

# NgR-Rhoa-Rock 信号通路在早期糖尿病大鼠 RGC 凋亡中的作用

付云杰, 刘学政

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 31140072); 辽宁省自然科学基金项目 (No. 20102140)

作者单位: (121000) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院人体解剖学教研室

作者简介: 付云杰, 在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病眼底并发症的发病机制及治疗。

通讯作者: 刘学政, 辽宁医学院院长, 医学博士, 解剖学教授, 博士研究生导师, 研究方向: 糖尿病眼底并发症的发病机制及治疗。Liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期: 2014-05-13 修回日期: 2014-07-21

## The role of NgR - Rhoa - Rock signal pathway in retinal ganglion cell apoptosis of early diabetic rats

Yun-Jie Fu, Xue-Zheng Liu

**Foundation items:** National Natural Science Foundation for Director (No. 31140072); Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 20102140)

Teaching and Research Office of Anthropotomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Xue-Zheng Liu. Teaching and Research Office of Anthropotomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. Liuxuezheng168@vip.sina.com

Received: 2014-05-13 Accepted: 2014-07-21

### Abstract

• **AIM:** To study the function and mechanism of the NgR-Rhoa-Rock signal pathways which exists in the retinal ganglion cells apoptosis in diabetes mellitus (DM) rats.

• **METHODS:** Some healthy SD rats were operated by means of single intraperitoneal injection of 1% streptozotocin based on the standard of 50mg/kg wight, after that the blood sugar value was greater than 16.7mmol/L as DM model, then randomly divided into 3 groups, each group was 10 rats. In addition to take 10 healthy SD rats as control group. Four groups of rats were bilaterally eyeball intravitreal injection in turn with NgR-siRNA virus 10 $\mu$ L (siRNA group), NgR-siRNA virus diluted 10 $\mu$ L (DM group), NgR-siRNA virus-negative-control solution 10 $\mu$ L (siRNA blank group), NgR-siRNA virus diluted 10 $\mu$ L (normal control group), and fed normally. During that time, some life indexes like blood glucose, body mass, etc. were measured and recorded. After 12wk, the expression of NgR and Rhoa, HE staining, and TUNNEL staining were detected by Western blot analysis.

• **RESULTS:** Western blot analysis: compared with normal control group, the expression of NgR and Rhoa in DM group and siRNA blank group increased significantly ( $P < 0.01$ ), while siRNA group was no significant change ( $P > 0.05$ ); compared with DM group and siRNA blank group, the expression of those proteins significantly lowered in siRNA group. HE staining: compared with normal control group, some extent ganglion cells arranged disorder, irregular shape, spacing not consistent were all found in three groups of model rats; compared with DM group and siRNA blank group, there was some improvement in siRNA group of ganglion cells about the order and shape size. TUNEL staining: compared with normal control group, there were retinal ganglion cells apoptosis in all of three groups of model rats. Compared with DM group and siRNA blank group, the number of retinal ganglion cells apoptotic cells was less, and the shape of cells had improved significantly in siRNA group.

• **CONCLUSION:** In the DM phase, the expression of NgR and Rhoa were up-regulation, the condition of diabetic retinal ganglion cell apoptosis was improved after that the NgR-Rhoa-Rock signal pathways had been inhibited.

• **KEYWORDS:** diabetes; retinal ganglion cell; Rhoa-Rock signal pathway; apoptosis

**Citation:** Fu YJ, Liu XZ. The role of NgR-Rhoa-Rock signal pathway in retinal ganglion cell apoptosis of early diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(9):1570-1573

