

视神经损伤后视网膜 Müller 细胞未折叠蛋白反应 相关因子 IRE-1 与 GLAST 的表达 *

马晓蕾 潘 峰 胡 丹[△]

(第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究视神经损伤后视网膜 Müller 细胞中是否有未折叠蛋白反应(UPR)及其与 L-谷氨酸 / L-天门冬氨酸转运体(GLAST)的关系。方法:视神经钳夹伤模型建立成功后,运用 HE 染色观察视网膜神经节细胞数目改变,免疫化学染色,免疫荧光双标记,western-blot 观察 UPR 相关因子需肌醇酶 1 (IRE-1)与 GLAST 的表达及相关性。结果:视神经钳夹伤后 IRE-1 与 GLAST 在视网膜 Müller 细胞上共表达,术后第一天前呈上升趋势,在第一天达到顶峰,后呈下降趋势,第七天下降明显。结论:视神经损伤后,IRE-1 与 GLAST 的趋势变化有一定相关性,提示未折叠蛋白反应可能是调控 GLAST 变化的原因之一。

关键词 未折叠蛋白反应 Müller 细胞 GLAST 视网膜 大鼠

中图分类号 R774 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)08-1447-04

Expression of Unfolded Protein Reaction Related Factor IRE-1 and GLAST in Retinal Müller Cell after Optic Nerve Injury*

MA Xiao-lei, Pan feng, Hu Dan[△]

(Department of Ophthalmology, Institute of Ophthalmology of Chinese PLA, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an China)

ABSTRACT Objective: To investigate the unfolded protein response (UPR) in retinal Müller cells after optic nerve injury and the relationship between UPR and glutamate/aspartate transporter (GLAST). **Methods:** The change of the amount of retina gangliocyte was detected by HE dying and the expression and relevance of UPR correlation factor-inositol requiring enzyme 1 (IRE-1) and GLAST were detected by immunohistochemical staining, immunofluorescent double-tagging, western-blot after the modeling of trapped wound in optic nerve nipper. **Results** IRE-1 and GLAST co-express in retinal Müller cells, ascend in the common trend and reach the summit one day after surgery, then drop sharply in the seventh day. **Conclusions:** There was relationship between the IRE-1 and GLAST in trend changes after optic nerve injured which suggests UPR may be one cause of the regulation of GLAST changes.

Key Words: UPR; Müller cells; GLAST; Retina; Rat

Chinese Library Classification(CLC): R774 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)08-1447-04

前言

外伤性视神经损伤,青光眼等视神经疾病,均是以视网膜神经节细胞(RGCs)及其纤维渐进性死亡为主要特点,对 RGCs 的保护一直是眼科研究的难点之一^[1,2]。Müller 细胞依靠 L-谷氨酸 / L-天门冬氨酸转运体(GLAST)维持着视神经节细胞周围的谷氨酸浓度,使视神经节细胞免受高浓度谷氨酸的毒性损害^[3]。非折叠蛋白反应(unfolded protein reaction, UPR)是细胞在炎症、外伤等的刺激下,细胞初期首先表现为内质网存在大量非折叠蛋白及错误折叠蛋白的蓄积,触发细胞的一系列反应^[4]。需肌醇酶 1 (inositol requiring enzyme 1, IRE-1), 双链 RNA 活化蛋白激酶 PKR (doublestranded RNA-activated protein kinase)样内质网激酶(PERK),活化转录因子 6(ATF-6)是 UPR 的相关因子^[5]。本实验检测在建立成功的视神经钳夹伤模型上,不同时间点大鼠视网膜内 IRE-1,

GLAST 的表达情况,以明确 UPR 是否与 GLAST 的表达与数量变化有相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

