

脑苷肌肽对视网膜变性小鼠发育过程的影响

杨永升¹, 王津津²

作者单位:¹(100040)中国北京市,中国中医科学院眼科医院;
²(100730)中国北京市,首都医科大学附属北京同仁医院 北京市眼科研究所

作者简介:杨永升,男,博士,副主任医师,研究方向:葡萄膜炎、眼底病。

通讯作者:杨永升. yysxy@yahoo.com.cn

收稿日期:2012-10-31 修回日期:2013-02-26

Effects of cattle encephalon glycoside and igitonin on developmental process of rds mice

Yong-Sheng Yang¹, Jin-Jin Wang²

¹Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China; ²Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Eye Institute of Ophthalmology, Beijing 100730, China

Correspondence to: Yong-Sheng Yang. Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China.

yysxy@yahoo.com.cn

Received:2012-10-31 Accepted:2013-02-26

Abstract

• AIM: To explore the protective effects of cattle encephalon glycoside and igitonin (CEGI) on developmental process of rds mice, investigate its function and effects on retinal degenerative diseases, and offer the basis on treating similar diseases.

• METHODS: The retinal pathologic and ultrastructure changes of rds mice treated by CEGI were observed by light and electron microscopy, and the apoptosis rates of photoreceptor cells were determined through TUNEL (tdt-mediated biotin-dUTP nick-end labeling) technique.

• RESULTS: Postnatal 14 days (P14) was the best stage of developmental process of rds mice. After 28-56 days, cell number on retinal outer nuclear layer and retinal inner layer reduced, and photoreceptor apoptosis increased gradually. What's more, electron microscopy showed apoptosis nuclear changes and disintegration of inner section and cilia. On 28 days and 56 days, CEGI groups showed thicker retinal cell layers and less apoptotic cells compared with the control group. There was no statistically significant difference in comparison. Nerve growth factor (NGF) had similarity function with CEGI.

• CONCLUSION: CEGI can promote growth and development of retinal cells, and have a protective effect on retinal degenerative process of rds mice.

• KEYWORDS: retinal degeneration; cattle encephalon glycoside and igitonin; rds mice; apoptosis; histopathology

Citation: Yang YS, Wang JJ. Effects of cattle encephalon glycoside and igitonin on developmental process of rds mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(3):452-455

摘要

目的:观察脑苷肌肽(CEGI)对视网膜变性模型(rds小鼠)发育过程的影响,旨在探求CEGI治疗视网膜变性类疾病的治疗效果,为临床用药提供客观依据和指导。

方法:采用组织病理学技术(光、电镜)和原位末端转移酶标记(TUNEL)方法观察脑苷肌肽腹腔给药干预后视网膜组织形态、超微结构、感光细胞凋亡的变化。

结果:生后14d(P14)是rds鼠视网膜发育最完善阶段,随后28~56d,视网膜外核层及内核层细胞层数逐渐减少,感光细胞凋亡细胞数逐渐增多,电镜观察有凋亡核变化以及内节和纤毛崩解。给予CEGI治疗后28d和56d,视网膜细胞层数较同日龄对照组增厚,凋亡细胞数减少,有统计学差异($P<0.05$)。神经生长因子(NGF)与CEGI作用相似。

结论:脑苷肌肽有促进视网膜细胞生长发育作用,对rds小鼠视网膜变性过程有一定的缓解作用。

关键词:视网膜变性;脑苷肌肽;rds小鼠;凋亡;组织病理学

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.03.08

引用:杨永升,王津津.脑苷肌肽对视网膜变性小鼠发育过程的影响.国际眼科杂志2013;13(3):452-455

0 引言

视网膜变性类疾病是一类严重威胁人类视觉健康的难治性致盲性眼病,对它的研究一直是眼科学界攻坚的重点,基因治疗、组织移植以及药物治疗是近年来主要的方法。药物治疗是最经济便捷、操作性强且最易被患者和家属接受的方法,其中促进感光细胞及视网膜神经细胞生长、抗细胞凋亡的药物开发是主要方向^[1]。脑苷肌肽(cattle encephalon glycoside and igitonin,CEGI)作为一种神经细胞及其它细胞生物合成的重要物质,对许多神经元损伤的疾病均有明显作用^[2],对体外培养视网膜感光细胞及神经节细胞的损伤修复过程也有保护作用^[3],因此进一步研究对视网膜变性模型动物rds小鼠发育过程的影响,全面了解该药在视网膜变性治疗中的作用有重要意义,也为临床用药提供客观依据和指导。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:遗传性视网膜变性的纯合突变动物模型rds小鼠(C3H-Prph²rd),雌雄兼用,无菌环境下