### 摘要

**目的:** 研究 NgR-Rhoa-Rock 信号通路在糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 大鼠视网膜神经节细胞凋亡中的作用及机制。

**方法:** 健康 SD 大鼠, 以 50mg/kg 体质量单次腹腔注射 1% 链脲佐菌素的方法处理, 以血糖值大于 16.7mmol/L 定为糖尿病模型; 然后随机分成 3 组, 每组 10 只。另取 10 只健康 SD 大鼠作对照组。再依次对 4 组大鼠进行双侧眼球玻璃体腔内注射 NgR 小干扰病毒 10 $\mu$ L (siRNA 组)、NgR 小干扰病毒稀释液 10 $\mu$ L (DM 组)、NgR 小干扰病毒阴性对照液 10 $\mu$ L (siRNA 空白组)、NgR 小干扰病毒稀释液 10 $\mu$ L (正常对照组), 正常喂养。期间对血糖、体质量等一些生命指标进行观察、测量并记录。12wk 后, 行视网膜 Western blot 检测 NgR、Rhoa 的表达, HE 染色、TUNEL 染色。**结果:** Western 检测: 与正常对照组相比, DM 组和 siRNA 空白组中 NgR、Rhoa 表达明显增加 ( $P < 0.01$ ), 而 siRNA 组无明显变化 ( $P > 0.05$ ); 与 DM 组和 siRNA 空白组相比, siRNA 组 NgR、Rhoa 表达明显下调。HE 染色: 与正常对照组相比, 三组模型鼠均有不同程度节细胞排列紊乱、形

态不规则、间距不一致;与 DM 组和 siRNA 空白组相比, siRNA 组节细胞在排列顺序、外形大小等有一定程度改善。TUNEL 染色:与正常对照组相比,三组模型鼠均有节细胞凋亡;与 DM 组和 siRNA 空白组相比, siRNA 组凋亡细胞数量较少,细胞外形有明显改善。

**结论:**DM 时大鼠视网膜 NgR、Rhoa 表达上调,抑制 NgR-Rhoa-Rock 可以改善糖尿病视网膜神经节细胞的凋亡。

**关键词:**糖尿病;视网膜神经节细胞;Rhoa-Rock 通路;凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.09.03

**引用:**付云杰,刘学政. NgR-Rhoa-Rock 信号通路在早期糖尿病大鼠 RGC 凋亡中的作用. 国际眼科杂志 2014;14(9):1570-1573

## 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是临床常见的糖尿病并发症之一。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)是唯一的视觉输出细胞, RGC 损伤是 DR 视力减退的重要原因<sup>[1]</sup>。视神经退行性变释放的髓磷脂相关糖蛋白与受体 NgR(Nogo Receptor)结合,启动下游的 Rhoa-Rock 信号通路,作用于肌动蛋白骨架系统,影响细胞的各种生物学行为<sup>[2]</sup>,产生轴突抑制,损伤视神经。本实验拟利用链脲组佐菌素(streptozotocin, STZ)建立糖尿病大鼠模型,玻璃体内注射 siNgR 抑制 NgR 表达,干扰 NgR-Rhoa-Rock 信号通路对 RGC 的影响,以探讨 Rhoa-Rock 通路在视网膜神经节细胞凋亡中的作用,为治疗 DR 提供有效的思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 200~250g(辽宁医学院实验动物中心提供), siNgR 慢病毒包装液(上海吉玛生物公司), Rhoa 抗体(Abcam 公司),链脲组佐菌素(Abcam 分装), TUNEL 试剂盒(南京凯基生物)。

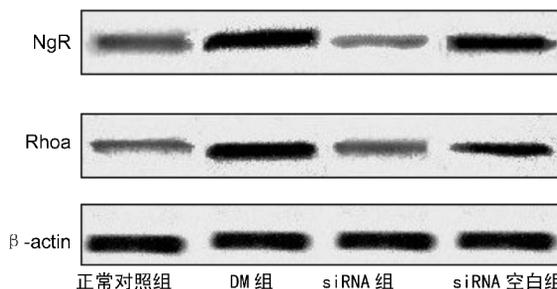
### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** SD 大鼠以 50mg/kg 体质量单次腹腔注射 1% 链脲组佐菌素, 72h 后测尾静脉随机血糖 >16.7mmol/L 即为 DM 模型。模型组 3 组, 对照组 1 组( $n=10$  只/组): A 组-正常对照组; B 组-DM 组; C 组-siRNA 空白组; D 组-siRNA 组, 并注意观察记录各组大鼠生命指标。饲养 12wk 后,取材、切片进行各项检测。

**1.2.2 石蜡切片制备** 12wk 后,以 10% 水合氯醛(0.3mL/100g)腹腔注射麻醉,固定,以 4% 多聚甲醛溶液进行心脏灌注,取出双侧眼球,浸在 4% 多聚甲醛溶液中 24h,在显微镜下取出角膜、晶状体、玻璃体等,继续浸在多聚甲醛溶液 12h,流水冲洗过夜,脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,片厚 7 $\mu$ m。

