

小窝蛋白-1 对视网膜功能的影响

刘 洋¹, 徐洪涛¹, 李小曼²

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30801135)

作者单位:¹(110001)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学病理教研室;²(110001)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学转化医学研究所

作者简介:刘洋,男,博士,主治医师,研究方向:眼肿瘤学、视网膜病。

通讯作者:李小曼,女,博士,研究方向:视网膜病、葡萄膜炎。
disneyer@hotmail.com

收稿日期:2012-09-25 修回日期:2012-12-13

Impact of caveolin-1 on retinal function

Yang Liu¹, Hong-Tao Xu¹, Xiao-Man Li²

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30801135)

¹Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; ²Key Laboratory of Medical Cell Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiao-Man Li. Key Laboratory of Medical Cell Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. disneyer@hotmail.com

Received:2012-09-25 Accepted:2012-12-13

Abstract

• AIM: To investigate the role of caveolin-1 (Cav-1) in the retina by examining the ocular function in Cav-1 null mice.

• METHODS: The expression of Cav-1 was examined by immunofluorescence combined with confocal microscopy. Retinal structure in wild type (WT) and Cav-1 null mice was examined by HE staining. *In vivo* retinal function in WT and Cav-1 null mice was assessed by full-field scotopic electroretinography (ERG) following overnight dark adaptation.

• RESULTS: Cav-1 null mice displayed reduced a-wave and b-wave amplitudes and reduced sensitivity as measured by ERG. However, the general structure of Cav^{-/-} retina was largely normal. Collectively, this implies the impairment of retinal function in Cav^{-/-} retina was not intrinsic to photoreceptor.

• CONCLUSION: The observation that Cav-1 null mice show abnormal retinal function, *in vivo* but normal photoreceptor structure suggests that the retinal microenvironment rather than the photoreceptor itself is

impaired. These may result in a disturbance in retinal pH, water or ion homeostasis therefore altering the subretinal milieu.

• KEYWORDS: caveolin-1; retina; electroretinography

Citation: Liu Y, Xu HT, Li XM. Impact of caveolin-1 on retinal function. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(1):30-33

摘要

目的:以小窝蛋白-1(Caveolin-1, Cav-1)全缺陷鼠为模型,深入研究 Cav-1 在视网膜中的功能。

方法:通过免疫荧光及共聚焦显微镜的方法检验 Cav-1 在野生鼠视网膜中的表达;通过 HE 染色的方法检测野生型(wild type, WT)和 Cav-1 敲除小鼠视网膜的形态及结构;应用视网膜电流图的方法检测 WT 和 Cav-1 敲除小鼠视网膜的功能。

结果: Cav-1 在视网膜的多种细胞中都有表达,在 Müller 细胞、视网膜血管和 RPE 中的表达尤为强烈。视网膜电流图表明, Cav-1 敲除小鼠 a 波与 b 波均较 WT 鼠低,但 HE 染色显示其视网膜形态和结构没有明显异常。

结论: Cav-1 缺陷小鼠表现出光感反应降低,但视网膜形态和结构均正常,提示 Cav-1 缺陷鼠视力下降并不源于光感受器细胞的功能缺陷,而是由于视网膜下微环境改变所致。

关键词:小窝蛋白-1;视网膜;视网膜电图

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.05

引用:刘洋,徐洪涛,李小曼.小窝蛋白-1对视网膜功能的影响.国际眼科杂志 2013;13(1):30-33

0 引言

小窝是直径为 50~100nm 的内陷囊泡,介导非网格蛋白依赖的内吞作用(clathrin-independent endocytosis)^[1]并参与各种信号转导。21~24kDa 的膜蛋白 Caveolin 为小窝的主要结构单元^[2]。目前,人们发现了 3 种小窝蛋白,其中包括 Cav-1, Cav-2 和 Cav-3^[2-4]。Cav-1 可与其中的很多分子(如一氧化氮合酶和 ERK 等)结合并负调控其功能^[5,6]。Cav-1 的缺失会导致小窝丧失、微血管通透性增强及脂质代谢改变等^[7]。最近有报道表明, Cav-1 与糖尿病性视网膜病变^[8]和葡萄膜炎视网膜发炎^[9]有关。此外, Cav-1 的移码突变导致一种与罕见的先天性脂肪代谢障碍有关严重的色素性视网膜炎的发生^[10], Cav-1 基因与原发开角型青光眼的发生也有密切的联系^[11]。Cav-1 表达于多种视网膜细胞,其中包括光感受

