生血管形成和血眼屏障的破坏。新生血管形成和炎症可能是DR的主要发病机制^[2-4]。脂联素(APN)是近年来发现的由脂肪细胞合成并分泌的一种新的特异性蛋白,具有抗炎、抗动脉粥样硬化和胰岛素增敏效应。因此 APN 可能成为治疗 DM 及其并发症的一个重要的手段。APN 主要通过两种特异性受体发挥生物学效应,即 AdipoR1 和 AdipoR2。AdipoRs 都是 7 次跨膜受体,但是功能和结构区别于 G 蛋白偶联受体^[5]。T-钙粘蛋白

是近年来发现的第 3 种脂联素受体,但是其无三级结构,无 AdipoR1、AdipoR2 具有的跨膜区及细胞内结构,因此 T-钙粘蛋白可能不是 APN 功能受体,而只是一种 APN 链接蛋白^[6]。

对于 APN 及其受体与 DR 的关系,目前的研究还不够深入,而且得出的结论相互矛盾。有报道称 APN 表达水平升高可以延缓 DR 的病理发展过程,可以抑制视网膜新生血管的形成^[7]。血中 APN 浓度与 DR 发生的风险性呈负相关^[8]。也有人认为血中 APN 浓度与 DR 病情发展的严重程度呈正相关^[9]。本实验旨在对正常和 I 型糖尿病(T1DM)小鼠模型视网膜中的 APN 及其受体表达进行验证分析,以进一步探讨 APN 及其受体与 DR 的关系。

收稿日期:2012-07-19

基金项目:国家自然科学基金(30973251)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30973251).

作者简介:蔺涛,在读硕士研究生,E-mail: belyxiong_2010@163.com

通讯作者:雷博,教授,硕士生导师,E-mail: Kenny3372@sina.cn

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

1.1.1 主要试剂 链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma;

RNA 萃取试剂RNAiso Plus及cDNA逆转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);AdpoR1抗体sc-00183、AdpoR2抗体sc-46751、血管抗体NeuN和视网膜神经节细胞(RGCs)抗体Brn3a购自美国Santa cruz;驴抗小鼠、驴抗兔二抗购自美国Jackson;qRT-PCR试剂盒购自复能基因公司(Gene Copoeia);ELISA试剂盒(Mouse Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit)购自美国R&D;细胞裂解液WB-0061购自北京鼎国公司;牛抗兔、牛抗山羊 β -actin、BCA蛋白浓度测定试剂盒P0010S、ECL显影剂购自碧云天生物。

1.1.2 AdpoR1、AdpoR2引物 由复能基因公司(Gene Copoeia)设计和提供。AdpoR1引物复能对应编号:MQp042945;AdpoR2引物复能对应编号:M Qp035557;内参GAPDH PCR上游扩增引物:5'-ATGG TGAAGGTCGGTGTG AAC-3',下游引物:5'-TTACT CCTTGGAGGCCATGTAG-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立 选取6~8周龄C57BL/6小鼠40只,雄性,体质量20 g左右,随机分为实验组和对照组,20只/组。实验组通过连续3 d腹腔注射STZ(60 mg/kg),建立T1DM小鼠模型。对照组注射柠檬酸缓冲液。注射1周、1月和2月后分别测量小鼠尾静脉血糖值。血糖值大于13.9 mmol/L即表示造模成功^[10-11]。

1.2.2 免疫荧光染色

1.2.2.1 视网膜血管染色 造模成功2月后,取出小鼠眼球,用4%多聚甲醛溶液固定2 h,显微镜下完整分离出视网膜。以视乳头为中心点大概在2,4,6,8,10,12点钟位剪开视网膜,平铺于防脱玻片上,血清封闭后加入一抗NeuN 4℃孵育过夜,用PBS洗片后加相应的二抗染色、封片,然后荧光显微镜下观察。

