

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)06-0616-04

醛糖还原酶在小鼠视神经损伤后的表达及作用

白倩¹, 刘玲², 陈鹏², 于才勇², 姚安会², 孙丽娟¹, 雷润佳¹, 胡丹^{1*}, 王健^{2*}(第四军医大学: ¹西京医院眼科全军眼科研究所, ²神经生物学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 观察视神经中醛糖还原酶(AR)在小鼠视神经横断(ONT)损伤后的表达变化及其对视网膜神经节细胞存活和再生的影响。方法 采用 C57BL/6-AR^{+/+}(野生型)小鼠、C57BL/6-AR^{-/-}(AR 基因敲除)小鼠、Thy1-YFP/AR^{+/+}(AR^{+/+} YFP 小鼠)小鼠和 Thy1-YFP/AR^{-/-}小鼠(AR^{-/-} YFP 小鼠), 建立视神经横断模型。通过 Western blot 方法, 检测横断损伤后的视网膜中 AR 分子的表达变化; 利用视网膜组织冰冻切片计数观察比较 AR 基因敲除小鼠和野生型小鼠视神经横断损伤后存活的视网膜神经节细胞数目; 通过 Western blot 法, 观察比较神经生长相关蛋白 43(GAP-43)在 AR 基因敲除小鼠和野生型小鼠视神经横断后的表达变化。结果 Western blot 检测发现 AR 分子在野生型小鼠视神经横断后表达随时间延长逐渐升高。AR 敲除小鼠在视神经横断损伤后其存活的视网膜神经节细胞数目多于野生型小鼠。AR 敲除小鼠在视神经横断损伤后 GAP-43 的表达量高于野生型小鼠组($P < 0.05$)。结论 AR 参与了视神经横断损伤后的视网膜神经节细胞存活的调节, AR 缺失会促进视神经横断损伤后的再生修复。

[关键词] 醛糖还原酶; 视神经横断损伤; 视网膜神经节细胞

[中图分类号] R392.33, R774.6, R339.3*7 **[文献标志码]** A

醛糖还原酶(aldehyde reductase, AR)属于还原型辅酶 II(NADPH)依赖型醛-酮还原酶家族^[1]。人类 AR 基因定位于染色体 7q35, 负责编码由 315 个氨基酸组成的 AR 蛋白^[2]。AR 广泛分布于晶体、视网膜、肾脏、肾上腺和多种生殖器官, 是葡萄糖代谢多元醇通路中的重要限速酶。AR 以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(还原性辅酶 II, NADPH)为辅酶, 将葡萄糖转化为山梨醇, 然后在山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH)催化下, 与 NAD⁺ 共同作用将山梨醇转变为果糖^[3]。由于上述葡萄糖代谢多元醇通路仅在高血糖条件下被激活, 因此临床上对于 AR 的研究主要集中在糖尿病引起的高血糖相关疾病中。最近有研究发现在血糖正常的情况下, AR 参与了介导巨噬细胞氧化应激引起的炎症反应过程并发挥了重要作用^[4]。炎症细胞在细胞因子、生长因子、病原微生物以及炎症信号分子的刺激下, 通过促进细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 增加脂质过氧化并导致毒性的醛类衍生物的产生^[5]。AR 可以有效的将巨噬细胞中的脂质过氧化反应生成的醛类衍生物谷胱甘肽 4-羟基反式-2-壬烯酸(glutathione-4-hydroxy-trans-2-nonenal, GS-HNE)转化为无毒的谷胱甘肽 1, 4-二羟基壬烯酸(glutathionyl-1, 4-dihydroxynonenal, GS-DHN), 在炎症反应中通过激活

