

·论著·

神经调节蛋白-1对早期糖尿病大鼠视网膜病变神经损伤的保护作用

张博¹,李凤君²,左中夫³

作者单位
1. 葫芦岛爱尔眼科医院小儿眼科
辽宁 葫芦岛 125001
2. 唐山市眼科医院白内障科
河北 唐山 063000
3. 锦州医科大学基础医学院解剖学教研室
辽宁 锦州 121001
基金项目
中国博士后科学基金项目(No.2017M612870);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(No.LJQ2015069);辽宁省自然科学基金(No.201602340)
收稿日期
2018-04-25
通讯作者
左中夫
394499576@qq.com

摘要 **目的:**探讨神经调节蛋白-1(NRG-1)对早期糖尿病(DM)大鼠视网膜病变神经损伤的保护作用。**方法:**SD大鼠30只,随机分成对照(CONT)组、DM组、NRG-1组,每组10只。后两组大鼠采用单次腹腔注射链脲佐菌素(STZ)制备DM模型。造模成功后,NRG-1组玻璃体腔注射人重组NRG-1,CONT组、DM组玻璃体腔给予等体积生理盐水。4周后,HE染色检测视网膜神经节细胞(RGC)密度,免疫荧光检测视网膜神经胶质酸性蛋白(GFAP)、微管相关蛋白-2(MAP-2)表达,Western blot检测视网膜GFAP、MAP-2蛋白的相对表达量。**结果:**与CONT组相比,DM组的GFAP表达明显升高,MAP-2表达及RGC密度明显下降(均 $P<0.01$);与DM组相比,NRG-1组的GFAP表达明显下降,MAP-2表达及RGC密度明显增加(均 $P<0.01$)。**结论:**NRG-1可能通过抑制胶质细胞活化,上调视网膜MAP-2表达,恢复视网膜RGC密度,从而对早期DM大鼠视网膜病变神经损伤有保护作用。
关键词 糖尿病视网膜病变;神经调节蛋白-1;神经损伤;神经胶质酸性蛋白
中图分类号 R741;R741.05;R587.2 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.11.002
张博,李凤君,左中夫.神经调节蛋白-1对早期糖尿病大鼠视网膜病变神经损伤的保护作用[J].神经损伤与功能重建,2019,14(11):544-546,556.

Protective Effect of Neuregulin-1 on Nerve Injury of Early Diabetic Retinopathy Rats
ZHANG Bo¹, LI Feng-jun², ZUO Zhong-fu³, 1. Department of Pediatric Ophthalmology, Huludao Aier Eye Hospital, Liaoning 125001, China; 2. Department of Cataract, Tangshan City Ophthalmology Hospital, Hebei 063000, China; 3. Department of Anatomy, College of Basic Medicine, Jinzhou Medical University, Liaoning 121001, China
Abstract **Objective:** To investigate the protective effect of Neuregulin-1 (NRG-1) on nerve injury in early diabetic retinopathy rats. **Methods:** Total 30 SD rats were randomly divided into groups control (CONT), diabetes mellitus (DM), and NRG-1 treatment, with 10 rats in each group. Rats in the last two groups were administered Streptozotocin (STZ) by a single intraperitoneal injection to create the DM model. After successful establishment of the model, the NRG-1 treatment group received intravitreal injections of recombinant NRG-1, and the CONT and DM groups were given equal volume injections of normal saline. Four weeks later, the density of retinal ganglion cells (RGC) were detected by HE staining, expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and microtubule associated protein-2 (MAP-2) were detected by immunofluorescence, and relative expression levels of retinal GFAP and MAP-2 were detected by Western blot. **Results:** Compared with the CONT group, the DM group showed significantly increased GFAP expression and significantly decreased MAP-2 expression and RGC density (all $P<0.01$). Compared with the DM group, the NRG-1 group displayed significantly decreased GFAP expression and significantly increased MAP-2 expression and RGC density (all $P<0.01$). **Conclusion:** NRG-1 can increase the expression of retinal MAP-2 and restore the density of RGC by inhibiting the activation of glial cells. NRG-1 may have protective effects on the neuropathy of early diabetic retinopathy rats.
Key words diabetic retinopathy; neuregulin-1; nerve injury; glial fibrillary acidic protein

