

Caspase-3 在形觉剥夺性弱视大鼠大脑视皮层的表达

曾亚薇, 何湘珍, 王 智

作者单位: (421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院眼科

作者简介: 曾亚薇, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障、青光眼。
通讯作者: 何湘珍, 女, 教授, 主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼。 Yawei25@yeah.net

收稿日期: 2012-07-16 修回日期: 2012-10-15

Expressions of caspase-3 in visual cortex of form deprivation amblyopia rats

Ya-Wei Zeng, Xiang-Zhen He, Zhi Wang

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Xiang-Zhen He. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. Yawei25@yeah.net
Received: 2012-07-16 Accepted: 2012-10-15

Abstract

• AIM: To investigate the expressions and significance of apoptosis relevant factor caspase-3 in visual cortex area 17 of form deprivation amblyopia rats.

• METHODS: Form deprivation amblyopia rats models were established, the morphological changes of visual cortex area 17 in 10 normal rats and 10 form deprivation amblyopia rats were stained with HE and observed HE staining, processed by immunohistochemical staining and image analysis system to demonstrate and analyze the localization of caspase-3 in area 17.

• RESULTS: At various levels of the form deprivation amblyopia rats and normal rats, there were lots of caspase-3 immunoreactive neurons in visual cortex area 17, especially II-IV layer. The number and grey level of caspase-3 immunopositivity increased greatly than normal rats ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Caspase-3 in visual cortex area 17 of form deprivation amblyopia rats has increased expression, which may be involved in the development of amblyopia.

• KEYWORDS: caspase-3; form deprivation amblyopia; rat; visual cortex

Citation: Zeng YW, He XZ, Wang Z. Expressions of caspase-3 in visual cortex of form deprivation amblyopia rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(11):2069-2071

摘要

目的: 检测凋亡相关因子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase-3) 在形觉剥夺性弱视大鼠大脑视皮层中的表达及意义。

方法: 建立形觉剥夺性弱视大鼠模型, 对 10 只正常大鼠和

10 只单眼形觉剥夺性弱视大鼠大脑视皮层 17 区进行 HE 染色观察形态学变化, 采用免疫组化法以及图像分析系统对 Caspase-3 免疫阳性神经元进行定位观察并定量研究其变化。

结果: 正常大鼠和单眼形觉剥夺性弱视大鼠视皮层 17 区各层次均可见 Caspase-3 免疫阳性神经元存在, 而以 II~IV 层较多。与正常大鼠相比, Caspase-3 在单眼剥夺性弱视大鼠组视皮层 17 区 II~IV 层的表达比正常组明显增多, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: Caspase-3 在单眼剥夺性弱视大鼠大脑视皮层 17 区表达升高, 可能参与弱视的发生、发展过程。