1.2.2.2 视网膜神经节细胞染色 取出小鼠眼球,多聚甲醛固定后用OCT包埋,切冰冻切片,血清封闭后加入一抗Brn3a以及相应的二抗,洗片、复染、封片后即可观察。

1.2.3 qRT-PCR检测

1.2.3.1 RNA提取 取出小鼠眼球,完整分离出视网膜和脉络膜,将组织分别在液氮中研磨成粉末,向研钵中加入1 ml的RNAiso Plus后匀浆,然后按照说明书提取总RNA,测D(λ)值及浓度, D_{260}/D_{280} 均在1.8~2.0之间。

1.2.3.2 qRT-PCR检测 采用TaKaRa逆转录试剂盒按操作说明逆转录为cDNA,将产物进行qRT-PCR。反应条件为:95℃ 15 min;95℃ 10 s;60℃ 20 s;72℃ 15 s;40个循环。同时扩增GAPDH作为内参对照。

1.2.4 ELISA试剂盒检测 取出小鼠眼球,分离出视网膜和脉络膜,分别按每20 mg组织加入200 μ l的比例加入裂解液。超声匀浆器匀浆1 min或直至完全裂解;14 000 g离心5 min后取上清储存备用。取上述组织匀

浆后的上清液,室温下解冻。按照说明书用BCA法检测总蛋白浓度,用ELISA试剂盒检测APN浓度。

1.2.5 Western blotting检测 方法同上获得视网膜总蛋白样品。采用BCA法测定总蛋白浓度后,经SDS-PAGE凝胶电泳分离、常规湿法转膜,用5%脱脂奶粉封闭1.5 h,一抗4℃孵育过夜(AdpoR1、AdpoR2浓度为1:500,牛抗兔、牛抗山羊 β -actin浓度为1:1000),HRP标记的二抗(1:3000)37℃孵育2 h,洗涤后ECL化学发光,显色,照相,采用Quantity One软件分析条带的灰度值。

1.3 统计学分析

应用SPSS17.0统计分析,实验数据以均数 \pm 标准差表示,使用独立样本 t 检验或者方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖值及免疫荧光结果

与对照组相比,实验组小鼠血糖值显著升高($P<0.05$,表1)。免疫荧光结果显示:实验组小鼠视网膜血管迂曲、纤细(图1A),对照组小鼠视网膜血管粗大、呈树枝状分布(图1B);实验组小鼠视网膜中视网膜神经节细胞数量与对照组相比明显减少(5.16 ± 0.47 vs 10.3 ± 0.42 , $P<0.05$,图2)。

表1 注射链脲佐菌素后1周、1月和2月后实验组、对照组小鼠血糖值

Tab.1 Blood glucose levels in different groups at 1 week,1 month and 2 months (Mean \pm SD, mmol/L)

组别	1周	1月	2月
实验组	16.4 \pm 1.39*	24.9 \pm 1.71*	29.7 \pm 2.00*
对照组	6.48 \pm 0.93	6.41 \pm 1.12	6.90 \pm 1.18

与对照组相比,* $P<0.05$

2.2 ELISA结果

APN在对照组(正常)小鼠脉络膜和视网膜中的含量分别为(3.62 ± 0.72) ng/mg和(0.19 ± 0.01) ng/mg;而APN在实验组小鼠脉络膜和视网膜中含量分别为(0.74 ± 0.02) ng/mg和(4.15 ± 0.39) ng/mg。

结果显示在对照组(正常)小鼠视网膜、脉络膜中都有APN表达,且APN在视网膜中的表达量较低($P<0.05$);与对照组小鼠相比,实验组小鼠视网膜中APN的表达量增高($P<0.05$)。

2.3 qRT-PCR结果

AdipoRs mRNA在小鼠脉络膜、视网膜都有表达,而在视网膜上的表达量很低(图3);实验组小鼠视网膜中AdipoR1 mRNA表达水平比对照组小鼠要高($P<0.05$),AdipoR2表达量变化不明显($P>0.05$)。