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)患病率逐年增加,20年以上的糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者DR患病率约为75%,为DM人群最常见眼部并发症^[1]。近年来研究发现,神经病变为血管病变之外参与DR的重要原因^[2,3]。因此,有效预防和治疗DR神经病变尤为重要。神经生长因

子与神经元发育、生长和存活密切相关^[4],视网膜神经损伤后神经生长因子的匮乏、蛋白表达的抑制是最终导致神经元死亡的重要原因。神经调节蛋白-1(Neuregulin-1, NRG-1)在神经病变领域一直备受关注。研究发现,局灶性脑缺血大鼠模型给予NRG-1治疗可发挥强大的神经保护作用,

可有效减少神经元死亡数目^[5]。尽早使用外源性NRG-1,可有效防止视神经损伤大鼠模型中神经元损伤,对于损伤后神经再生大有益处^[6]。最新研究发现,NRG-1通过细胞外信号调节激酶5(extracellular signal regulated kinase, ERK5)依赖的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径对脑缺血再灌注损伤有神经保护作用^[7]。但NRG-1对DR的影响还未见报道。因此,本研究通过对早期DM大鼠玻璃体腔注射NRG-1治疗,探讨NRG-1对早期DM大鼠视网膜病变神经损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠30只,体质量180~220 g,购自锦州医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(辽)2014-16。动物饲养室温25℃,湿度43%,自由摄食饮水。

1.1.2 实验试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,购于美国Sigma公司);人重组NRG-1(购于上海然泰生物科技有限公司);胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)抗体(购于英国Abcam公司);HE染色试剂盒、荧光二抗及Western blot二抗(购于北京碧云天生物公司);荧光倒置显微镜(购于日本Olympus公司);冰冻切片机(购于德国SLEE公司);水平电泳仪(购于美国BIO-RAD公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 将大鼠随机分成对照(CONT)组、DM组、NRG-1组,每组10只。后两组大鼠采用单次腹腔注射STZ 50 mg/kg,72 h后检测尾静脉血糖,血糖浓度 >16.7 mmol/L为造模成功。模型诱导成功后,参考文献^[6],NRG-1组用微量注射器先作前房穿刺,放出约10~15 μ L房水,然后自角巩膜缘后方0.5~1 mm处穿刺入玻璃体,注入0.3 μ g/ μ L人重组NRG-1 10 μ L,每周1次,共4次。CONT组、DM组玻璃体腔给予等体积生理盐水。实验中均采取右侧眼球注射,左眼作为对照,实验过程中如发现右侧眼球有玻璃体积血、外伤性白内障等严重并发症者予以剔除。4周后,进行各项指标检测,实验遵循国家《实验动物管理条例》。

1.2.2 样本制备 4周后,每组取5只大鼠,水合氯醛麻醉后经心脏灌注4%多聚甲醛固定。固定完成后将大鼠眼球取出于固定液中,4℃保存,用于免疫荧光及HE染色。每组取4只大鼠水合氯醛深度麻醉,取新鲜

视网膜于2.5 mL EP管中,依据重量加蛋白裂解液,冰上剪碎,4℃离心机25 min后取上清,-20℃保存。实验过程中剔除2只外伤性白内障大鼠及1只玻璃体出血大鼠。