关键词: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; 形觉剥夺性弱视; 大鼠; 视皮层

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.11.07

引用: 曾亚薇, 何湘珍, 王智. Caspase-3 在形觉剥夺性弱视大鼠大脑视皮层的表达. *国际眼科杂志* 2012;12(11):2069-2071

0 引言

弱视是视觉发育性疾病, 是小儿视觉发育期由于单眼斜视、未矫正的屈光参差和高度屈光不正以及形觉剥夺引起的单眼最佳矫正视力低于相应的年龄视力, 或双眼视力表视力相差两行及以上, 为儿童较为常见的眼病^[1]。我国弱视的患病率为 4%。目前普遍认为弱视是一种从视网膜节细胞至视中枢的视觉传导系统及中枢全领域的功能及形态学异常引起的临床症候群^[2]。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 广泛分布于各种不同类型的细胞中, 是凋亡过程中最重要的蛋白酶, 处于凋亡级联反应通路的核心位置^[3]。Caspase 是一种证实细胞通过凋亡途径死亡的可靠方法, 甚至在形态改变出现之前。研究发现, Caspase-3 参与了脑缺血后神经元损伤的病理过程^[4]。研究表明, 视神经损伤后视网膜神经节细胞 (RGCs) 数目减少是其视功能下降的重要病理基础, 凋亡是 RGCs 的死亡机制之一, Caspase-3 在 RGCs 凋亡发生中起重要作用^[5]。目前尚无 Caspase-3 与弱视视皮层相关的研究, 因此在本实验中, 我们采用 HE 染色方法和免疫组织化学染色方法, 研究 Caspase-3 在单眼形觉剥夺性弱视大鼠和正常大鼠视皮层 17 区表达情况及分布变化, 从而探讨细胞凋亡与弱视发病机制的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 刚出生的 SPF 级 SD 大鼠 20 只, 雌雄不限, 均购自南华大学动物实验中心; 眼科手术器械包 (苏州医厂疗器械); 多功能电生理诊断仪 (美国 Nicolet); 兔抗大鼠 Caspase-3 多克隆抗体、羊抗兔 IgG 二抗、抗体稀释液、SP 试剂盒、DAB 染色试剂盒、多聚赖氨酸载玻片、PBS 缓冲液、0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液 (武汉博士德生物工程有限公司); 10% 水合氯醛 (南华大学附属第二医院); 4% 多聚甲醛 (自配); 石蜡切片机、电热恒温水槽、电烤箱 (LELCA, 德国); 显微镜、Olympus 摄像系统 (Olympus, 日本)。

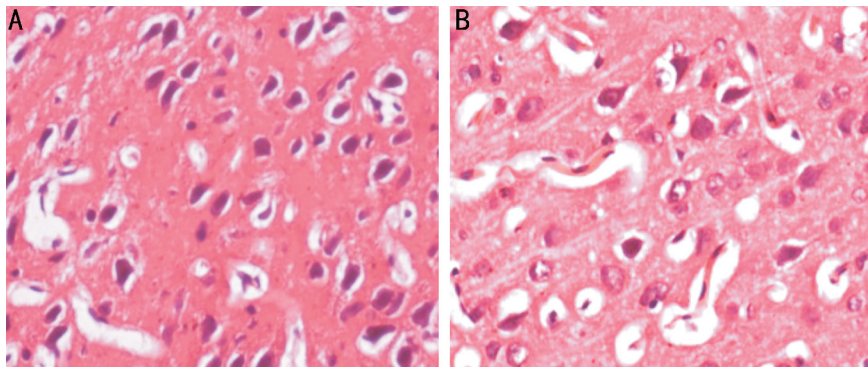


图1 两组大鼠视皮层神经元的形态变化(HE×400) A:正常组;B:形觉剥夺组。

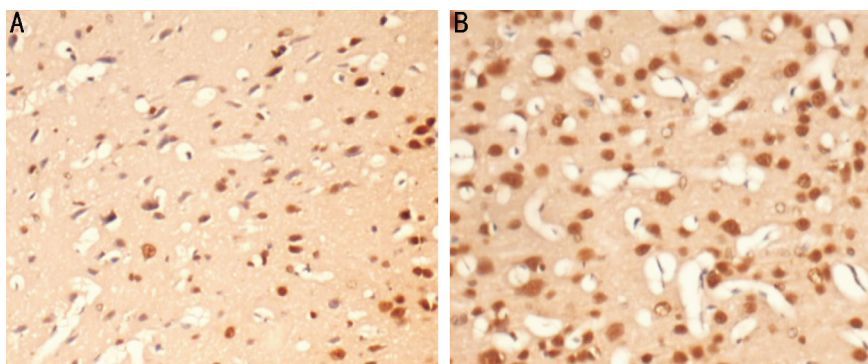


图2 两组大鼠视皮层中 Caspase-3 的表达(SABC×200) A:正常组;B:形觉剥夺组。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 取刚出生 SPF 级 SD 大鼠 20 只,雌雄不限,以大鼠视觉发育关键期始于生后 14d 到 45d 终止做为分组依据,将 SD 大鼠饲养至 14d,随机选择 10 只行单侧眼睑缝合术组成单眼形觉剥夺(MD)组,剩余 10 只不做特殊处理为正常(N)组。