NF- κ B 信号通路, 促进巨噬细胞分泌促炎因子等^[6-7]。因此 AR 是调节巨噬细胞炎症反应的重要分子^[5]。

AR 在眼科方面的研究也十分广泛, 在氧诱导视网膜病变^[8]、眼内炎^[9]、白内障^[10]等方面都有深入的研究。许多眼科疾病均以视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)发生不可逆性凋亡引起。因此, 阻止或者延缓视网膜神经节细胞的凋亡成为预防和治疗眼科相关疾病的关键因素。我们前期研究发现, AR 敲除小鼠在脊髓损伤后运动功能恢复明显好于野生型小鼠, 并且损伤区面积明显小于对照组^[11]。视神经作为中枢神经系统的一部分, AR 是否在视神经损伤后存活和再生方面也具有一定的作用, 目前尚无文献报道。本实验旨在观察小鼠视神经横断损伤后 AR 的表达变化以及对视网膜神经节细胞存活及再生相关基因表达的影响, 为临床上治疗视神经损伤相关疾病提供新的理论基础和治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6-AR^{+/+}(野生型)小鼠购自上海 SLAC 公司, C57BL/6-AR^{-/-}(AR 基因缺陷小鼠)和 Thy1-YFP(神经特异性表达黄色荧光蛋白转基因小鼠, 简称 YFP 小鼠)小鼠

收稿日期: 2012-11-05; 接受日期: 2013-03-12

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划重点项目(2012JZ4002)

作者简介: 白倩(1987-), 女, 陕西渭南人, 硕士研究生

Tel: 029-84774500-801; E-mail: baiq1234@126.com

* Corresponding authors, 胡丹, E-mail: hoodan@fmmu.edu.cn; 王健, E-mail: jwangfm@fmmu.edu.cn

由香港大学 Sookja K Chung 教授惠赠。AR^{-/-}小鼠与 YFP 小鼠交配, 获得 AR^{-/-}-Thy1-YFP (AR^{-/-}-YFP) 小鼠。实验所用小鼠均为雄性, 6~8 周龄, 体质量 20~25 g。动物饲养在第四军医大学神经生物教研室 SPF 级动物房中。动物实验遵守“中国人民解放军第四军医大学实验动物管理条例”。所用主要试剂及仪器信息如下: OCT 包埋剂 (Sakura 公司), 小鼠抗-AR 单克隆抗体 (mAb) (Santa Cruz 公司) 和小鼠抗 GAP-43 mAb (Sigma 公司), HRP 标记的山羊抗小鼠的二抗 (Jackson Immuno Research 公司); Molecular Imager® (Invitrogen 公司), Chemi-Doc™ XRS 成像系统 (Bio-Rad 公司), BX53 荧光显微镜 (Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 野生型小鼠 40 只, 随机分为假手术组和视神经横断手术组各 20 只, 分别在术后 0、3、5、7 和 14 d 观察 AR 分子的表达情况; AR^{+/+} YFP 小鼠和 AR^{-/-} YFP 小鼠各 36 只, 分别在视神经横断术后 3、7 和 14 d 观察视网膜节细胞的存活状况; 野生型小鼠和 AR^{-/-} 小鼠各 20 只, 分别术后 0、3、5、7 和 14 d 检测再生相关分子的表达情况, 每个时间点均随机选取 4~6 只小鼠。

1.2.2 小鼠视神经横断损伤 (optic nerve transection, ONT) 模型的制备 小鼠用 10 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 剂量为 80 mg/kg。消毒皮肤后在显微镜下切开左侧眶上缘皮肤, 依次分离眶内容物, 剪断上直肌和外直肌, 分离暴露视神经眶内段, 纵向剪开视神经背侧鞘膜, 于鞘膜内距视神经根部 1.0 mm 处剪断视神经, 术中注意避免损伤位于腹侧鞘膜内的视网膜中央动脉。术后依次缝合切口并消毒^[12]。

1.2.3 Western Blot 检测 将新鲜取出的视网膜称重, 按 1 mL/100 mg 组织的比例加入 RIPA 裂解液, 分别使用 5 mL、2 mL 和 1 mL 无菌注射器在冰上充分吹打研磨组织, 静置 20 min; 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清后称量体积按 1:1 加入样品缓冲液, 沸水中煮 5 min, -20℃ 保存。蛋白样品进行 SDS-PAGE 垂直电泳后, 将蛋白半干转移到 PVDF 膜上, 常温下 50 g/L 脱脂奶粉 PBS 液封闭 1 h; 加入小鼠抗-AR mAb 和小鼠抗 GAP-43 mAb 后 4℃ 孵育过夜; TBST 摇床洗涤 4 次, 每次 10 min; 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体后室温孵育 1 h; TBST 摇床洗涤 4 次, 每次 10 min。经 Molecular Imager® 发光后, Chemi-Doc™ XRS 成像系统检测蛋白表达情况。