1.2.3 视网膜HE染色 将固定液中的眼球取出后用20%蔗糖溶液脱水,OCT包埋后切片,厚度为12 μ m。载玻片浸于PBS洗涤3次,每次10 min;苏木素浸染载玻片,2 min,自来水冲洗;PBS中1 min,自来水冲洗;95%酒精1 min;伊红浸染,2 min,自来水冲洗;70%、80%酒精各2 min,95%、100%酒精各2次,每次5 min;;二甲苯2次,PBS洗涤3次,每次20 min;中性树胶封片,显微镜观察视网膜节细胞(retinal ganglion cells, RGC)。

1.2.4 免疫荧光检测大鼠视网膜GFAP、MAP-2表达 将固定液中的眼球取出后用20%蔗糖溶液脱水,OCT包埋后切片,厚度为12 μ m。载玻片于PBS洗涤3次,每次5 min;5%山羊血清+0.1% Triton-100室温孵育30 min,滴加兔抗大鼠GFAP(1:700)、兔抗大鼠MAP-2(1:500),4℃过夜;PBS洗涤3次,每次5 min;滴加山羊抗兔二抗,室温避光2 h;PBS洗涤3次,每次5 min;封片后荧光显微镜观察。拍照后将CONT组蛋白免疫荧光强度设定为100.00%,应用Image J软件分析各组蛋白荧光强度。

1.2.5 Western blot检查大鼠视网膜GFAP、MAP-2相对表达量 BCA法测定蛋白浓度,确定电泳时加入15 μ L样品;开始电泳,调整电压为80 V,待电泳条带成一条直线时,调整电压为120 V;半干转膜后取目的条带,1% BSA室温封闭2 h;加入一抗(兔抗大鼠GFAP,1:10 000;兔抗大鼠MAP-2,1:5 000),4℃孵育过夜;TBST洗涤4次,每次5 min;加入HRP标记的二抗室温2 h,孵育后TBST洗涤4次,每次5 min;ECL试剂盒显影,Image J软件分析灰度值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件分析数据,计量资料以(均数 $\pm$ 标准差)表示,单因素方差分析,LSD检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE染色检测RGC密度结果

CONT组RGC数目较多,结构清晰;DM组RGC结构紊乱,数目较少。应用Image J软件计数RGC数量并换算成密度,3组之间有显著性差异($F=276.94$, $P<0.01$)。与CONT组比较,DM组密度明显降低($P<$

0.01);与DM组比较,NRG-1组的RGC密度明显增加($P<0.01$),见图1、表1。

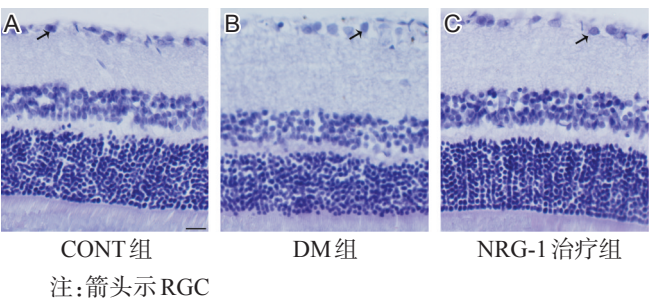
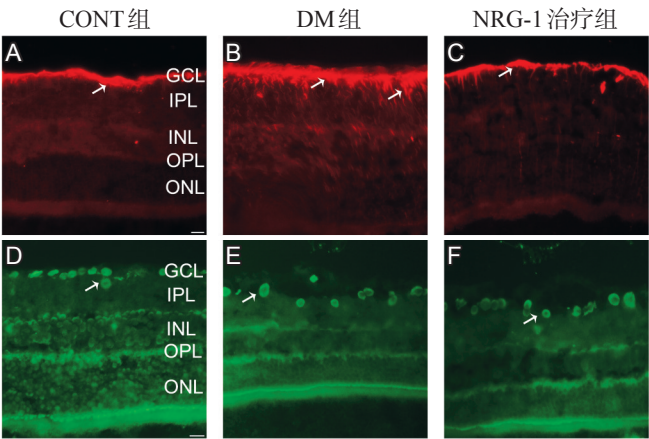