器细胞、视网膜血管内皮细胞、Müller 细胞、视网膜色素上皮细胞和视网膜血管内皮细胞^[12]。应用梯度离心分离的方法,人们发现 Cav-1 与多个光传导蛋白质共沉降,其中包括视转导蛋白(transducin)、RGS-9、鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase)、视紫红质蛋白激酶(rhodopsin kinase)和环核苷酸门控通道(cyclic nucleotide-gated channel)。

这里,我们以 Cav-1 全缺陷小鼠为模型,深入研究了 Cav-1 的缺失对视网膜结构和功能上的影响。我们的研究表明,Cav-1 缺陷小鼠表现出光感反应降低,但视网膜形态和结构均正常,提示 Cav-1 缺陷鼠视力下降并不源于光感受器细胞的功能缺陷,而是由于视网膜下微环境改变所致。

1 材料和方法

1.1 材料

野生型(wild type, WT)与 Cav^{-/-}小鼠均来自 Jackson lab(Bar Harbor, Maine, 美国)。主要试剂:兔多克隆抗 Cav-1 抗体来自 BD Bioscience 公司(San Jose, CA, 美国),鼠单克隆抗 Glutamine synthetase 抗体来自 DAKO 公司(Carpinteria, CA, 美国),Alexa Fluor-488 或 Alexa Fluor-594 结合的二抗购于 Life Technologies 公司(Grand Island, NY, 美国),DAPI 购于 Sigma(St. Louis, MO, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光和共聚焦显微镜检测 Cav-1 在 WT 小鼠视网膜中的表达

将 2 月龄的 WT 及 Cav-1 敲除鼠用二氧化碳处死,取出眼睛,将眼杯放入 4% 福尔马林溶液中固定 30min,之后分别将其置入 10% 和 20% 蔗糖(sucrose)中直至其沉降,最后将其置入 30% 蔗糖中沉降过夜。第 2d,将组织放入 OCT 溶液中并低温包埋,将包埋的组织制备为 8~15 μ m 的冰冻切片。检测蛋白表达时,将切片在室温下用 10% 正常马血清封闭 1h,然后以兔多克隆抗 Cav-1 抗体(1:400)或鼠单克隆抗 Glutamine synthetase(1:1000)孵育,PBS 洗 3 遍,再用 Alexa Fluor-488 或 Alexa Fluor-594 结合的二抗染色,PBS 洗 3 遍,DAPI 复染,PBS 洗 3 遍,然后在 Olympus Fluoview FV500 共聚焦显微镜下观察。

1.2.2 视网膜电流图检查 WT 和 Cav-1 敲除小鼠视网膜的功能

视网膜电流图(electroretinogram, ERG)检查所采用的刺激光源为 GF LED 型;采用标准闪光刺激:3.00cds/m²,白色刺激光持续时间为 10 μ s,通频带 0.2~300Hz,单次反应;振荡电位叠加 3 次,间隔 15s。暗适应 3h 后,将 8 周龄小鼠在弱红灯下应用腹腔注射氯胺酮(80mg/kg)及甲苯噻嗪(5mg/kg)麻醉,再用 0.5% 阿托品及 2.5% 苯肾上腺素对小鼠进行瞳孔散大,采用美国 Colordome Espion 视网膜电流记录系统(Diagnosys, Lowell, MA)检测视网膜的功能。角膜中央、嘴部、尾部分别安置记录电极、参考电极及接地电极。杆细胞反应光强呈 0.3 log 步递增,记录暗适应最大反应的 a, b 波振幅。