1.2.4 组织准备和切片 小鼠经戊巴比妥钠麻醉处死后, 经 40 g/L 多聚甲醛灌注后取出眼球, 去除晶状体后再用 40 g/L 多聚甲醛固定 4~6 h; 放入 250 g/L 蔗糖溶液中脱水直至组织沉底; OCT 包埋后迅速冷冻于 -20℃; 冰冻切片连续矢状位切片, 切片厚度 10 μm; 每个眼球连续切片 15 套, 室温晾干后甘油封片。

1.2.5 图像采集与分析 荧光显微镜下观察切片, 每个组织分别于中央视网膜部 (视神经周围 100 μm 的部位)、中央周边部 (视神经距视网膜最外层的中间部位) 和周边部 (视网膜最外层部位) 采集图像^[8], 并用 Image Tool 软件计数存活的视网膜神经节细胞数目。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计

量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数比较用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 野生型小鼠视神经横断损伤后 AR 的表达 对野生型小鼠进行视神经横断损伤手术, 假手术组仅分离暴露视神经眶内段。通过 Western blot 法检测小鼠视神经横断组 (图 1A) 及假手术组 (图 1B) 术后 0、3、5、7 d 和 14 d 视网膜 AR 的表达变化情况。结果显示: 假手术组 AR 的表达并未随着损伤时间的增加而发生明显变化 (图 1D), 但视神经横断组 AR 的表达随着损伤时间的增加逐渐升高 (图 1C), 并在损伤后第 7 天达到高峰 (图 1A; 图 1C)。

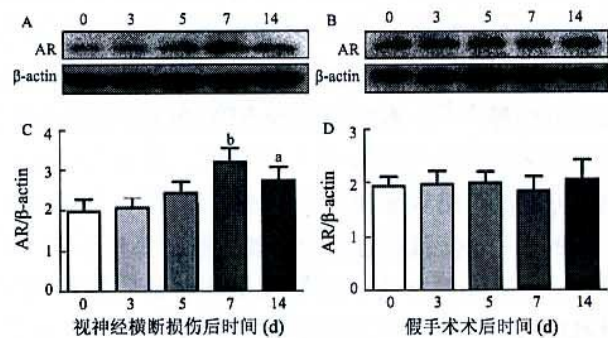


图 1 野生型小鼠视神经切断后, 视网膜中 AR 蛋白的表达情况
A: 野生型小鼠 ONT 后, AR 蛋白的表达情况; B: 野生型小鼠假手术组, AR 蛋白的表达情况; C: 视神经切断组中 AR 蛋白的相对表达量, 术后第 7 天 AR 表达量达到高峰; D: 假手术组中 AR 蛋白的相对表达量, 术后各时间点 AR 表达量没有统计学差异 ($n=4$, $^*P < 0.05$ vs 0 d, $^bP < 0.01$ vs 0 d)。

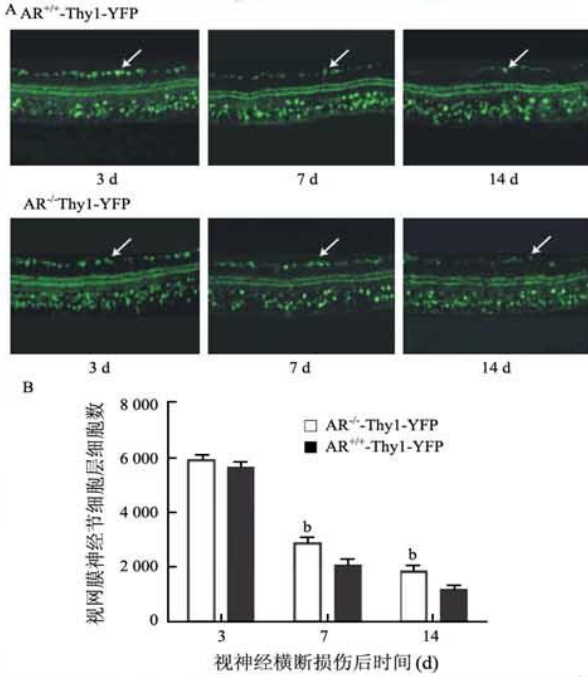
量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数比较用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2 AR 对视神经横断损伤后视网膜神经节细胞存活的影响