**1.2.3 HE 染色** 60 $^{\circ}$ C 恒温箱烤片 1h,切片脱蜡脱水,苏木精浸染 5min,自来水冲洗 3min,1% 盐酸乙醇分化 3~5s,自来水冲洗 30min,三蒸水冲洗 3 次,3min/次,伊红浸染 1min,三蒸水 3 次,3min/次,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片,观察。

**1.2.4 Western-blot 检测 Rhoa** 每组动物中随机取出 4 只大鼠,注射过量麻醉药,碎冰上活取眼球,迅速分离视网膜组织并放入离心管内称重,按比例加入裂解液,以 10000 转/min,离心 15min。用移液管抽取上清液进行电泳分离,后转移至 pH 为 8.3~8.4 环境的硝酸纤维素膜,缓冲液室温封闭 60min,依次加入一抗(羊抗鼠 Rhoa)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,然后加入二抗(辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠



**图 1 蛋白表达** 与正常组相比,DM 组和 siRNA 空白组蛋白表达明显上调;与 DM 组和 siRNA 空白组相比, siRNA 组 NgR 蛋白、Rhoa 蛋白表达明显下调。

IgG,抗体稀释浓度为 1:1000) 37 $^{\circ}$ C 温育 120min,TTBS 充分冲洗 3 次,15min/次,最后用三蒸水洗一次。最后显色观察。

**1.2.5 TUNEL 染色** 60 $^{\circ}$ C 恒温箱烤片 40min,将切片尽快放入二甲苯 I, II, III 各 10min; PBS 冲洗 5min/次 $\times$ 3 次,用记号笔标出组织所在地方界限;配制通透液,混匀 1min,即用即配;切片浸入通透液,室温下处理 5min; PBS 冲洗 5min/次 $\times$ 3 次;配制 Proteinase K 工作液,即用即配,37 $^{\circ}$ C 反应 30min; PBS 冲洗 5min/次 $\times$ 3 次;将现配的孵育液 DNase 滴加在切片上,37 $^{\circ}$ C 孵育 90min, PBS 冲洗 5min/次 $\times$ 3 次;加入抗体孵育 30min,洗涤,配工作液,显色,封片。

统计学分析:结果均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析,采用 LSD- $t$  检验两两比较, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生命体征

**2.1.1 一般状况** 正常对照组大鼠饮食和二便正常,精神状态良好,活动活跃,反应敏感,毛发干净,色泽光亮,个体增大。其它三组大鼠模型建立后,明显有多饮、多食、多尿,而且随着病程进展,与对照组相比模型鼠伴有不同程度的精神萎靡,活动减少,对各种外界刺激敏感度下降,毛发逐渐干枯,缺乏亮泽,稀疏发黄。另外,模型鼠垫料更换次数明显比正常鼠增多,气味浓重。

**2.1.2 体质量和血糖** 四组大鼠初始体质量差异无统计学意义( $P>0.05$ );建模后,模型组体质量增长缓慢,甚至随病程进展有逐渐降低;正常组大鼠体质量明显增加(表 1)。STZ 诱导 3d 后,3 组模型组大鼠血糖均明显高于正常组( $P<0.01$ );诱导 1wk 时血糖继续上升;诱导 8wk 时,血糖水平明显增高,与正常组相比,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),而诱导 12wk 后的血糖水平与 8wk 时相比,无明显差异(表 2)。

**2.2 Western 检测视网膜 NgR 和 Rhoa 表达** 免疫印迹蛋白表达检测,与正常对照组相比,DM(糖尿病)组、siRNA 空白组蛋白表达明显上调( $P<0.01$ ),注射病毒的 siRNA 组表达无明显变化( $P<0.05$ )。而与注射病毒的 siRNA 组相比, siRNA 空白组蛋白表达上调明显( $P<0.01$ , 图 1)。

**2.3 HE 染色** HE 染色显示四组大鼠视网膜神经节细胞形态学情况:正常组大鼠视网膜神经节细胞形态规则、轮廓清晰、排列有序、大小相似,间距较一致;与正常组大鼠相比,DM(糖尿病)组大鼠和 siRNA 空白组大鼠均出现一定程度的节细胞形态不一、数量减少、排列无序、间距不等;

表1 四组大鼠体重质量情况

( $n=10, \bar{x} \pm s, g$ )