成年雄性 SD 大鼠 24 只,SPF 级,体质量 220~250g,第四军医大学实验动物中心提供,外眼正常,对光反射灵敏,检眼镜查屈光介质清晰,眼底无异常,予以 12h 明暗交替光照,不限食水,室温 18~23℃条件下饲养。所有动物采用随机数字表法进行完全随机化分组。实验过程遵循 ARVO 宣言。兔抗大鼠 IRE-1 抗体(日本 santa cruz 公司),豚鼠抗大鼠 GLAST 抗体(美国 us biological 公司),兔抗大鼠 GLAST 抗体(美国 abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物视神经损伤模型建立 按随机数字方法将动物分为

* 基金项目 国家自然科学基金(30772368)

作者简介:马晓蕾(1984-),女,硕士研究生,主要研究方向:视神经保护。电话:15229261081
Email: maxiaolei821@163.com

△通讯作者:胡丹,男,教授,电话:13891938899,Email: hoodan@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-01-23 接受日期:2011-02-18)

对照组(4 只)、损伤组(夹伤后不同时间组即术后 0.5, 1,3, 5,7d, 共 5 组,每组 4 只)。用 10 g/L 戊巴比妥钠注射液(60 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠。沿右眼外眦眶剪开皮肤,筋膜至巩膜表面,小心分离至暴露出视神经根部,沿视神经纵轴方向谨慎挑开鞘膜,避免伤及视网膜动脉,48 g 反向镊以垂直角度于球后 2mm 处钳夹视神经 40s,缝合结膜及皮肤。术后用盖玻片轻压角膜观察视网膜血管状态,选择无感染、无视网膜缺血表现的大鼠进行实验。对照组动物不夹伤视神经,余操作同损伤组。

1.2.2 组织制备 建模后,按各时间点腹腔麻醉,12 只 SD 大鼠行升主动脉插管,快速灌注生理盐水约 100 mL 后继续灌注含 40 g/L 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PB, pH7.4) 400mL,先快速灌注 200mL,后 200mL 持续灌注固定 2h,灌毕立即取手术眼球,置入含 250g/L 蔗糖的磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)中,4℃过夜。冰冻切片机(德国 Leica CM1900)中将眼球以矢状位连续切片,片厚 12μm。对照组及每个损伤组切片 4 套。另 12 只 SD 大鼠用于 western-blotting,快速取下眼球,小心分离出视网膜于 EP 管中,-80℃保存备用。

1.2.3 HE 染色 取视网膜冰冻切片行常规苏木精-伊红染色。

1.2.4 免疫组织化学染色 取视网膜冰冻切片行免疫组织化学染色。一抗为豚鼠抗大鼠 GLAST 单克隆抗体(1:1000)和兔抗大鼠 IRE-1 单克隆抗体(1:200),4℃过夜,二抗(Sigma, 1:200) 37℃孵育 1 h,ABC(Vector, 1:200) 37℃孵育 1 h,DAB(Sigma)显色。梯度酒精脱水,二甲苯透明封片。

1.2.5 免疫荧光双标记染色 去视网膜冰冻切片经 0.01% mol/L PBS 漂洗 3×10min; 经兔抗 IRE-1 (1:200)和豚鼠抗 GLAST 血清(1:1000)孵育 24h(室温);再经 Texas red 标记的小鼠抗兔(1:500)和 FITC 标记的羊抗豚鼠 IgG(1:500)抗血清室温孵育 2h(避光)。常规甘油与 PBS(1:1)的混合液封片。每步骤后均用 0.01%mol/L PBS (pH7.14)充分洗涤。

1.2.6 Western-blot 取 -80℃保存视网膜放入匀浆器,加裂解液在冰上研磨后于 4℃下离心,取上清液。行蛋白定量,按检测试剂测定的蛋白质浓度加样(20ul/泳道)。凝胶电泳后,用电转膜法将分离的蛋白质转,用封闭液封闭后至硝酸纤维膜,然后用丽春红液证实转膜成功后,将膜依次经的 5%脱脂奶粉液室温孵 1h,加适当比例稀释的一抗 (1 2000) 37 孵育 1h 4 过夜, TBST 充分漂洗,加二抗稀释液 37 孵育 1h,TBST 充分漂洗,辣根过氧化物酶显色。FluorChem FC2 凝胶成像系统扫描并拍照。