AR^{+/+} YFP 小鼠和 AR^{-/-} YFP 小鼠进行视神经横断损伤手术, 通过荧光显微镜下观察视网膜冰冻切片分别计数术后 3 d、7 d 和 14 d 存活的视网膜神经节细胞的数目 (图 2A)。结果显示: 随着损伤时间的增加, AR^{+/+} YFP 和 AR^{-/-} YFP 小鼠存活的视网膜神经节细胞数目均呈现下降趋势; 损伤后 3 d AR^{+/+} YFP 和 AR^{-/-} YFP 小鼠存活的视网膜神经节细胞数量相互比较没有明显差异 (图 2A, B); 但损伤后 7 d AR^{-/-} YFP 小鼠存活的视网膜神经节细胞开始明显多于 AR^{+/+} YFP 小鼠 (图 2A, B)。

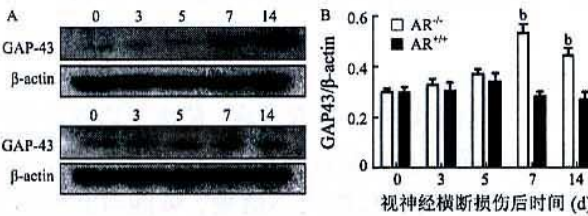
2.3 AR 对小鼠视神经横断损伤后 GAP-43 表达的影响 神经生长相关蛋白 (growth-associated protein-43, GAP-43) 是轴突生长锥中定位于膜骨架的神经组织特异性磷酸蛋白质^[13]。广泛存在于神经组织中, 尤其在生长、分化和再生的轴突末端以及突触前膜含量极高, 是一种神经轴突的生长蛋白, 与神经发

育、轴突再生和突触重建密切相关。给予 AR^{-/-}和野生型小鼠视神经横断损伤手术,通过 Western blot 法分别检测术后 0、3、5、7 和 14 d 视网膜 GAP-43 的表达变化情况(图 3A;图 3B)。结果显示:随着损伤时间的增加,AR^{-/-}基因敲除小鼠 GAP-43 的表达逐渐升高,并在术后第 7 天达到高峰;视神经损伤后第 7 天开始 AR^{-/-}基因敲除小鼠 GAP-43 的表达明显高于 AR^{+/+}野生型小鼠(图 3C)。



A: AR^{+/+}YFP 小鼠和 AR^{-/-}YFP 小鼠视神经横断损伤后分别在 3、7、14 d 存活的视网膜神经节细胞(箭头); B: 视神经横断损伤后 3、7、14 d, AR^{+/+}YFP 小鼠组和 AR^{-/-}YFP 小鼠组视网膜存活的节细胞数目变化情况,术后第 7 天开始 AR^{-/-}YFP 小鼠组存活的节细胞数目明显多于 AR^{+/+}YFP 小鼠组(n=6, ^bP<0.01 vs AR^{+/+}YFP 小鼠组)。

图 2 视神经横断损伤后, AR^{+/+}YFP 小鼠和 AR^{-/-}YFP 小鼠存活的视网膜神经节细胞数目



A: AR^{-/-}组视神经横断损伤后, Western blot 法检测的术后 0、3、5、7、14 d 视网膜 GAP-43 的表达情况; B: AR^{+/+}组视神经横断损伤后, Western blot 法检测的术后 0、3、5、7、14 d 视网膜 GAP-43 的表达情况; C: 视神经横断损伤后, AR^{-/-}组 GAP-43 表达量在术后第 7 天开始明显升高,并且从第 7 天开始 AR^{-/-}组 GAP-43 表达量高于 AR^{+/+}组(n=4, ^bP<0.01 vs AR^{+/+}组)。