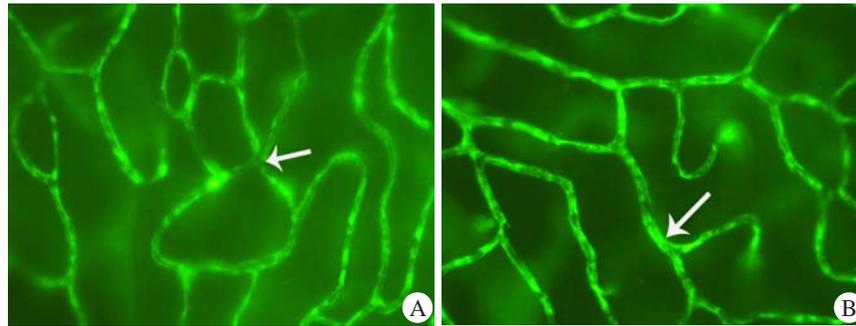


图 1 实验组(A)与对照组(B)小鼠视网膜血管形态

Fig.1 Morphology of the retinal vessels in the two groups (Immunofluorescence staining, original magnification: ×400)

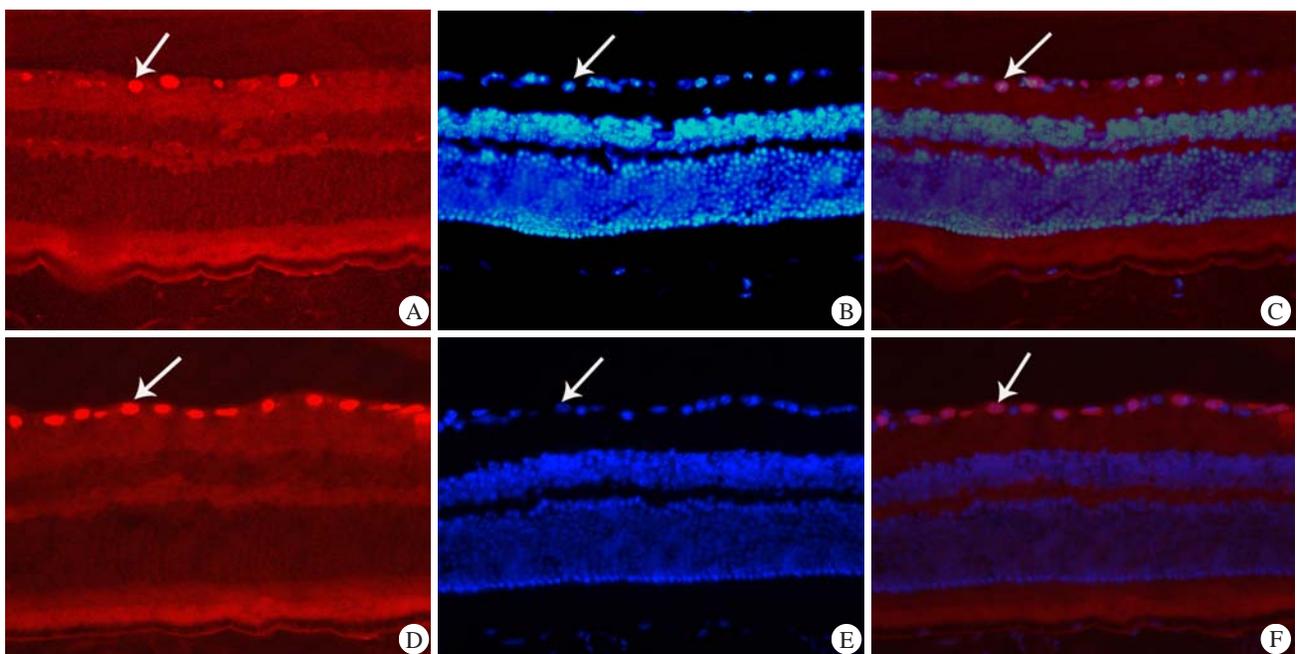


图 2 小鼠眼球横切片上视网膜神经节细胞(RGCs)染色和计数

A、D分别为Brn3a对RGCs的染色;B、E为DAPI对所有细胞的染色;C、F为两者细胞的合并图;A~C为实验组;D~F为对照组.箭头所示为神经节细胞

Fig.2 Retinal ganglion cells labeled in the radial sections in the two groups (Immunofluorescence staining, original magnification: ×400).