图1 视网膜RGC密度(HE染色,×200)

2.2 免疫荧光检测结果

GFAP和MAP-2主要微量表达于视网膜节细胞层,3组之间差异有统计学意义($F=127.08, P<0.05$; $F=418.18, P<0.01$)。与CONT组比较,DM组的GFAP荧光强度明显升高($P<0.01$),MAP-2荧光强度明显下降($P<0.01$);与DM组比较,NRG-1组的GFAP荧光强度明显下降($P<0.01$),MAP-2荧光强度明显升高($P<0.01$),见图2、表1。



注:GCL:节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;箭头示阳性表达,GFAP为红色,MAP-2为绿色

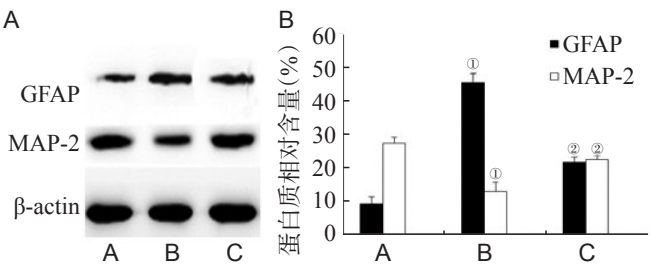
图2 各组大鼠视网膜GFAP、MAP-2的表达(免疫荧光染色,×200)

2.3 Western blot 检测结果

CONT组、DM组、NRG-1组的GFAP蛋白、MAP-2蛋白相对表达差异有统计学意义($F=118.74, P<0.01$; $F=78.08, P<0.01$)。与CONT组比较,DM组的GFAP表达明显增加($P<0.01$),MAP-2表达明显减少($P<0.01$);与DM组比较,NRG-1组的GFAP表达明显下降($P<0.01$),MAP-2表达明显增加($P<0.01$),见图3、表1。

3 讨论

DR患病率逐年增加,20年以上的DM患者DR患



注:与CONT组比较,① $P<0.01$;与DM组比较,② $P<0.01$

图3 Western blot检测GFAP、MAP-2蛋白相对表达量

表1 各组RGC、GFAP、MAP-2表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	RGC密度/mm ²	GFAP免疫荧光强度/%
CONT组	10	527.93±10.32	100.00±0.00
DM组	10	351.11±13.42	173.68±4.16
NRG-1组	10	430.16±19.86	141.03±12.32

组别	MAP-2蛋白 免疫荧光强度/%	GFAP蛋白相 对表达/%	MAP-2蛋白 相对表达/%
CONT组	100.00±0.00	9.10±2.19	27.31±1.85
DM组	56.67±3.05	45.47±2.71	12.97±2.63
NRG-1组	75.32±3.17	21.61±1.58	22.50±1.14

病率约为75%,已成为发达国家成年人失明最主要的原因^[8,9]。DR在我国的发病率也极高,最新发布的《中国2型糖尿病防治指南》就明确指出,DR在我国已经成为成年人致盲的首要因素。DR的高发病率和高致盲率增加患者心理及生理负担。神经病变为微血管病变之外参与DR的重要原因。因此,有效预防和治疗DR神经病变亦尤为重要。

NRG-1为一类具有神经保护作用的细胞间信号转导蛋白,通过与其酪氨酸激酶受体ErbB结合激活一系列下游信号通路,对神经系统的正常发育和成熟起重要作用^[10,11]。NRG-1能促进神经元的存活、迁移和突触的发育。有研究发现,局灶性脑缺血大鼠模型中给予NRG-1治疗可发挥强大的神经保护作用,可有效减少神经元死亡数目^[5]。尽早使用外源性NRG-1,可有效防止视神经损伤大鼠模型中神经元损伤,对于损伤后神经再生、神经功能的恢复大有益处^[6]。RGC为轴突组成的主要成分,其损伤为DR的主要机制之一。最近研究发现,DR早期患者RGC凋亡增加,导致渐进性视网膜神经元丢失^[12]。因此,保护受损的RGC尤为重要。本研究发现,DR状态的RGC密度明显降低,应用NRG-1后,RGC密度明显升高,提示NRG-1对DR状态下受损的RGC具有保护作用。