图 3 视神经横断损伤后, AR^{-/-}小鼠和野生型小鼠 GAP-43 表达情况

3 讨论

许多眼科疾病均是由于视神经损伤后发生了以视网膜神经节细胞(RGC)不可逆性凋亡或坏死为主的变化并导致视神经传导通路中断而引起的。作为中枢神经的代表,视神经损伤以及损伤后再生机制近年来得到深入而广泛的研究。视神经在损伤后或者在周围神经病变中不能再生是目前临床上亟待解决的问题之一。视网膜神经节细胞轴突形成视神经后能够将所有视觉信息传递给神经中枢,但是在视神经损伤后,由于 RGC 不可逆性死亡造成视神经不能再生,进而导致视力的永久性丧失。目前关于如何促进 RGC 存活和轴突再生方面至少有 4 个问题需要突破:促进 RGC 的存活、消除视神经周围抑制其再生的环境、增强 RGC 固有的轴突生长潜能、优化 RGC 与大脑之间的靶向链接^[14]。

近年来无论是在高血糖引起的糖尿病相关病变中,还是在血糖正常情况下参与介导生长因子以及化学信号的传导过程中,人们对 AR 都有十分深入而广泛的研究。AR 在由糖尿病引起的周围神经损伤后再生方面发挥着重要的作用,它主要作用是在沃勒变性过程中影响血管化和巨噬细胞入侵。AR 或者多元醇通路参与了糖尿病引起的周围神经病变的病理过程,多元醇通路活性增高会抑制巨噬细胞入侵,因此也会抑制沃勒变性和神经再生^[15]。这可能是由于施旺细胞的毒性作用抑制了轴突传递和神经内膜的血液流动所致。AR 还有可能通过干扰微血管环境抑制损伤神经区域巨噬细胞的聚集。我们前期研究^[11]发现 AR 在脊髓损伤后的巨噬/小胶质细胞中表达升高,并通过促进巨噬细胞/小胶质细胞向 M2 方向极化来促进脊髓损伤后的神经功能恢复。巨噬/小胶质细胞的不同极化方向对损伤的神经具有不同的作用: M1 型细胞分泌的促炎性细胞因子(IFN-γ、TNF-α 和 IL-6 等)具有神经毒性,不利于神经再生; M2 型巨噬/小胶质细胞释放的抑制炎症因子(IL-10 和 TGF-β 等)和多种神经生长因子(睫状神经营养因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、血小板衍生生长因子、神经生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子和神经营养因子 3 等)会促进神经再生^[11]。本研究结果发现,野生型小鼠视神经横断损伤后随着损伤时间的延长,AR 的表达会逐渐升高。表明 AR 参与了视神经损伤后的相关反应过程; AR^{-/-}YFP 小鼠存活的视网膜神经节细胞数目在术后同一时间点明显多于 AR^{+/+}YFP 小鼠,提示 AR 可能参与了视神经损伤后视网膜神经节细胞的存活过程; AR^{-/-}小鼠视神经横断损伤后 GAP-43 表达量