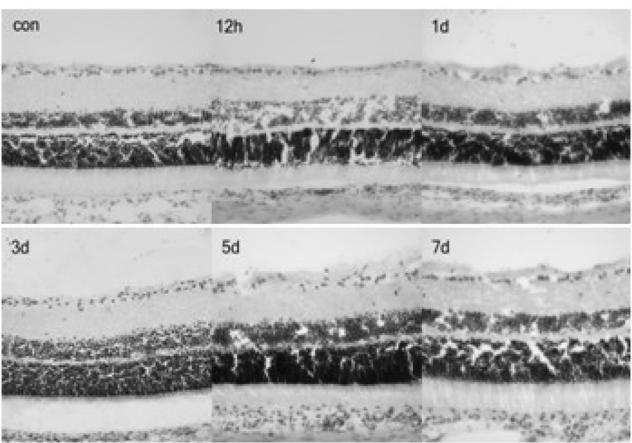
1.3 统计学方法

统计学处理:数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示,用统计软件 SPSS17.0 进行 student-t 检验。

2 结果

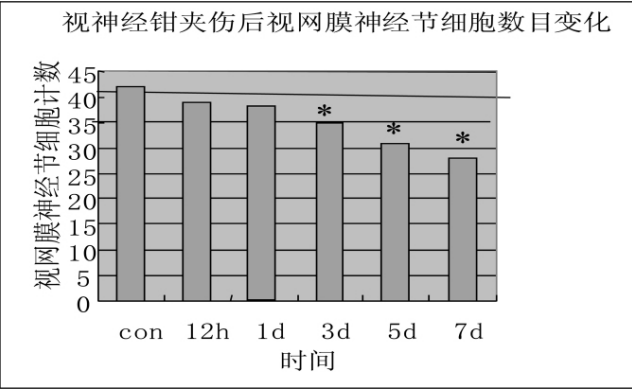
2.1 光镜下观察视网膜神经节细胞

视网膜神经节细胞数目于第三天起有减少趋势($p<0.05$),第五天,第七天呈明显减少趋势($p<0.01$)。提示模型建立成功(图 1)。



视网膜 HE 染色

Fig.1 Under light microscope X400 HE dyeing of retina after optic nerve injured at con, 12h,1d,3d,5d,7d

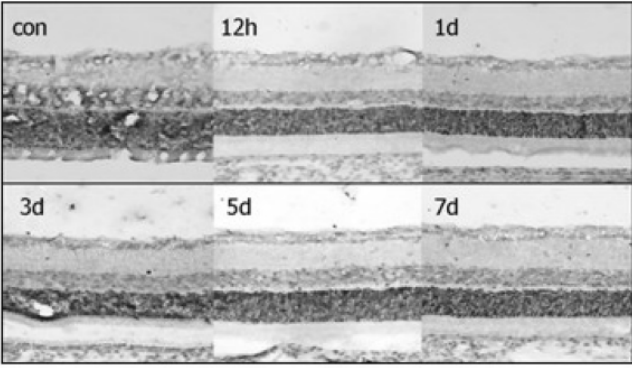


节细胞数目变化

Fig 2 the number of RGCs after optic nerve injured at con, 12h,1d,3d,5d,7d

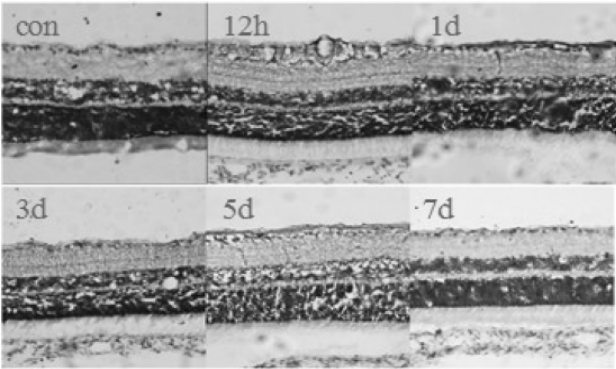
2.2 免疫化学染色

IRE-1 与 GLAST 在正常片中有一定表达,视神经损伤 1d 内呈逐渐增高趋势,3d 到 7d 的呈降低趋势,第 7d 降低明显并低于正常组(图 3,图 4)。