饲养,22℃~25℃,循环光照(8h/16h,光照/黑暗),由首都医科大学动物研究所提供。药品和主要试剂:脑苷肌肽注射液[由诺氏制药(吉林)有限公司提供原料药],浓度计数方法是以唾液酸浓度计算的神经节苷脂浓度;神经生长因子(nerve growth factor,NGF,购于Sigma公司);石蜡:蜡I熔点52℃~54℃,蜡II熔点60℃~62℃(首都医科大学药物研究所);苏木素-伊红(北京化学制剂公司);钼酸(Johnson Matthey公司);环氧丙烷(中国上海试剂厂);Epon812环氧树脂(SERVA公司);细胞凋亡原位检测试剂盒(武汉博士德公司)。主要仪器:动物解剖镜(ASZM II Cambridge);BH-2光学显微镜及照相装置(Olympus,日本);切片机HM325(MICROM,德国);超薄切片机(LEICA RM2145,德国);透射电镜(Philips EM208S,日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 rds 小鼠雌雄合笼共养,每只鼠笼 2 雌 1 雄,仔鼠出生 7d 后,被随机分配到 CEGI 组、NGF 组与对照组(根据随机数字表),每组 15 只小鼠。14d 后母鼠和仔鼠分笼饲养。治疗方案如下:CEGI 组:仔鼠出生 7d 后开始给予 CEGI 腹腔给药 50 μ L,给药剂量为 4 μ g/10g 体重,每天 1 次,直至处死为止。NGF 组:仔鼠出生 7d 后开始给予 NGF 腹腔给药 50 μ L,给药剂量为 32ng/10g 体重,每天 1 次,直至处死为止。对照组:仔鼠出生 7d 后开始给予无菌生理盐水腹腔注射 50 μ L。每天 1 次,直至处死为止。

1.2.2 取材 分别于仔鼠出生后 14d,28d 及 56d,采用颈椎脱臼术急性处死,立即摘除眼球,将左侧眼球完整置于 10% 甲醛溶液中固定待光镜标本制备;另侧眼球快速自角膜缘切开,立即置于 4℃,2% 多聚甲醛-2.5% 戊二醛溶液中固定待电镜标本制备。

1.2.3 石蜡切片制备及光镜标本制备 将眼球于 10% 甲醛溶液中固定 48h;分别用 700mL/L,800mL/L,950mL/L,无水乙醇脱水各 24h;再用无水乙醇脱水 2 次,各 1h;二甲苯透明 2 次,各 1/2h;蜡 I 浸蜡 1/2h,蜡 II 浸蜡 2 次,分别为 1/2 及 1h;常规石蜡包埋。沿矢状轴过视盘及锯齿缘切片,每个切片厚度 4 μ m,烤片过夜后常规 HE 染色 2h,中性树脂胶封固后光学显微镜下观察。

1.2.4 透射电镜标本制备 取材后立即用 2% 多聚甲醛-2.5% 戊二醛中 4℃ 固定 2h;pH=7.2 的磷酸盐缓冲液冲洗 3 次;剖开眼球,取 2mm \times 1mm 全层球壁组织数块;1% 钼酸后固定,4℃,2h;然后双蒸水冲洗 3 次。梯度乙醇脱水(500mL/L-700mL/L-900mL/L 及 1000mL/L,各 10min)。经置换、纯树脂浸透、包埋、聚合。包埋块修正后做 1 μ m 半薄切片,天青-美蓝染色,光镜下定位后做超薄切片,醋酸双氧铀、醋酸铅染色,透射电镜观察。电压 60kV,电流 25.8 μ A。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 切片常规脱蜡脱水,加 TBS 1:200 新鲜稀释蛋白酶 K 37℃ 消化 15min;TBS 洗 2min \times 3 次,按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μ L,加入 18 μ L 标记缓冲液中,混匀。置样品于湿盒中,37℃ 标记 2h。TBS 洗 2min \times 3 次。加封闭液 50 μ L/片,室温 30min。用封闭液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体,50 μ L/片加至标本片上。置样品于湿盒中,37℃ 反应 30min。TBS 洗 2min \times 3 次。用 TBS 1:100 稀释 SABC:取 1mL TBS 加 SABC 10 μ L,混匀后加至切片。经 DAB 显