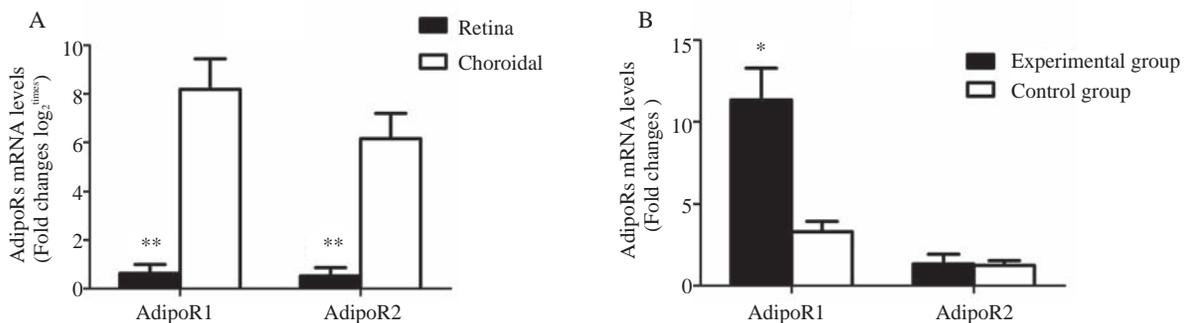


图 3 AdipoRs的qRT-PCR结果

A:AdipoR1、AdipoR2在正常小鼠视网膜、脉络膜表达;B:AdipoR1、AdipoR2在实验组、对照组小鼠视网膜中的表达情况;与脉络膜相比, ** $P < 0.0001$;与对照组相比, * $P < 0.05$.

Fig.3 qRT-PCR results of AdipoRs expressions in different groups.

2.4 Western blotting 结果

Western blotting 结果(图4)表明, AdipoR1 在实验组小鼠视网膜中的表达量高于对照组(0.90 ± 0.02 vs 0.39 ± 0.15 , $P < 0.05$); AdipoR2 在实验组小鼠和对照组小鼠视网膜中的表达量无明显变化(0.37 ± 0.05 vs 0.42 ± 0.07 , $P > 0.05$)。

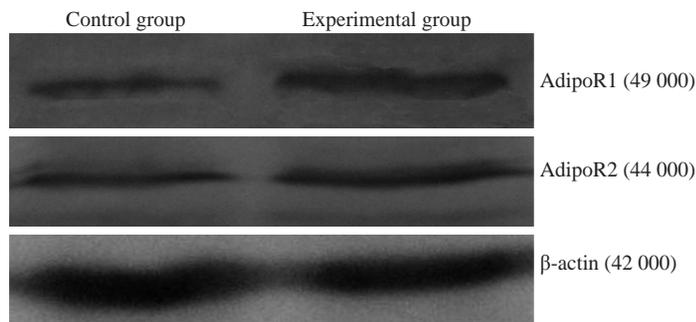


图4 AdipoRs的Western blotting 结果

Fig.4 Western blotting for AdipoRs expressions in the retina of different groups.