视网膜 IRE-1 免疫组织化学染色

Fig 3 Under light microscope X400 Immunohistochemistry of IRE-1 resulted in retina after optic nerve injured at con, 12h,1d,3d,5d,7d

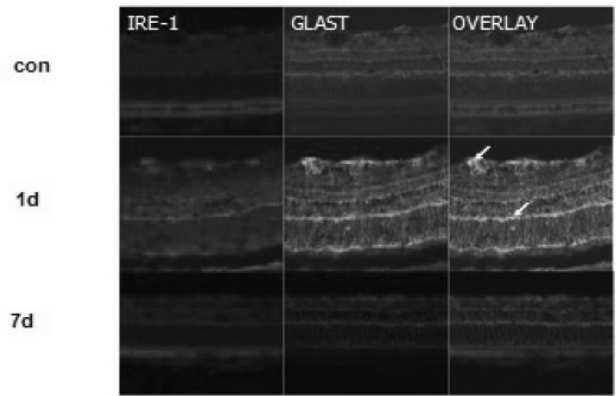


视网膜 GLAST 免疫组织化学染色

Fig 4 Under light microscope X400 Immunohistochemistry of GLAST resulted in retina after optic nerve injured at con, 12h,1d,3d,5d,7d

2.3 免疫荧光双标记染色

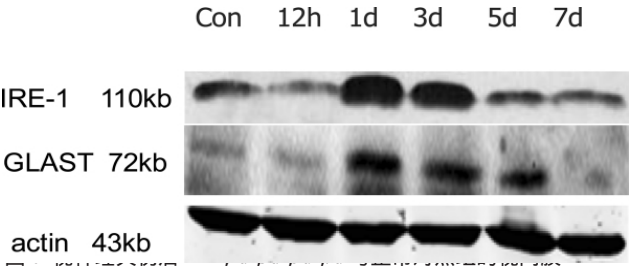
正常小鼠视网膜中, GLAST 的免疫荧光贯穿视网膜全层, 包括外丛层和内丛层、内界膜和外界膜, 内外核层中亦有放射状的荧光反应物。这些着色的特点提示 GLAST 主要表达在 Müller 细胞上。IRE-1 与 GLAST 共表达在视神经损伤 1d 内呈明显增高, 第 7d 降低明显(图 5)。



视网膜 IRE-1 与 GLAST 免疫荧光双标记

Fig 5 Confocal fluorescence microscopy X400 immunofluorescent double-tagging of IRE-1 and GLAST resulted in retina after optic nerve injured at con ,1d,7d

2.4 Western-blot



GLAST, western-blot 结果

Fig 6 western-blot of IRE-1 ,GLAST resulted in retina after optic nerve injured at con ,12h ,1d ,3d ,5d ,7d
IRE-1 与 GLAST 在第一天和第三天时蛋白表达明显增