1.2.3 HE 染色检测 WT 和 Cav-1 敲除小鼠视网膜的形态及结构

分别将 2 月龄及 20 月龄的 WT 及 Cav^{-/-}小鼠用二氧化碳处死,取出眼睛,置入 10% 福尔马林溶液

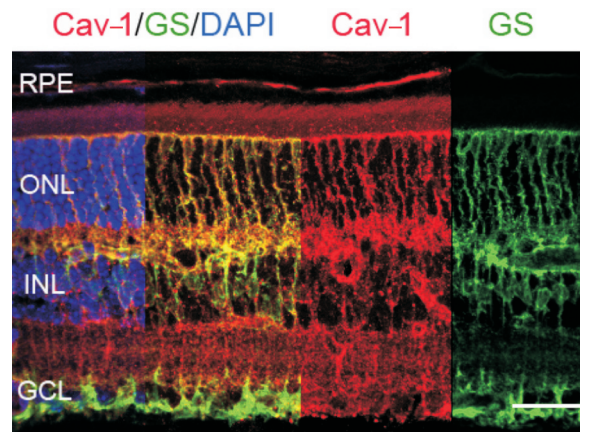


图 1 Cav-1 蛋白在视网膜中的表达 绝大部分 Cav-1(红色荧光)与 Müller 细胞标记物 GS(Glutamine synthetase, 绿色荧光)共定位,DAPI 核复染呈明蓝色($\times 400$, 标尺:50 μ m)。

中固定,常规乙醇脱水,石蜡包埋,作经线方向的垂直切片,5 μ m 厚切片用于 HE 染色。HE 染色前,将切片在 70 $^{\circ}$ C 烤箱中烘烤 4h,然后经过二甲苯(I)15min、二甲苯(II)15min、1000mL/L 乙醇 5min、950mL/L 乙醇 2min、850mL/L 乙醇 2min 及 750mL/L 乙醇 1min 使切片脱蜡水化。随后经苏木素 5min、蒸馏水过洗 1~2s、盐酸酒精分化、0.5% 伊红液染色 1~3min、蒸馏水稍洗 1~2s、750mL/L 乙醇 1min、850mL/L 乙醇 2min、950mL/L 乙醇 2min、无水乙醇(I)5min、无水乙醇(II)5min、二甲苯(I)15min 及二甲苯(II)15min 后,以中性树胶封固。切片 HE 染色后,使用尼康 E800 数字成像系统成像(Nikon, Tokyo, 日本)。分别在距视神经乳头 0.25, 0.75, 1.25, 1.75 μ m 处测量 ONL 的厚度,使用美国国立卫生研究所 Wayne Rasband 研发的 Image J 1.32j 软件进行分析。分别测量双眼的 ONL 值后取平均值。

统计学分析:实验数据均以均数 \pm 标准差表示,所有数据均采用 SPSS 12.0 for Windows 软件包进行单因素方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cav-1 在 WT 小鼠视网膜中的表达

Cav-1 在视网膜的多种细胞中都有表达,在 Müller 细胞、视网膜血管和 RPE 中的表达尤为强烈(图 1)。在外视网膜区域(outer nuclear layer, ONL 和 outer plexiform layer, OPL), Cav-1 的表达较强,以共聚焦显微镜的分辨率不易分辨出检测到的 Cav-1 来自于 Müller 细胞还是光感受器细胞(photoreceptors)。Cav-1 的红色荧光与为 Müller 细胞的细胞标记物 GS(Glutamine synthetase)的绿色荧光染色有很大程度的重叠,表明视网膜中 Cav-1 主要表达于 Müller 细胞。

2.2 WT 和 Cav-1 敲除小鼠视网膜功能的检测

鉴于 Cav-1 在视网膜的表达位点及其与多种视传感细胞结合的特征,我们推测 Cav-1 可能会影响视网膜的功能。通过 ERG 的方法,我们发现在不同光强度的刺激下,Cav-1 缺陷小鼠的光感反应(a 波及 b 波)均较野生鼠有所下降(图 2A, B)。分析表明,野生鼠中 a 波的最大值为 373.0 \pm 71.56 μ V,而在 Cav-1 缺陷鼠中只有 159.8 \pm 57.62 μ V,两者