Müller细胞占视网膜胶质细胞的90%左右,在视网膜贯穿全层。Müller细胞具有支持及营养神经元的作用,Müller细胞结构和功能异常与DR发病关系密切^[13]。

(下转第556页)

要。预防感染、康复训练、加强营养支持及关注进食问题对痴呆患者的预后有积极的影响。

参考文献

[1] 盛树力. 老年性痴呆及相关疾病[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2006.

[2] 邢霞, 皮红英, 郭晓菊. 颅内破裂动脉瘤术前再出血风险预测模型研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2017, 12: 407-409.

[3] 吴晓光, 汤哲, 方向华, 等. 健康指标对老年人发生死亡预测价值的前瞻性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25: 325-328.

[4] Mitchell SL, Teno JM, Kiely DK, et al. The Clinical Course of Advanced Dementia [J]. N Engl J Med, 2010, 362: 364-365.

[5] 王婷婷, 曹诚, 邓境, 等. 重庆市老年人轻度认知障碍的流行率及其影响因素[J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23: 833-838.

[6] 王丹. 合肥市养老机构老年性痴呆流行病学调查[J]. 健康前沿, 2017, 26: 225-225.

[7] 贺文文. 老年阿尔茨海默病患者发生误吸/窒息的相关因素分析[J]. 中华全科医学, 2017, 15: 708-711.

[8] 钟华, 李建华, 沈鑫华. 阿尔茨海默病行为和精神症状及相关因素研

究[J].上海精神医学, 2009, 21: 172-175.

[9] 季敏, 姚新伟, 吕军, 等. 上海市老年期痴呆患病现状研究[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16: 513-515.

[10] 奚巍. 87例老年期痴呆住院患者死亡分析[J]. 临床精神医学杂志, 2003, 13: 204-205.

[11] 崔华, 范利, 张梦, 等. 住院老年高血压患者死亡相关因素的分析[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30: 64-68.

[12] Prince, Martin, Bryce, Renata, Albanese, Ribeiro: The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis [J]. Alzheimers Dementia, 2013, 9: 63-75.e62.

[13] Kivipelto M, Ngandu T, Laatikainen T, et al. Risk score for the prediction of dementia risk in 20 years among middle aged people: a longitudinal, population-based study [J]. Lancet Neurol, 2006, 5: 735-741.

[14] Exalto LG, Quesenberry CP, Deborah B, et al. Midlife risk score for the prediction of dementia four decades later [J]. Alzheimers Dementia, 2014, 10: 562-570.

[15] 廖雄. 基于人工神经网络模型的城市社区老年性痴呆预测研究[D]. 南昌大学, 2016.

[16] 陈生弟, 邓钰蕾. 阿尔茨海默病临床诊治中的若干热点及挑战[J]. 老年医学与保健, 2012, 18: 65-67.

(本文编辑:王晶)

(上接第546页)

GFAP是胶质细胞特有的标志性蛋白,特异性表达于胶质细胞,但Müller细胞几乎不表达GFAP,仅当Müller细胞结构和功能异常时可见GFAP表达^[14]。本研究发现,正常情况下仅在视网膜的神经节细胞层中有少量的GFAP蛋白表达,但DR状态下视网膜不仅神经节细胞层GFAP表达明显增加,而且免疫荧光观察到视网膜GFAP阳性染色纤维分布空间范围广泛,几乎贯穿视网膜神经组织全层,其分布范围与Müller细胞空间位置相同。应用NRG-1后可见DM大鼠视网膜内GFAP表达明显减少,同时伴随RGC密度的增加。这提示NRG-1可能通过有效抑制DR状态下视网膜胶质细胞活化,保护受损的RGC。MAP-2主要在神经元细胞体及树突表达,可参与神经元发育、突起形成及突触可塑性调节^[15]。本研究发现,DR状态的MAP-2表达明显降低,应用NRG-1后,MAP-2表达明显升高,提示NRG-1对DR状态下神经元生长发育具有调节作用。