加, 第五天第七天有所降低(图 6)。

3 讨论

Müller 细胞是视网膜中主要胶质细胞,它自外界膜纵向伸展,穿过整个视网膜至内界膜,其胞体在内核层,侧突包绕着视网膜中的杆细胞、锥细胞、双极细胞及神经节细胞的大部分神经元。该细胞拥有强大的维持视网膜微环境成分的生理功能,其最主要的功能是摄取神经突触释放的谷氨酸,终止谷氨酸神经突触的神经传导^[6]。研究认为细胞外谷氨酸浓度升高对 RGCs 有潜在毒性,故将谷氨酸从 RGCs 外迅速清除是 RGCs 存在和发挥正常功能的重要环节^[7]。哺乳动物体内已发现 4 种在视网膜内存在的谷氨酸转运体。GLAST 主要存在于 Müller 细胞和星形胶质细胞,EAAT-2 存在于视锥细胞和双极细胞,EAAT-3 存在于少突胶质细胞和 RGCs,EAAT-4 存在于光感受器和双极细胞^[8-11]。Müller 细胞调节细胞外谷氨酸浓度的关键步骤是,通过高亲和力的 GLAST 将这种氨基酸逆着细胞内外浓度差从细胞外转运至细胞内,以维持正常的细胞外谷氨酸浓度^[12],有研究人员利用反意寡核苷酸技术阻断 GLAST,结果发现大鼠视网膜玻璃体内的谷氨酸浓度和死亡的视网膜神经节细胞都明显增加^[13]。这说明 GLAST 对视网膜损伤后谷氨酸的清除发挥着重要的作用。GLAST 在受到外界刺激时变化的原因尚未确切,有研究显示这可能是视网膜在急性缺血早期的一种代偿性自我保护机制^[14,15],亦有文献报道来源于鼠脑组织星形细胞中 GLAST 的功能是以酶底物一诱导的方式进行调节的^[16]。

内质网应激时激活的 UPR 通路是维持细胞生存的基本手段。IRE1、PERK 及 ATF6 转导的 3 条通路有序活化和整合,使得 UPR 既不过强也不过早终止。当细胞功能不能恢复时,UPR 启动促凋亡通路,细胞接受凋亡或死亡,机体清除受损细胞^[17,18]。Ryoo 等利用二硫苏糖醇在果蝇眼上发现 RGC 发生 UPR 是导致 RGC 细胞丢失的重要原因^[19]。本研究组前期研究发现在视神经损伤后不仅能致 RGC 触发 UPR 同时在损伤远端部位的视神经干上的少突胶质细胞上也存在 UPR^[20,21]。目前,有关 Müller 细胞中 UPR 的存在及其对 GLAST 的影响,国内外未见报道。本研究发现,视神经损伤后,免疫荧光双标记结果显示,IRE-1 与 GLAST 有共表达现象,并且 IRE-1 与 GLAST 呈先升高后降低的表达趋势,Western-blot 结果进一步证实了上述现象,其原因可能是 UPR 早期的保护功能使 GLAST 升高,但随着损伤时间的延长 UPR 引起了进一步的凋亡程序使 Müller 细胞功能减退, GLAST 也相应减少,由此推测,视神经损伤后的 Müller 细胞 UPR 可能是 GLAST 变化的使动因素之一。

综上所述, Müller 细胞中存在非折叠蛋白反应,其对 GLAST 的变化发挥一定作用,可能是使 Müller 细胞功能改变而造成神经细胞损伤的重要因素,本研究为视神经保护开辟了新的途径,但其确切机制值得进一步探讨。

参考文献(References)

[1] Osborne NN, Glyn C. The potential of neuroprotection in glaucoma treatment [J]. Current Opinion in Ophthalmology, 1999, 10 :82-89
[2] Caprioli J. Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma[J]. Acta