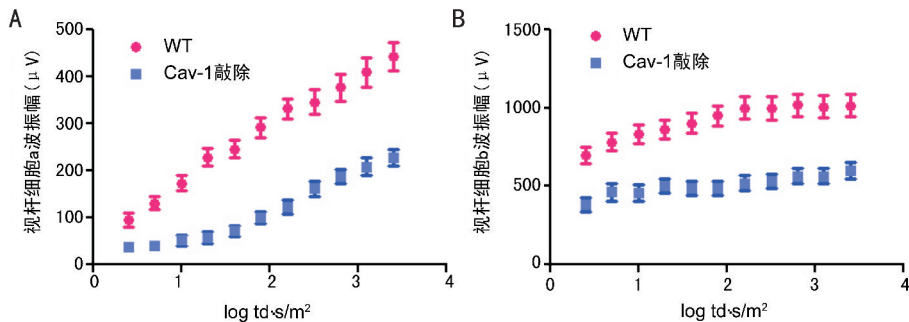


图2 WT和Cav-1^{-/-}小鼠视网膜电图 A:a波;B:b波。

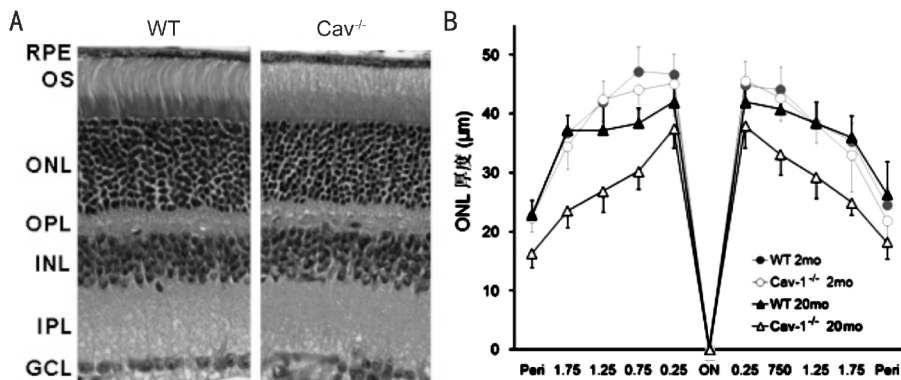


图3 WT和Cav-1^{-/-}小鼠的视网膜结构和ONL厚度 A:视网膜结构;B:ONL厚度。

比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。这些结果提示 Cav-1 缺陷鼠存在视传导障碍。

2.3 WT 和 Cav-1 敲除小鼠视网膜的形态及结构变化

基于 Cav-1 敲除鼠中观察到的 ERG 的表型,我们推测 Cav-1 敲除鼠视网膜形态结构发生了变化。通过 HE 染色的方法,我们发现 Cav-1 缺陷鼠与对照小鼠在视网膜形态上没有明显的差别(图 3A)。通过视网膜形态计量分析,我们发现 8 月龄和 20 月龄小鼠的 ONL 厚度(一种检测光感受器细胞多少的方法,代表光感受器细胞外细胞核层),也没有明显的差别(图 3B)。这说明 Cav-1 缺陷鼠视网膜功能的缺失并不依赖其视网膜形态及光感受器细胞的数量改变。

3 讨论

我们发现 Cav-1 的缺陷所导致的视力受损与光感受器细胞的内在功能无关,却很可能源于视网膜与 RPE 微环境的改变。在发育过程中,Cav-1 表达于视网膜细胞,与视紫质(rhodopsin)共定位并且在视盘中也有表达^[13],因此我们首先推测 Cav-1 可以直接影响光感受器细胞的功能。然而,Cav-1 KO 小鼠的视网膜形态及光感受器细胞的数目均正常,表明光感受器细胞本身表达的 Cav-1 并不严重影响视传导或光感受器细胞外层的结构。由于视网膜的支持细胞(如 RPE 和 Müller 细胞等)会影响光感受器细胞所处的环境,进而间接地影响视网膜的功能,我们下一步会针对 Cav-1 对视网膜支持细胞的影响进行深入研究。与其它的光感受器细胞相比,Cav-1 在 Müller 细胞中的表达最高^[14],并且随着 Müller 细胞的成熟,Cav-1, aquaporin-4 和 Kir 4.1 都会随之增高^[15]。在 RPE 中,Cav-1 与 caveolae 处在面对光感受器细胞的 RPE 顶膜和面对脉络膜的 RPE 底膜^[16],Cav-1 在视网膜与脉络膜的表达都