色、苏木素复染、脱水,透明,封片后显微镜观察。

1.2.6 计数方法 感光细胞计数:参照 Carter-Dawson 的方法^[4]并加以改进,距视盘 400 μ m 处向周边方向连续选取 4 个视野,110 μ m/视野,记录每个视野的感光细胞总数,统计 5 张不同的切片,计算平均值,细胞计数采用 Image-Pro Plus 分析软件。TUNEL 阳性细胞计数方法:方法同前,将感光细胞核呈棕色的记为阳性,包括整个核着染及核周环形着染。记录每个视野中 TUNEL 阳性细胞数及感光细胞总数,统计 5 张不同切片,计算平均值,细胞计数采用 Image-Pro Plus 分析软件。感光细胞凋亡率=(TUNEL 阳性感光细胞数/总的感光细胞数) \times 100%。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学处理,细胞数之间比较采用 One-way ANOVA 分析处理,感光细胞凋亡率各组之间比较用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CEGI 对 rds 小鼠组织病理学(光镜)的影响 对照组:7d 时视网膜内外节和内外核层发育尚未完善,感光细胞层有 10 层细胞左右。14d 时是 rds 鼠视网膜发育最完善阶段,表现在视网膜各层次均有良好的发育,尤其感光细胞层有 10~12 层左右,排列整齐有序。28d 时,感光细胞层变薄,约有 9 层左右,细胞排列有些紊乱。56d 时感光细胞层约有 6 层左右,细胞排列紊乱。CEGI 组:14d 时视网膜各层结构和厚度与对照组相比无差异,而 28d 时,节段层厚度与对照组 14d 时接近,排列较前疏松,此期感光细胞核层及内核层较 14d 时变薄,感光细胞数目减少。56d 较 28d 厚度有所变薄,感光细胞数减少,细胞排列较前有所紊乱,相当于对照组 28d 左右的水平(图 1)。NGF 组变化类似于 CEGI 组。

2.2 CEGI 对 rds 小鼠组织病理学(透射电镜)的影响

对照组:14d 时,对照组节段层未见有外节膜盘结构,偶尔可见细胞凋亡的早期核变化;28d 时,对照组节段层有结构破坏现象(图 2B),内节和纤毛崩解,未见外节膜盘,外核层细胞凋亡的核变化较 14d 时更加明显,有感光细胞核凝聚现象,外核层的线粒体也有变性情况,表现为部分线粒体肿胀,嵴减少甚至消失,呈现空泡样改变,其它各层未发现明显异常;56d 时,外核层细胞明显减少,节段层内节和纤毛结构紊乱,纤毛脱落的更加明显,许多细胞核有凋亡改变(图 2C),线粒体变性明显,内核层细胞中也有细胞凋亡的现象。CEGI 组:14d 时也有一些早期凋亡的细胞,但细胞变性改变较对照组少,而且外核层及节段层的线粒体丰富(图 2D),结构较完整,线粒体变性的较少;28d 有部分内节和纤毛崩解现象;56d 时,也出现部分细胞凋亡改变,但比对照组少。NGF 组电镜表现与 CEGI 组类似。