1.2.2 形觉剥夺大鼠动物模型的建立和饲养 将大鼠于生后 14d 行右眼形觉剥夺,剪除右眼上、下眼睑睑缘各 1.5mm,用 6/0 可吸收缝线连续缝合上下眼睑,对齐创缘,创面涂少量红霉素眼膏。清醒后在正常光线条件下饲养。每天早、晚观察缝合眼是否有裂缝,如裂缝为晚间裂开者给予及时修补,否则不纳入实验。在上述条件下饲养至 45d,行图形视觉诱发电位(P-VEP)判断弱视是否建立成功。

1.2.3 实验动物的灌注和取材及固定 将生后 45d 的 N 组和 MD 组实验大鼠称体质量,麻醉,剪开右心室,用磨钝的针头经左心室(心尖稍偏左)穿刺至升主动脉内,快速灌注生理盐水冲洗心血管系统,再灌注 4% 多聚甲醛,灌流固定后断头,开颅取脑,根据《大鼠脑立体定位图谱》切取大鼠视皮层的脑组织^[6],置于 4% 多聚甲醛中固定 24~48h。

1.2.4 石蜡包埋和切片 将固定好的大鼠脑组织自来水冲洗 12h,行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,将包埋好的石蜡做连续冠状切片,厚度约 4 μ m,将其贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,烤箱中烤片 12~24h 后 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 HE 染色观察视皮层神经元胞体及突触的形态和分布 二甲苯及梯度乙醇脱蜡至水,苏木素染色 15min,清水冲洗 15min,1% 盐酸乙醇分化 2~3s,清水冲洗 5min,伊红染色 5min,依次置于梯度乙醇、二甲苯中脱水透明,中性树胶封片,在 Olympus 显微镜下,观察视皮层神经元胞体及突触的形态和分布。

1.2.6 免疫组化检测大鼠大脑视皮层中 Caspase-3 的表达 二甲苯及梯度乙醇脱蜡至水,热抗原修复,灭活内

源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭抑制背景着色,滴加兔抗大鼠 Caspase-3 多克隆抗体(1:200 稀释),滴加生物素化羊抗兔 IgG 二抗,滴加试剂 SABC, DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,中性树胶封片。应用 Olympus 显微摄像系统在统一的光强度和放大倍数下采集图像,对图像中 Caspase-3 免疫阳性神经元进行扫描,测量出每张标本视野内的 Caspase-3 免疫阳性神经元细胞数和灰度值。

统计学分析:统计数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行处理,单眼形觉剥夺组与正常组间采用成组设计的 *t* 检验,同组的不同层次之间采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠视皮层神经元胞体及突触的形态和分布

正常组大鼠大脑视皮层 17 区神经元的结构正常,细胞轮廓清晰,可清晰地显示神经元的形态结构(图 1A),形觉剥夺组神经元细胞排列不整齐,胞膜结构不清,神经元变性,部分神经元细胞核固缩,呈强嗜碱性,胞浆深染,核浓缩,结构不清(图 1B)。

2.2 两组大鼠视皮层中 Caspase-3 的表达 正常大鼠组和单眼形觉剥夺弱视大鼠组视皮层 17 区各层次均可见 Caspase-3 免疫阳性神经元存在,而以 II~IV 层较多。Caspase-3 免疫阳性神经元染色后呈棕黄色,主要位于神经细胞浆内,阴性细胞为蓝色(图 2)。单眼形觉剥夺组视皮层 17 区 Caspase-3 免疫阳性神经元比正常大鼠组的平均细胞数和灰度值均增多(表 1,2)。其中, I, V, VI 层细胞数和灰度值差异无显著性意义($P>0.05$),而 II~IV 层两者之间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