很强烈(图 1)。Müller 和 RPE 细胞通过调节离子和水的转运活性来维护视网膜和 RPE 的环境,对视网膜微环境(如 pH, 离子或水平衡)的影响可以导致代谢障碍从而破坏视网膜的神经细胞活性。基因敲除 RPE 基底部的乳酸转运分子 MCT3(monocarboxylate transporter 3)会导致 ERG 结果降低,并且不会对视网膜的形态及神经细胞的数目造成影响。MCT3 的缺失会导致细胞外乳酸的聚集及视网膜下微环境 pH 的降低,敲除碳酸酐酶(carbonic anhydrase XIV)或阴离子交换蛋白(anion exchanger 3)也会抑制 ERG 信号,这也源于细胞外 pH 值的增加和 pCO₂ 的增加。

在视网膜中,调节 pH, 离子和液体平衡的主要分子是表达于 RPE 和 Müller 细胞中的 $\alpha 1$ 形式的 Na⁺/K⁺-ATPase 酶,Na⁺/K⁺-ATPase 酶的失调可以导致 pH, 液体和离子的失衡。在肾上皮细胞中,Cav-1 与 Na⁺/K⁺-ATPase 结合,并且 $\alpha 1$ 形式的 Na⁺/K⁺-ATPase 酶存在两个与 Cav-1 结合的保守序列。视网膜水肿的现象提示视网膜下环境的 ATPase 活性异常,这提示 Cav-1 缺陷鼠中小鼠视力的异常有可能由于 ATPase 的改变导致。

总的来说,我们的结果说明 Cav-1 在光感受器细胞中的缺失并不能解释其视网膜功能的缺陷。我们推测 RPE 或 Müller 细胞中 Cav-1 的缺陷可能影响了 Cav-1^{-/-}小鼠视网膜的功能。然而我们还不能完全排除视网膜血管中 Cav-1 的表达对视网膜功能的影响。目前我们正在构建 Cav-1 在 RPE 或 Müller 细胞的条件敲除小鼠,以进一步明确 Cav-1 在视网膜中的功能,这对探索众多与 Cav-1 相关的眼部疾病的发生发展机制以及更好地防治这些疾病都有重大的意义。

参考文献

1 Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, et al. Role of caveolae and

- caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 2004;84(4):1341-1379
- 2 Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, *et al.* Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992;68(4):673-682
- 3 Scherer PE, Okamoto T, Chun M, *et al.* Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(13):131-135
- 4 Song KS, Scherer PE, Tang Z. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 1996;271(25):15160-15165
- 5 Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996;271(46):29182-29190
- 6 Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, *et al.* Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation; implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(13):6448-6453
- 7 Schubert W, Frank PG, Woodman SE. Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem* 2002;277(42):40091-40098
- 8 Klaassen I, Hughes JM, Vogels IM, *et al.* Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Exp Eye Res* 2009;89(1):4-15
- 9 Hauck SM, Dietter J, Kramer RL, *et al.* Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(10):2292-2305
- 10 Cao H, Alston L, Ruschman J, *et al.* Heterozygous CAV1 frameshift mutations (MIM 601047) in patients with atypical partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis* 2008;7:3
- 11 Thorleifsson G, Walters GB, Hewitt AW. Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat Genet* 2010;42(10):906-909
- 12 Elliott MH, Fliesler SJ, Ghalayini AJ. Cholesterol-dependent association of caveolin-1 with the transducin alpha subunit in bovine photoreceptor rod outer segments: disruption by cyclodextrin and guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate). *Biochemistry* 2003;42(26):7892-7903
- 13 Corley SC, Albert AD. Assessment of bovine rod outer segment disk membrane heterogeneity utilizing flow cytometry. *Exp Eye Res* 2011;92(1):20-27
- 14 Roesch K, Jadhav AP, Trimarchi JM, *et al.* The transcriptome of retinal Muller glial cells. *J Comp Neurol* 2008;509(2):225-238
- 15 Nelson BR, Ueki Y, Reardon S, *et al.* Genome-wide analysis of Muller glial differentiation reveals a requirement for Notch signaling in postmitotic cells to maintain the glial fate. *PLoS One* 2011;6(8):e22817
- 16 Mora RC, Bonilha VL, Shin BC, *et al.* Bipolar assembly of caveolae in retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290(3):C832-843