

PEDF 对大鼠视神经急性损伤后神经节细胞的保护作用

赵军波¹, 蒲卫星¹, 霍楠¹, 马玉泉²

作者单位:(056001)中国河北省邯郸市中心医院¹眼科;²胸外科

作者简介:赵军波,副主任医师,副主任,研究方向:眼外伤、青光眼。

通讯作者:赵军波. zxyygz@126.com

收稿日期:2016-09-23 修回日期:2017-04-12

Protective effect of PEDF on ganglion cells after acute optic nerve injury in rats

Jun-Bo Zhao¹, Wei-Xing Pu¹, Nan Huo¹, Yu-Quan Ma²

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Thoracic Surgery, Handan Central Hospital, Handan 056001, Hebei Province, China

Correspondence to: Jun-Bo Zhao. Department of Ophthalmology, Handan Central Hospital, Handan 056001, Hebei Province, China. zxyygz@126.com

Received:2016-09-23 Accepted:2017-04-12

Abstract

• AIM: To observe the protective effect of pigment epithelium derived factor (PEDF) on retinal ganglion cells (RGCs) after acute injury of optic nerve in rats.

• METHODS: Totally 60 healthy female SD rats were randomly divided into three groups: blank group, model group and experimental group, 20 rats in each group. Acute injury model of optic nerve in rats are established by crushing optic nerve. After the model of optic nerve injury was made successfully in model group, the rats were injected with balanced salt solution 5μL into vitreous cavity, and at 1 and 2wk later respectively they were injected again. In experimental group, after the model of optic nerve injury was made successfully, immediately the rats were injected with the PEDF 5μL into vitreous cavity, also at 1 and 2wk later respectively they were injected again. To observe the retinal morphologic changes and count the number of retinal ganglion cells, the specimen was given HE staining and observed under light microscope. The immunohistochemical semi quantitative method was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax to observe the effect of PEDF on the optic nerve after injury.

• RESULTS: Cell morphology of ganglion cells in experimental group was better and the number of RGCs was much more, comparing with the model group by HE staining. The expression of Bcl-2 and Bax in the experimental group was significantly different with that in the blank group and the model group ($P < 0.05$). The

expression of Bcl-2 increased and the expression of Bax decreases in the experimental group compared with the model group.

• CONCLUSION: PEDF can inhibit or weak the apoptosis of RGCs cells after optic nerve injury and alleviate the injury of optic nerve by increasing the expression of Bcl-2 protein or decreasing the expression of Bax protein.

• KEYWORDS: pigment epithelium derived factor; retinal ganglion cell; optic nerve injury; Bcl-2; Bax

Citation: Zhao JB, Pu WX, Huo N, et al. Protective effect of PEDF on ganglion cells after acute optic nerve injury in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(5):846-849

摘要

目的:观察色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)对大鼠视神经急性损伤后视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的保护作用。

方法:选取健康雌性SD大鼠60只随机分为:空白组、模型组和实验组,每组各20只。采用视神经夹伤方法,建立大鼠视神经急性损伤模型。模型组制作视神经损伤模型成功后即刻向玻璃体腔注射平衡盐溶液5μL,之后的1、2wk分别向玻璃体腔注射平衡盐溶液5μL;而实验组在视神经损伤模型制作成功后即刻向玻璃体腔注射PEDF 5μL,同样在1、2wk时分别向玻璃体腔注射PEDF 5μL。通过HE染色,光镜下观察视网膜形态学变化并且对视神经节细胞进行计数。通过免疫组织化学半定量的方法对Bcl-2和Bax的表达进行检测,观察PEDF对受损视神经的影响。

结果:HE染色观察,实验组神经节细胞从细胞形态上要好于模型组,且RGCs数量较模型组多。实验组的Bcl-2和Bax的蛋白表达与空白组、模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),实验组较模型组Bcl-2蛋白表达增加,Bax蛋白表达下降。

结论:PEDF可通过上调视网膜Bcl-2蛋白的表达、减弱Bax蛋白表达,以减弱或抑制视神经损伤后RGCs的细胞凋亡,减轻视神经损伤。

关键词: PEDF; 视网膜神经节细胞; 视神经损伤; Bcl-2; Bax

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.5.10

引用:赵军波,蒲卫星,霍楠,等. PEDF对大鼠视神经急性损伤后神经节细胞的保护作用. 国际眼科杂志 2017;17(5):846-849

0 引言

近年来,随着意外伤害、交通事故的增多,外伤性视神经病变(tramatic optic neuropathy, TON)患者越来越多。该病变预后不良,许多患者残留视力极差。目前仍然缺