2.3 CEGI 对 rds 小鼠凋亡的影响 14d 时,对照组 rds 小鼠外核层出现少量散在的阳性细胞,呈棕黑色,阳性细胞表现为整个核染色与核周环形染色共同存在,而 CEGI 组和 NGF 组 14d 阳性细胞少见,只表现为核周染色,两组细胞阳性率分别是 1.80% 及 1.63%,与对照组(2.31%)比较统计学分析差异无显著性;28d 时,两组外核层阳性细胞数均较 14d 明显增多,内核层也出现了阳性染色,CEGI 组和 NGF 组的感光细胞凋亡阳性率分别是 4.07% 及 3.53%,与对照组比较均有统计学差异($P<0.05$);56d 时,对照组感光细胞明显减少,而染色细胞明显增多,

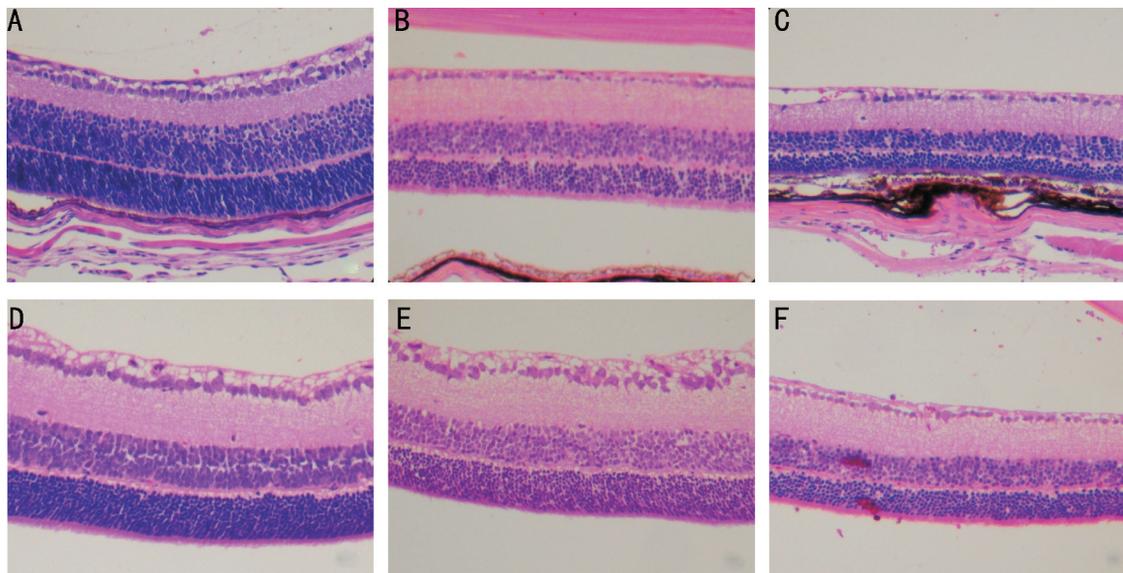


图1 CEGI对 rds 小鼠组织病理学(光镜)的影响($\times 100$) A: 对照组 14d; B: 对照组 28d; C: 对照组 56d; D: CEGI 组 14d; E: CEGI 组 28d; F: CEGI 组 56d。