组别	诱导前	诱导后 3d	诱导后 1wk	诱导后 4wk	诱导后 8wk
正常对照组	248.2±8.54	254.1±3.26	259.9±8.16	325.1±9.89	397.6±11.48
DM 组	252.4±7.56	249±6.64	241±8.13 <sup>b</sup>	217.3±10.69 <sup>b</sup>	200.2±3.44 <sup>b</sup>
siRNA 空白组	246.8±7.23	241.5±5.69	226±4.12 <sup>b</sup>	203.9±5.21 <sup>b</sup>	190.5±9.12 <sup>b</sup>
siRNA 组	242.6±8.22	238±6.24	230.1±6.36 <sup>b</sup>	215.2±4.26 <sup>b</sup>	194.8±4.88 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常对照组。

表2 四组大鼠血糖情况

( $\bar{x} \pm s, n=10, mmol/L$ )

组别	诱导前	诱导 3d 后	诱导后 4wk	诱导后 8wk	诱导后 12wk
正常对照组	3.5±0.5	3.8±0.7	5.8±0.6	5.1±0.9	4.9±0.4
DM 组	3.2±0.8	26.6±2.9 <sup>b</sup>	28.6±1.9 <sup>b</sup>	29.3±1.6 <sup>d</sup>	28.8±1.4 <sup>d</sup>
siRNA 空白组	3.9±0.2	19.5±2.1 <sup>b</sup>	25.9±1.2 <sup>b</sup>	25.4±1.7 <sup>d</sup>	26.2±2.1 <sup>d</sup>
siRNA 组	4.4±0.5	22.5±1.7 <sup>b</sup>	26.8±2.0 <sup>b</sup>	27.4±2.2 <sup>d</sup>	27.0±2.9 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01, ^dP<0.01$  vs 正常对照组。

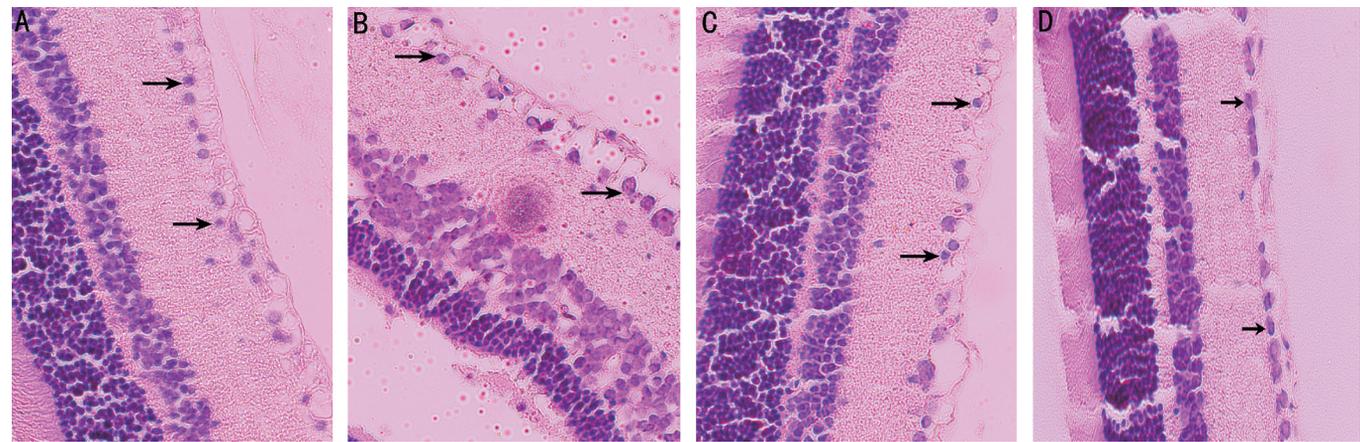


图2 四组 HE 染色图片 ( $\times 400$ ) A:正常对照组,箭头指向为视网膜节细胞:细胞排列有序,数量较多,间距规则;B:糖尿病组,箭头指向为视网膜节细胞:与正常组相比,视网膜神经节细胞数量较少,排列无规则,细胞间距无序;C:siRNA 空白组,箭头指向为视网膜节细胞:与正常组相比,视网膜神经节细胞数量减少,排列无规则,细胞间距无序;与糖尿病组相比,细胞数量、排列形式、细胞间距等都有一定相似;D:siRNA 组,箭头指向为视网膜节细胞:与正常组相比,视网膜神经节细胞数量减少,细胞排列无规则,细胞间距不一致;与 siRNA 空白组相比,细胞数量有所增加,细胞排列无序的程度下降,说明抑制信号通路可以改善视网膜神经节细胞的形态学特征。