细胞凋亡是在细胞受到内、外信号刺激时发生的一系列级联激活的主动性细胞死亡过程。在细胞凋亡的发生过程中, Caspase 的激活发挥决定性作用,而 Caspase-3 作

表1 大鼠视皮层 17 区 Caspase-3 免疫阳性神经元细胞计数 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	I 层	II 层	III 层	IV 层	V 层	VI 层
形觉剥夺组	97.43±7.32	118.75±6.52	125.23±8.21	139.54±4.26	101.35±6.38	98.86±5.29
正常组	95.34±6.21	97.83±8.24	105.65±7.47	110.65±6.85	96.59±7.86	94.58±6.79

表2 大鼠视皮层 17 区 Caspase-3 免疫阳性神经元细胞灰度值 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	I 层	II 层	III 层	IV 层	V 层	VI 层
形觉剥夺组	102.56±5.96	138.65±6.38	149.59±8.55	153.76±9.87	105.78±6.85	101.63±9.58
正常组	96.56±7.63	108.98±8.86	109.56±8.69	116.65±9.52	97.52±6.89	98.25±7.69

为 Caspases 级联反应中一种公共的下游效应分子而备受关注^[7],一旦被激活,则细胞凋亡不可逆转,因而被称为死亡蛋白酶。正常情况下,Caspase-3 通常以无活性蛋白酶原的形式存在于哺乳动物多种组织和细胞内,相对分子质量为 32000,在凋亡的执行阶段,Caspase-3 酶原由于其 Asp28-Ser29 和 Asp175-Ser176 两个酶切位点受切割被激活,而降解成相对分子质量为 17000 和 12000 的两个活性亚单位,形成异源二聚体,活化的 Caspase-3 特异性地切割 DNA,使参与 DNA 损伤修复过程的聚 ADP 核糖聚合酶,以及 DNA 依赖的蛋白激酶等失活,促使染色质浓缩和核酸酶激活,导致细胞凋亡^[8,9]。在本研究中,我们发现正常大鼠组和单眼形觉剥夺弱视大鼠组视皮层 17 区各层次均可见 Caspase-3 免疫阳性神经元存在,而以 II~IV 层较多。Caspase-3 免疫阳性神经元染色后呈棕黄色,主要位于神经细胞浆内,阴性细胞为蓝色。

细胞凋亡受多种蛋白分子调控,其中 Caspase-3 和 Bcl-2 的高低是细胞是否发生凋亡的决定性因素。Zhou 等^[10]研究敏感期内单眼剥夺大鼠视觉系统视网膜节细胞层、外侧膝状体 A1 层和视皮质 17 区 IV 层 Bcl-2 表达均降低,当敏感期内长期形觉剥夺使剥夺眼所支配的视觉系统神经元在与对侧眼占据突触位点竞争中处于劣势,Bcl-2 mRNA 表达低下,并对 Bcl-2 的调节介导作用不敏感,以致得不到靶源性竞争分泌 NTs,使其产生退变-弱视效应。提示 Bcl-2 在视觉系统的作用可能是弱视发生的分子生物学基础之一。

Caspase 特异性抑制剂 DEVD-CHO、YVAD-CHO 等均为竞争性抑制剂,是根据 Caspase 所识别的底物四肽序列特异性所设计的。它们通常能延缓与 Caspase 相关的凋亡进程,但不能阻止凋亡的发生。Liu 等^[11]用眼睑缝合合法建立鸡的近视眼模型,模型眼成功建立后屈光度加深、眼球外径增大、出现漆裂纹样眼底改变,并在模型眼视网膜内、外核层发现凋亡细胞,凋亡率高于对照眼,且视网膜 Caspase-3 蛋白及活性均增高。玻璃体内注射 Caspase-3 的抑制剂 Ac-DEVD-CHO 后,模型眼视网膜细胞的凋亡率和 Caspase-3 蛋白及其活性均减少,而且 Ac-DEVD-CHO 抑制视网膜细胞凋亡的作用随剂量的加大而增强。Nucci 等^[12]观察在视觉系统发育可塑期中,形觉剥夺会导致视网膜终端在外侧膝状体核释放过多的谷氨酸,从而使一氧化氮浓度升高,形成 DNA 片段。后者是众所周知的激活聚 ADP 核糖聚合酶,从而反过来引发细胞凋亡。此研究发现形觉剥夺诱导的新生大鼠外侧膝状体存在细胞凋亡。在视觉发育可塑期内异常的视觉经验导致的主要是功能和形态的改变。弱视电生理和形态学研究结果表明,弱视的发生与视觉系统神经元形态和功能改变有关。在本研究中,我们发现正常大鼠和单眼形觉剥夺弱视大鼠视皮层