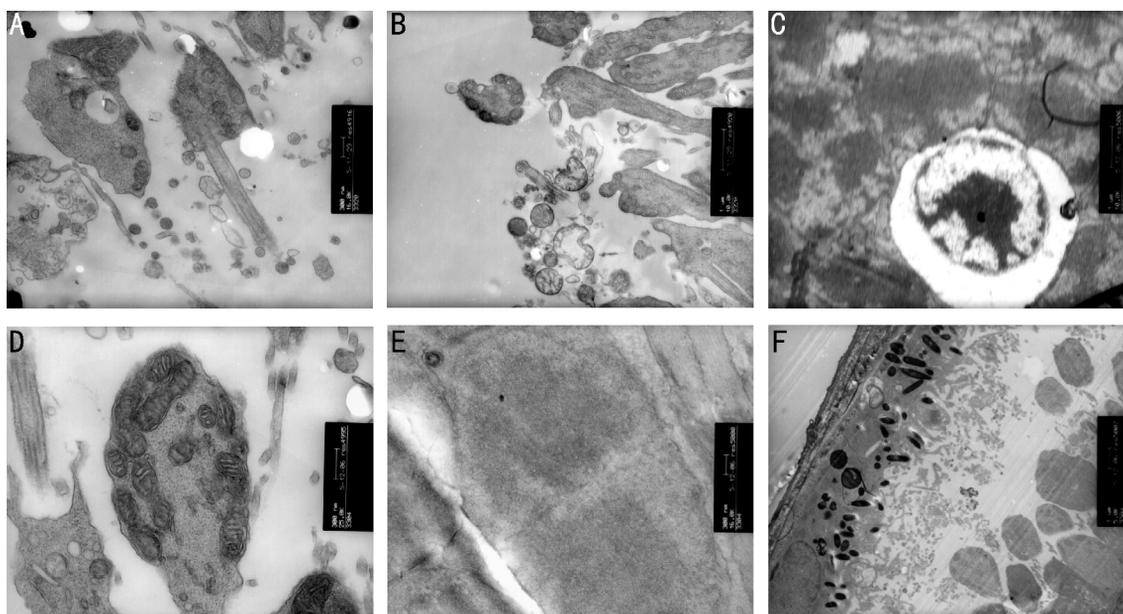


图2 CEGI对 rds 小鼠组织病理学电镜(TEM)的影响 A: 对照组小鼠 14d 时, 可见节段层中纤毛结构, 但未见有膜盘结构($\times 16000$); B: 对照组小鼠 28d 时, 可见外节崩解, 细胞核无($\times 10000$); C: 对照组小鼠 56d 时, TEM 示核固缩($\times 10000$); D: CEGI 组 14d 时, 可见线粒体数量多, 结构完整, 嵴排列整齐($\times 25000$); E: CEGI 组 28d 时, 可见细胞核好, 染色质匀称($\times 16000$); F: CEGI 组 56d 时, TEM 示 RPE+纤毛(缺外节)($\times 16000$)。

表1 各组 rds 小鼠的感光细胞数和凋亡阳性的感光细胞数

鼠龄	对照组			CEGI 组			NGF 组		
	感光细胞数	TUNEL 阳性细胞	凋亡率 (%)	感光细胞数	TUNEL 阳性细胞	凋亡率 (%)	感光细胞数	TUNEL 阳性细胞	凋亡率 (%)
P14	134 \pm 10.3	3.1 \pm 0.45	2.31 \pm 0.61	139 \pm 18.9	2.5 \pm 0.77	1.80 \pm 0.54	141 \pm 20.4	2.3 \pm 1.02	1.63 \pm 0.62
P28	103 \pm 12.7	6.3 \pm 0.76	6.11 \pm 0.92	113 \pm 12.4	4.6 \pm 0.59	4.07 \pm 0.88 ^a	119 \pm 16.8	4.2 \pm 0.77	3.53 \pm 0.78 ^a
P56	61 \pm 9.3	9.2 \pm 0.92	15.08 \pm 1.32	76 \pm 9.7	7.7 \pm 0.65	10.13 \pm 1.07 ^b	72 \pm 22.1	7.1 \pm 0.84	9.86 \pm 0.79 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 同期对照组。

凋亡率达 15.08%, CEGI 组和 NGF 组凋亡率分别为 10.13% 和 9.86%, 与对照组比较统计学有显著性差异($P < 0.01$, 表 1)。

3 讨论

神经营养类物质一直是治疗视网膜变性类疾病重点

药物之一, 主要有 NGF, BDNF, bFGF, CNTF 以及补充 DHA 等。Bok 等^[5]采用神经营养因子 CNTF 治疗 rds 小鼠, 不论用视网膜下注射还是腺病毒相关病毒(AAV)载体转运 CNTF 的转基因疗法, 都有延缓视网膜变性进展的作用, 但延缓变性的指标主要反映在组织结构学上即视网膜外

核层厚度变薄减慢,凋亡细胞出现较少。Huo等^[6]采用嗅鞘细胞培养混悬液(主要含NGF, BDNF和bFGF)移植到RCS鼠(一种常用视网膜变性模型)视网膜下,发现能够帮助清理视网膜下碎片,保护视网膜外节,增加PNA阳性锥细胞外节,减少凋亡阳性细胞,保持ERG b波稳定。均说明此类方法对于干预和改善视网膜细胞变性有一定作用。脑苷肌肽同样也属于神经营养类药物,主要有效成分为多肽、神经节苷脂和多种氨基酸,具有神经修复与再生、神经保护、神经营养与功能,以及促进神经营养因子BDNF等表达^[2]。目前临床应用多用于神经损伤和变性类疾病,但在视网膜及视神经病变的研究及临床应用较少。