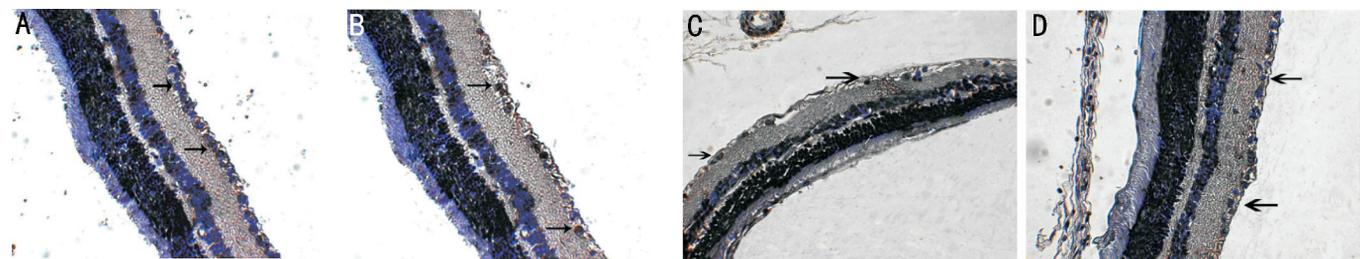


图3 四组大鼠视网膜节细胞 TUNEL 染色 ( $\times 400$ ) A:正常对照组,视网膜节细胞形态规则,箭头所示为正常的视网膜节细胞,无凋亡出现。B:DM 组,视网膜节细胞形态不规则,数量明显减少,排列不规则,箭头所示为凋亡的视网膜节细胞,细胞出现凋亡的明显特征;C:siRNA 空白组,视网膜节细胞形态不规则,数量明显减少,排列不规则,箭头所示为凋亡的视网膜节细胞,细胞出现凋亡的明显特征;D:siRNA 组,视网膜节细胞形态规则,排列规则并且一致,箭头所示为视网膜节细胞,siRNA 组视网膜节细胞并未出现凋亡的特征。

与其它两组模型鼠相比,siRNA 组大鼠视网膜神经节细胞数量有一定程度的增加,并且细胞排列无序的情况有改善,显示抑制 NgR-Rho-Rock 通路的表达可以改善糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的形态学特征(图2)。

**2.4 TUNEL 染色** TUNEL 染色组织形态显示,正常对照组大鼠视网膜节细胞,形态规则,外形清楚、排列有序一致,并且没有细胞的凋亡和坏死,细胞核清晰完整。DM 组和 siRNA 空白组大鼠视网膜节细胞数量减少、形态不规则、排列无序、出现明显的细胞凋亡、并出现核固缩、核坏

死等细胞凋亡的特征性变化。而 siRNA 组与 siRNA 空白组比,细胞数量有所增加、细胞形态完整、排列呈现一定顺序、并且未出现凋亡细胞的形态特征(图3)。

### 3 讨论

视网膜神经节细胞是唯一的视觉输出细胞,其轴突是视神经的主要组成部分,RGC 损伤、凋亡、结构改变及功能减退是神经损伤的病理基础<sup>[3]</sup>。在 DR 早期或前期,包括视网膜神经元和胶质细胞,在结构和功能上都发生了明显的病理变化<sup>[4]</sup>,从而逐渐影响患者视力。