综上所述,本研究发现NRG-1可通过抑制DR状态下视网膜胶质细胞活化,上调视网膜MAP-2表达,恢复视网膜RGC密度,提示NRG-1对早期DM大鼠视网膜病变神经损伤具有保护作用,这对研究DR的治疗策略提供了新的方向。但因DR发病机制复杂,NRG-1对DR的作用可能涉及众多途径,因此NRG-1对DR的影响及机制仍待深入探讨。

参考文献

[1] Mozetic V, Freitas CG, Riera R. Statins and Fibrates for Diabetic Retinopathy: Protocol for a Systematic Review [J]. Jmir Res Protoc, 2017, 6: e30.

[2] Altmann C, Schmidt M. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy: Inflammation, Microvasculature Defects and Neurodegeneration[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 110.

[3] 吴庆峰, 孙维佳, 庄晓琳, 等. 2型糖尿病视网膜血管改变研究[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27: 94-98.

[4] 杨雄里. 神经生长因子研究方兴未艾[J]. 神经损伤与功能重建, 2013, 8: 391-391.

[5] Li Y, Xu Z, Ford GD, et al. Neuroprotection by Neuregulin-1 in a Rat Model of Permanent Focal Cerebral Ischemia [J]. Brain Res, 2007, 1184: 277-283.

[6] 冯灵美, 蔡季平, 魏锐利. Neuregulin-1对大鼠急性视神经损伤的保护作用研究[J]. 中国实用眼科杂志, 2010, 28: 789-793.

[7] Gu N, Ge K, Hao C, et al. Neuregulin1β Effects on Brain Tissue via ERK5-Dependent MAPK Pathway in a Rat Model of Cerebral Ischemia – Reperfusion Injury [J]. J Mol Neurosci, 2017, 61: 607-616.

[8] Ting DS, Cheung GC, Wong TY. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2016, 44: 260-277.

[9] Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy [J]. Diabetes Care, 2012, 35: 556-564.

[10] Simmons LJ, Surles-Zeigler MC, Li Y, et al. Regulation of inflammatory responses by neuregulin-1 in brain ischemia and microglial cells in vitro involves the NF-kappa B pathway [J]. J Neuroinflamm, 2016, 13: 237.

[11] Andre K, Kampman O, Viikki M, et al. BDNF and NRG1 polymorphisms and temperament in selective serotonin reuptake inhibitor-treated patients with major depression[J]. Acta Neuropsychiatrica, 2018, 30: 1-7.

[12] Ng DS, Chiang PP, Tan G, et al. Retinal Ganglion Cell Neuronal Damage in Diabetes and Diabetic Retinopathy [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2016, 44: 243-250.

[13] Chohan A, Singh U, Kumar A, et al. Müller stem cell dependent retinal regeneration [J]. Clin Chim Acta, 2017, 464: 160-164.

[14] Martinez-De Luna RI, Ku RY, Aruck AM, et al. Müller glia reactivity follows retinal injury despite the absence of the glial fibrillary acidic protein gene in Xenopus.[J]. Dev Biol, 2016, 426: 219-235.

[15] Papa L, Robicsek SA, Brophy GM, et al. Temporal Profile of Microtubule Associated Protein (MAP-2) - A Novel Indicator of Diffuse Brain Injury Severity and Early Mortality after Brain Trauma.[J]. J Neurotraum, 2017, 35: 32-40.

(本文编辑:王晶)