在术后第7天升高并且从术后第7天开始 AR^{-/-}小鼠 GAP-43 表达明显高于野生型小鼠,表明 AR 可能参与了视神经损伤后再生的调节过程。这与之前报道的 AR 敲除能够促进周围神经再生及减少脊髓损伤区面积等结果相一致。本研究结果首次观察到在正常血糖情况下,AR 参与了视神经损伤后的反应,并且 AR 基因缺陷能够促进视网膜神经节细胞的存活,上调神经再生相关蛋白的表达。但是 AR 分子是直接参与调节视网膜节细胞再生,还是通过影响视神经损伤后的炎症反应间接调节视网膜节细胞的存活,还有待进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus[J/OA]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 87.
- [2] Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1): 17-20.
- [3] Vedantham S, Ananthakrishnan R, Schmidt AM, et al. Aldose reductase, oxidative stress and diabetic cardiovascular complications[J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2012, 10(3): 234-240.
- [4] Ramana KV. ALDOSE REDUCTASE: New Insights for an Old Enzyme[J]. *Biomol Concepts*, 2011, 2(1-2): 103-114.
- [5] Srivastava SK, Yadav UC, Reddy AB, et al. Aldose reductase inhibition suppresses oxidative stress-induced inflammatory disorders[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191(1-3): 330-338.
- [6] Yadav UC, Aguilera-Aguirre L, Ramana KV, et al. Aldose reductase inhibition prevents metaplasia of airway epithelial cells[J/OA]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14440.
- [7] Yadav UC, Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase inhibition suppresses airway inflammation[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191(1-3): 339-345.
- [8] Fu ZJ, Li SY, Kociok N, et al. Aldose reductase deficiency reduced vascular changes in neonatal mouse retina in oxygen-induced retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(9): 5698-5712.
- [9] Yadav UC, Shoeb M, Srivastava SK, et al. Aldose reductase deficiency protects from autoimmune-and endotoxin-induced uveitis in mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(11): 8076-8085.
- [10] Reddy AB, Tammali R, Mishra R, et al. Aldose reductase deficiency protects sugar-induced lens opacification in rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191(1-3): 346-350.
- [11] 陈鹏,郭宏敏,郑晶晶,等. 醛糖还原酶在小鼠损伤脊髓小胶质/巨噬细胞中的表达及其作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(2): 203-205.
- [12] Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, et al. ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection[J]. *Vision Res*, 2010, 50(21): 2176-2187.
- [13] Piao Y, Liang X. Chinese medicine in diabetic peripheral neuropathy: experimental research on nerve repair and regeneration[J/OA]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 191632.
- [14] Moore DL, Goldberg JL. Four steps to optic nerve regeneration[J]. *J Neuroophthalmol*, 2010, 30(4): 347-360.
- [15] Chen YS, Chung SS, Chung SK. Aldose reductase deficiency improves Wallerian degeneration and nerve regeneration in diabetic thyl-YFP mice[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(3): 294-305.

读者·作者·编者

本刊论文中外文字符斜体的使用说明

在医学科论文写作中,常要用到外文字母。外文字母有正斜体、大小写等区分,如不注意常引起错误。建议作者在进行医学科论文写作时,能按国家标准和有关规定进行写作,正确使用。现将生物医学论文中常用的须写成斜体的外文字符归纳如下:

1. 统计学符号: 样本大小(n), 均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$), 检验方法(如 t 检验、 $LSD-t$ 检验), 概率(P)值, 相关系数(r)等。
2. 生物分类学中属以下(包括属)的拉丁文学名: 国际上一个细菌种的科学命名采用拉丁文双命名法,由两个拉丁字组成,前一字为属名,用名词,首字母大写;后一字为种名,用形容词,首字母小写,印刷时用斜体字。中文译名则是以种名放在前面,属名放在后面。如大肠埃希菌(*Escherichia coli*), 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*), 伤寒沙门菌(*Salmonellatyphi*)等。有时某些常见的细菌也可用习惯通用的俗名,如结核杆菌(*Tuberclebacillus*)、伤寒杆菌(*Typhoidbacillus*)等。
3. 限制性内切酶缩写符号: *Hind III*, *BamH I*, *EcoR I*等。
4. 在英文中使用的某些拉丁词: *et al*, *vs*, *in situ*, *in vivo*, *in vitro*等。
5. 化学分子中表示旋光性、分子构型、构象和取代基位置等的符号: 左旋谷氨酰胺(*L-glutamine*), 反式-2-丁烯酸(*trans-2-butenoic acid*)等。
6. 物理量的符号: 相对分子质量(M_r), 质量(m), 长度(L), 时间(t), 物质的量的浓度(c), 质量浓度(P)等。
7. 基因的英文名称缩写: *p53*, *BMP*。