Rhoa-rock 信号通路由 Rhoa、rock 和肌球蛋白磷酸酶 (myosin phosphatase, MP) 三个关键分子组成。Rhoa 是小分子 G 蛋白家族的成员,参与细胞内骨架重建、细胞内运输、转录调控等功能,Rho 信号的激活参与中枢神经系统突触重塑的形成。Rock 属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族成员,目前功能较清楚的 Rhoa 下游效应分子,并且是 Rhoa 下游能够参与轴索再生的最重要的信号分子,而且 Rock 在结合域被激活后可以诱发神经轴突细胞回缩,抑制 Rock 可以克服 MAG、Nogo 和髓鞘的抑制作用<sup>[5]</sup>。糖尿病高水平的 Rhoa 可以通过 Rhoa-Rock 通路,影响血管平滑肌细胞过度收缩、黏附、增生、游移等行为,对血管的生理功能产生影响,而加重糖尿病的血管并发症;而通过 Rhoa 的抑制剂 C3 转移酶,可以阻断 Rhoa,能加强视神经轴索的存活能力和再生能力。本实验利用 DM 大鼠模型,探讨了 Rhoa-Rock 信号通路对 RGC 的作用和影响。结果显示,随着 DM 病程进展,Rhoa 的表达增加,RGCs 的损伤加重;从上游阻断 NgR-Rhoa-Rock 信号通路后,Rhoa 的表达减少,RGCs 损伤减轻。DR 视神经损伤后,出现髓鞘脱落、少突胶质细胞死亡和髓鞘再生等病理改变,产生的髓鞘碎片能抑制视神经轴索再生。这种抑制作用由特定的抑制分子介导,主要有 Nogo、髓鞘相关糖蛋白 (myelin associated glycoprotein, MAG)、少突胶质细胞髓鞘糖蛋白 (oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp) 等,它们通过其共同受体 NgR 形成受体复合物<sup>[6]</sup>,经过一系列跨膜转运,启动 NgR 下游 Rhoa 及其下游最主要的信号分子 Rock<sup>[7]</sup>,引起肌球蛋白磷酸酶磷酸化而失活,影响细胞的收缩、黏附、增殖、凋亡等生物学行为,从而促进肌动蛋白微丝骨架的聚合,引起生长锥塌陷,轴突导向排列和抑制<sup>[8-10]</sup>。可见,NgR-Rhoa-Rock 通路在糖尿病视网膜病变的血管损伤和神经损伤之间,为介导各种抑制作用起着联系而后协同作用。

本实验正是考虑到糖尿病视网膜病变过程中多因素、多途径参与,拟从 NgR-Rhoa-Rock 通路入手,验证此通路对神经节细胞凋亡的作用,及以此为着眼点,从上游寻找多个突破口,为研究神经节细胞凋亡打开更广阔的思路。实验比较对照了正常组和 DM 模型组 Rhoa 的表达与 RGC 凋亡情况之间的关系。DM 发生发展时,NgR、Rhoa 表达活跃,Rhoa 增加,RGC 凋亡加剧;抑制上游 RGR 及其下游

Rhoa-Rock 的激活后,RGC 凋亡减少。由此可以推断,上游 NgR 的抑制及其下游 Rhoa 信号的激活被阻断与视网膜神经节细胞的凋亡之间存在着很密切的联系。

由此推断,这个链条上任意一个环节在数量上有所增减、功能上发生异常,相应下游的抑制因子的抑制作用都会受到影响,进而使整个信号通路的作用发生改变,在一定程度上使此通路介导的生长锥塌陷和轴突抑制的不良效果,与视网膜神经节细胞的修复之间的稳态失衡。但是,三类主要的抑制分子具体是以什么形式与 NgR 受体复合体的哪些位点结合,NgR 激活后是否还存在其它下游通路参与最后的抑制效应,NgR-Rhoa-Rock 通路的激活还有无其他开关分子等,都将是以后视网膜神经节细胞病变研究的方向,为临床预防、治疗糖尿病视网膜病变提供新的思路和靶点。

#### 参考文献

- 1 Fischer D, He Z, Benowitz L. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 2004;24(7):1646-1651
- 2 Suzuki T, Nishimukai M, Takechi M, et al. The nondigestible disaccharide epilactose increase paracellular Ca<sup>2+</sup> absorption via rho-associated kinase-and myosin light chain kinase-dependent mechanisms in rat small intestines. *Agric Food Chem* 2010;58(3):1927-1932
- 3 李维业,徐国彤. 凋亡是糖尿病视网膜微血管病变和神经元病变的细胞病理学基础. *国际眼科纵览* 2008;32(2):73-77
- 4 宋清雪. 多元醇通道代谢异常与糖尿病视网膜组织中细胞凋亡关系的研究. 广西医科大学 2009
- 5 Wibberley A, Chen Z, Hu E, et al. Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2003;138(5):757-766
- 6 于盼盼,徐晓明,陆佩华. Rho 与中枢神经系统轴突再生. *生物化学与生物物理进展* 2004;31(4):296-298
- 7 Wang J, Liu X, Zhong Y. Rho/Rho-associated kinase pathway in glaucoma. *Int J Oncology* 2013;43(5):1357-1367
- 8 EI Asrar AM, Dralands L, Missotten L, et al. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(8):2760-2766
- 9 Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(9):703-713
- 10 Budzyn K, Marley PD, Sobey CG. Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(2):97-104