3 讨论

APN 作为一种特异性脂蛋白在人体全身组织分布广泛,有报道称人房水中也含有少量 APN,约占血中浓度的 1/1000^[12-13]。类似的研究还发现 APN 在脑脊液中的浓度大约只占血中浓度的 1/1000^[14]。本实验中我们检测到 APN 在正常小鼠视网膜中有少量分布,约占脉络膜中浓度的 1/19; APN 受体在小鼠脉络膜、视网膜中也呈阳性表达,而且受体 mRNA 表达量在两种组织中的差异性更为明显。与血脑屏障一样,血眼屏障可能在维持眼内外 APN 浓度稳态上起到了重要作用。血眼屏障包括血-房水屏障和血-视网膜屏障(BRB), BRB 主要由视网膜色素上皮细胞和视网膜血管内皮细胞间的紧密连接构成。研究发现,相对分子质量大于 30 000 的小分子不能通过外屏障,相对分子质量 3000 的亲水性右旋糖苷不能通过内屏障^[15]。APN 的相对分子质量为 30 000,在体内以三聚体、六聚体和多聚体形式存在。3 种亚型的相对分子质量分别为 67 000、136 000 及 > 300 000^[16]。脉络膜位于血眼屏障外,含有丰富的血管。因此我们选取脉络膜作为参照,其中 APN 浓度变化反映了血中 APN 浓度变化。APN 是由脂肪细胞合成并分泌的,房水、视网膜中含有少量的 APN,视网膜中也表达了一定量的 APN 受体,这提示血眼屏障可能存在某种转运机制使 APN 进入眼内,从而与受体结合发挥多种生物学效应。有报道称 APN 可能和瘦素一样由受体介导的转运机制进入脑脊液中^[6]。而瘦素是另一种脂肪细胞因子,与血管发生及内皮细胞增生密切相关,其主要由瘦素短型受体介导的转运机制通过

血脑屏障^[17]。因此我们推测眼内的 APN 受体除了参与 APN 各种生物学效应之外,可能在 APN 的转运机制中起重要作用,但是其具体机制目前还不清楚。

APN 与 DR 关系密切,它可以抑制炎症和新生血管形成,增加血流量,减少内皮细胞凋亡,从而延缓 DR 的病理发展^[4-7]。有报道称在 T1DM 小鼠模型早期就有视网膜微血管和视网膜神经节细胞层的病理改变^[10]。本实验通过对实验组与对照组小鼠血糖值测定、视网膜血管形态和 RGCs 数量变化的观察,发现实验组小鼠血糖远超过阈值;与对照组小鼠相比,实验组小鼠视网膜血管迂曲纤细、RGCs 明显减少。此结果与相关报道是一致的,说明实验组糖尿病小鼠视网膜发生了血管和 RGCs 病变。糖尿病小鼠视网膜中 APN 浓度升高,其原因可能有两点:一是 BRB 遭到破坏而通透性增加。早期 DR 的一个重要的病理特征就是 BRB 通透性增加并随着病情进展恶化^[18]。本实验中我们已观察到糖尿病小鼠发生的血管、RGCs 病变,因此糖尿病小鼠视网膜中 APN 浓度增加可能是由于 BRB 的破坏导致的。二是 APN 为了发挥抗炎、抗新生血管形成和血管内皮损伤修复出现代偿性增加^[2-5]。APN 是通过与其受体结合而发挥各种生物学效应的。在细胞内信号传导中 AdipoR1 与 AMPK 紧密联系,而 AdipoR2 则与 PPAR α 相关^[14]。在缺血缺氧环境中, AMPK 是参与血管发生、内皮损伤修复的信号通路的重要组成部分。APN 与 AdipoR1 结合,激活 AMPK 信号传导通路,可促进血管内皮修复,发挥血管保护作用^[19]。在本实验中我们还发现糖尿病小鼠视网膜中 AdipoR2 表达量无明显变化,而 AdipoR1 表达量相应增加,因此使 APN 与其结合量增加从而发挥更强的抗 DR 的生物学效应。此外通过上述分析我们认为视网膜中 AdipoRs 可能参与了 APN 的转运,而在糖尿病小鼠中只有 AdipoR1 表达上升。这说明一方面 AdipoR1 可能在 APN 转运中起主要作用,另一方面 AdipoR1 表达量增加也可能导致其介导的 BRB 转运机制增强,使更多的 APN 进入视网膜。结合以上论述,我们认为 APN 可能通过 AdipoR1 在 DR 病理过程中起到重要作用。