本实验采用的rds小鼠是一种最常用的视网膜变性模型,由编码盘缘蛋白2的Prph2基因无效突变引起的,主要在感光细胞外节的形成和维护中发挥关键作用。主要特点是感光细胞外节膜盘不发育或发育不良,继而引起感光细胞的进行性凋亡。人的Prph2基因突变可引起进行性视网膜变性包括ADRP和黄斑变性。Sanyal等^[7]发现rds小鼠具有慢性进展过程及周边视网膜首先变性的特点,是人视网膜色素变性的理想动物模型。形态学上纯合突变的rds小鼠外节段不发育,杂合突变的小鼠外节呈空泡样改变,感光细胞在2wk时开始变性,至12wk时丧失大约50%的感光细胞核,之后变性非常缓慢,大约1a后感光细胞才完全丧失。Reuter等^[8]报道rds小鼠视网膜外核层厚度到2~3mo时减少到最厚时的一半左右,这与我们的结果相似。

本课题研究组前期研究发现,脑苷肌肽在防止视网膜细胞损伤或凋亡,促进视网膜细胞生长发育方面有一定作用^[3]。因此提示该药物可能有阻止视网膜变性疾病进展的作用。本次实验发现,经过CEGI干预的rds小鼠,在28d和56d时,视网膜组织细胞结构与对照组比较,从组织病理学水平,表现为感光细胞层数多于对照组,而凋亡细胞少于对照组,凋亡率分别是4.07%和10.13%,明显低于对照组同日龄组,有统计学显著性差异。超微结构也显示感光细胞核变性较轻,外核层及内节中线粒体数目和形态相对正常,从不同角度反映出CEGI具有延缓rds小

鼠感光细胞凋亡的作用。NGF组与CEGI组作用效果相似,同样有明显抗细胞凋亡作用,与国外同类实验结果相似^[5,6]。

但同时发现CEGI的干预并不能促进rds小鼠的外节膜盘的发育,从光镜结果看各日龄段的节段层仍明显低于正常小鼠,透射电镜也未发现外节的存在,只能见到“裸露”的纤毛。说明不能纠正或改善peripherin基因突变以及盘缘蛋白的功能,它可能只是通过其它途径使感光细胞的抗凋亡能力增强,使细胞凋亡的步伐放慢。

因此,脑苷肌肽作为一种神经细胞及其它细胞生物合成的一种重要物质,可以干预视网膜变性动物的视网膜细胞凋亡过程,延缓视网膜变性进展,促进视网膜细胞生长发育,可为今后治疗视网膜变性类疾病临床应用提供实验依据。

参考文献

- 1 Sahni JN, Angi M, Irigoyen C, *et al.* Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy. *Curr Genomics* 2011;12(4):276-284
- 2 张顺清,吴爱群. 脑苷肌肽对体外培养神经元BDNF表达的影响. *中国实用神经疾病杂志* 2007;10(9):43-46
- 3 杨永升,王津津. 脑苷肌肽对rd小鼠视网膜细胞保护作用的研究. *眼科新进展* 2012;32(12):1131-1133
- 4 Carter-Dawson L, LaVail MM, Sidman RL. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17(6):489-498
- 5 Bok D, Yasumura D, Matthes MT, *et al.* Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp Eye Res* 2002;74(6):719-735
- 6 Huo SJ, Li YC, Xie J, *et al.* Transplanted olfactory ensheathing cells reduce retinal degeneration in Royal College of Surgeons rats. *Curr Eye Res* 2012;37(8):749-758
- 7 Sanyal S, Ruitter AD, Hawkins RK. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy. *J Comp Neurol* 1980;194:193-207
- 8 Reuter JH, Sanyal S. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: The electroretinogram. *Neuroscience Letters* 1984;48(2):231-237