17 区均可见 Caspase-3 免疫阳性神经元存在,单眼形觉剥夺组视皮层 17 区 Caspase-3 免疫阳性神经元的平均细胞数和灰度值均比正常大鼠组增多,且在 II~IV 层中两者之间差异具有显著性意义($P<0.05$)。

Caspase-3 活化后大致通过 3 种机制使细胞发生解体^[13]:(1)对凋亡抑制因子进行灭活,如核酸内切酶抑制剂(I-CAD/DFF45),Bcl-2,IkB 等;(2)酶解细胞外基质及骨架蛋白,如局部粘连蛋白(FAK)、肌动蛋白、P21 依赖性激酶(PAK2)和层连蛋白等;(3)裂解 DNA 修复相关分子,如聚 ADP 核糖多聚酶(PARP)、DNA 依赖性蛋白激酶等。这些底物被酶解失活后细胞的功能和形态发生变化,表现为细胞固缩、线粒体肿胀,同时染色质聚集、核碎裂,最后细胞分裂为完整而分散的膜结合小体,即凋亡小体,导致凋亡的典型形态学改变。然而,Caspase-3 在弱视形成中到底是通过何种机制使细胞发生凋亡,以及参与弱视发生的具体机制如何还有待进一步的研究。

参考文献

- 薛峰. 诊断弱视要依照“新定义”. 医药前沿 2011;3:64
- Wiesel TN, Hubel DH. Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *Neurophysiol* 1965;28(6):1029-1040
- Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS. What are caspases-3 and 7 doing upstream of the mitochondria. *Cancer Biol Ther* 2006;5(7):763-765
- Chaitanya GV, Babu PP. Activation of calpain, cathepsin - b and caspase - 3 during transient focal cerebral ischemia in rat model. *Neurochem Res* 2008;33(11):2178
- 吕瀛娟,赵秀兰,王世忠,等. 大鼠外伤性视神经损伤后 P53、Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达. 天津医药 2010;38(11):996-998
- Paxinos G, Watson(著),诸葛启钊(译). 大鼠脑立体定位图谱. 北京:人民出版社 2005:109-112
- Lockshin RA. Programmed cell death: history and future of a concept. *J Soc Biol* 2005;199(3):169-173
- Visconti R, DAdamo L. Functional cloning of genes regulating apoptosis in neuronal cells. *Methods Mol Biol* 2007;399:125-131
- Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress - induced apoptosis. *Methods Mol Biol* 2008;414:13-21
- Zhou F, Qiu LX, Liu CM. Expression of the apoptosis inhibitory gene Bcl-2 in the neurons of visual system in monocularly deprived rats. *Chin Ophthal Res* 2005;23(1):26-29
- Liu SZ, Mao JF, Wen D, et al. The treatment of retinal apoptosis by Caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO in experimental myopia. *Zhonghua Yanke Zazhi* 2005;41(5):428-433
- Nucci C, Piccirilli S, Nisticò R, et al. Apoptosis in the mechanisms of neuronal plasticity in the developing visual system. *Eur J Ophthalmol* 2003;13(Suppl 3):S36-43
- Thornberry NA, Lazebnik YL. Caspase: Enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316