综上所述,我们从蛋白及 mRNA 水平上首次确定了 APN 和 AdipoRs 在小鼠视网膜的表达情况,初步探讨了 T1DM 对 APN 及其受体表达的影响。研究发现 APN 和 AdipoRs 在小鼠视网膜中呈阳性表达,并且 APN 和 AdipoR1 在 T1DM 小鼠视网膜中表达增加,而 AdipoR2 无明显变化。因此我们认为 APN、AdipoR1 可能在 DR 的病理过程中起重要作用。这些发现对于深

入理解DR的发病机制、阐明APN的生物学效应有重要意义。

参考文献:

- [1] Robinson R, Barathi VA, Chaurasia SS, et al. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals[J]. *Dis Model Mech*, 2012, 5(4): 444-56.
- [2] Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease[J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 960-6.
- [3] Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy[J]. *Lancet*, 2010, 376(9735): 124-36.
- [4] Zhang W, Liu H, Al-Shabrawey M, et al. Inflammation and diabetic retinal microvascular complications[J]. *J Cardiovasc Dis Res*, 2011, 2(2): 96-103.
- [5] Li FY, Cheng KK, Lam KS, et al. Cross-talk between adipose tissue and vasculature: role of adiponectin[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 203(1): 167-80.
- [6] Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, et al. Adiponectin receptor signalling in the brain[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(2): 313-27.
- [7] Higuchi A, Ohashi K, Shibata R, et al. Thiazolidinediones reduce pathological neovascularization in ischemic retina via an adiponectin-dependent mechanism [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(1): 46-53.
- [8] Zietz B, Buechler C, Kobuch K, et al. Serum levels of adiponectin are associated with diabetic retinopathy and with adiponectin gene mutations in Caucasian patients with diabetes mellitus type 2 [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2008, 116(9): 532-6.
- [9] Kato K, Osawa H, Ochi M, et al. Serum total and high molecular weight adiponectin levels are correlated with the severity of diabetic retinopathy and nephropathy [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, 68(3): 442-9.
- [10] Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, et al. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model[J]. *Exp Diabetes Res*, 2011, 2011: 108328.
- [11] 袁芳,刘映红,田俊伟,等.脂联素对糖尿病大鼠的肾脏保护作用及其抗氧化机制探讨[J].*南方医科大学学报*, 2010, 30(3): 462-30.
- [12] Sharma RK, Rogojina AT, Chalam KV. Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor[J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 60-9.
- [13] Kos K, Harte AL, da Silva NF, et al. Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(3): 1129-36.
- [14] Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin receptor binding proteins-recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(20): 4280-6.
- [15] El Sanharawi M, Kowalczyk L, Touchard E, et al. Protein delivery for retinal diseases: from basic considerations to clinical applications[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(6): 443-65.
- [16] Waki H, Yamauchi T, Kamon J, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(41): 40352-63.
- [17] Hsueh H, Kastin AJ, Tu H, et al. Effects of cell-type specific leptin receptor mutation on leptin transport across the BBB [J]. *Peptides*, 2011, 32(7): 1392-9.
- [18] Xin H, Zhou F, Liu T, et al. Icaritin ameliorates streptozotocin-induced diabetic retinopathy *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(1): 866-78.
- [19] Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1304-9.

(编辑:黄开颜)

欢迎投稿《南方医科大学学报》

- ★本刊不收审稿费
- ★优质的国家级基金资助论文3月内发表
- ★优质的全英文论文3月内发表
- ★PubMed全文收录

只需登录网站注册后投稿:

www.j-smu.com