- Ophthalmol, 1994, 75:364-369
- [3] Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F, et al. Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41:3615-3621
 - [4] Schroder M. The unfolded protein response [J]. Mol Biotechnol, 2006, 34(2):279-290
 - [5] Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress [J]. Trends Cell Biol, 2004, 14:20-28
 - [6] Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina [J]. Trends Neurosci, 1996, 19:307-312
 - [7] Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ. Müller cell protection rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(11):3444-3450
 - [8] Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, et al. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex [J]. J Neurosci, 1994, 14(9):5559-5569
 - [9] Rauen T, Kanner BI. Localization of the glutamate transporter GLT21 in rat and macaque monkey retinae [J]. Neurosci Lett, 1994, 169(2):137-140
 - [10] Rauen T, Rothstein JD, Wassle H. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina [J]. Cell Tissue Res, 1996, 286(3):325-336
 - [11] Pow DV, Barnett NL. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina [J]. Neurosci Lett, 2000, 280(1):21-24
 - [12] Li Q, Zemel E, Miller B, et al. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations [J]. Exp Eye Res, 2002, 74:615-625
 - [13] Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F, et al. Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(6):3615-3621
 - [14] Keith RG, Huna LV, Danielle V. Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(7):2236-2243
 - [15] Payet O, Maurin L, Bonne C, et al. Hypoxia stimulates glutamate uptake in whole rat retinal cells in vitro. Neurosci Lett, 2004, 356(2):148-150
 - [16] Munir M, Correale DM, Robinson MB. Substrate-induced up-regulation of Na(+)-dependent glutamate transport activity [J]. Neurochem Int, 2000, 37:147-162
 - [17] Sargsyan E, Baryshev M, Mkrtchian S. The physiological unfolded protein response in the thyroid epithelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(2):570-576
 - [18] Durose JB, Tam AB, Niwa M. Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(7):3095-3107
 - [19] Ryoo HD, Domingos PM, Kang M, et al. Unfolded protein response in a Drosophila model for retinal degeneration. EMBO J, 2007, 26(1):242-252
 - [20] Pan F, Tian R, Zhang YK, et al. Unfolded protein responses of the retinal ganglion cells after optical nerve crush in rats [J]. Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi), 2008, 8(4):694-697
 - [21] Chen XY, Duan L, Pan F, et al. Electron microscopic localization of IRE1 on the retinal ganglion cells and oligodendrocytes on retinal nerve of the rat after optic nerve crushing [J]. Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi), 2009, 9(7):1245-1247

(上接第 1457 页)

- [9] 肖会敏, 王四旺, 王剑波, 等. 连翘挥发油的成分分析及其药理作用的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8):2047.
Xiao Hui-min, Wang Si-wang, Wang Jian-bo, et al. Progress of essential oils of forsythia and pharmacological action [J]. LI SHI ZHEN MEDICINE AND MATERIAL MEDICAL RESEARCH, 2008, 19(8):2047
- [10] 肖会敏, 王四旺, 谢艳华, 等. 两种提取青翘挥发油工艺的比较研究 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(16):1515
XIAO Hui-min, WANG Si-wang, XIE Yan-yuan, et al. Comparative study on 2 kinds of technologies for extracting essential oil from unripe forsythia suspensa [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2006, 27(16):1515
- [11] 张春娥, 张惠, 刘楚怡, 等. 亚油酸的研究进展 [J]. 粮油加工, 2010, 8(5):18-21
Zhang Chun-e, Zhang Hui, Liu Chu-yi, et al. Progress of linoleic acid [J]. Cereals and Oils Processing, 2010, 8(5):18-21(In China)
- [12] Chert J K, McDonald B E, Gerrard J M, et al. Effects of dietary α -linolenic acid and its ratio to linolenic acid on platelet and plasma fatty acids and thrombogenesis. LIPIDS, 1993, 28:811
- [13] Simopoulos A P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am Clin Nutr, 1991, 54:438-463
- [14] Sakat K, Shimokawa T. Lipid lowering effects of high linoleate and high α -linolenate diets in rats and mice. Consequence of long-term feedings. Chem Pharm Bull, 1992, 40(8):2129-2132
- [15] Ikeda I, Wakamatsu K. α -linolenic eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids affect lipid metabolism differently in rats. J Nutr, 1994, 24:1898
- [16] 穆照梅, 刘玉军, 孙明堂, 等. 浓缩鱼油升高大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇机理的探讨 [J]. 营养学报, 1990, 12:134-138
Mu Zhang-mei, LIU Yu-jun, SUN Ming-tang, et al. Mechanism's study on concentrated fish oil increasing serum high-density lipoprotein cholesterol [J]. ACTA NUTRIMENTA SINICA, 1990, 12:134-138
- [17] 杨倩, 王四旺, 王剑波, 等. 椒目中 α -亚麻酸的提取与鉴定 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(4):319
Yang Qian, Wang Si-wang, Wang Jian-bo. Study on extraction and identification of α -linolenic acid from Semen Zanthoxyli Bungeani [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2008, 17(4):318-320