乏有效的治疗方法,同时治疗方面的有关基础研究也相对较少。色素上皮细胞衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)是近年来发现的一种有效的内源性多功能因子,它可以使 Y-79 视网膜母细胞瘤细胞的神经元分化、外向生长而具有营养神经的作用。动物实验表明, PEDF 能够保护未成熟的小脑神经元,但对成熟的小脑神经元的抗凋亡作用很弱^[1]。本实验采用大鼠视神经夹伤模型,并行玻璃体腔 PEDF 治疗,探讨 PEDF 对视网膜神经节细胞中 Bcl-2/Bax 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康无眼疾雌性 SD 大鼠 60 只(由河北医科大学实验动物中心提供,清洁级,动物合格证编号 1508079),体质量 200 ~ 250g,自由摄食饮水条件下适应性喂养 1wk。将所有动物分为三组,空白组、模型组和实验组,每组各 20 只。三组间大鼠体质量无统计学差异($P>0.05$)。实验进行期间各组大鼠自由摄食饮水,通风干燥,光线恒定。试剂与药物:美国 Peprotech 公司 PEDF 试剂,美国 Vector Laboratories 免疫组化试剂盒,美国 Santa Cruz Biotechnology 公司 Bcl-2 抗体,美国 Santa Cruz Biotechnology 公司 Bax 抗体。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 除空白组外,模型组和实验组均采用视神经钳夹法将左眼制成视神经损伤模型,右眼不予处理。模型组和实验组在禁食 12h 后给予 10% 水合氯醛(0.35mL/100g)腹腔注射麻醉,消毒左眼皮肤,用眼科手术剪沿角膜缘处剪开颞侧球结膜,剪断外直肌,分离、暴露视神经,用反向镊钳夹球后视神经 2mm 处,造成视神经不全损伤,夹持力为 98g,夹持时间 20s。直接检眼镜观察眼底,无视网膜出血且有动脉血液供应者纳入实验。视神经损伤模型制作成功后,实验组立即向玻璃体腔注射 PEDF 5 μ L,模型组向玻璃体腔注射平衡盐溶液 5 μ L。然后 8-0 可吸收线缝合球结膜,氧氟沙星滴眼液点左眼。之后模型组 1、2wk 再次向玻璃体腔注射平衡盐溶液 5 μ L,而实验组同样在 1、2wk 时向玻璃体腔注射 PEDF 5 μ L。空白组不予药物干预。

1.2.2 标本采集及处理 三组大鼠均在第 3wk 时取材,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,于球后视神经 2mm 处剪断视神经并摘除整个眼球,冲洗后放入 4% 多聚甲醛固定 24h。然后行眼内容物剔除后,外翻眼球壁,剥离视网膜,4% 多聚甲醛固定。4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。将包埋好的眼球标本按平行于视神经矢状轴为平面的视网膜进行连续切片,切片厚度约 5 μ m。每个标本计数 1 张切片,每张切片以视乳头为中心、半径为 1.5mm 处范围内四个方向各取一个视野,每个眼球只抽取和使用 1 张切片。

1.2.3 HE 染色观察大鼠视网膜形态学变化 对视网膜切片标本进行常规 HE 染色,光镜下观察视网膜形态学变化,并对每张切片 4 个视野的视网膜神经节细胞进行计数,取其均值作为该切片的计数结果。

1.2.4 SABC 法检测大鼠视神经 Bcl-2 和 Bax 表达 石蜡切片给予常规脱蜡后缓冲液冲洗,3mL/L H₂O₂ 去离子水孵育,以使过氧化物酶被充分阻断;再经 PBS 冲洗后,置于稀释的正常血清里孵育(室温,20min);去除多余的血清;然后再稀释一抗孵育、冲洗,二抗孵育、冲洗,孵育时间均为 30min,再将组织依次置于 Vectastain ABC 试剂、

过氧化物酶底物溶液中,时间均为 30min,再次冲洗,直到达到所需的染色强度,再用自来水冲洗;然后复染、分化、脱水、透明,中性树胶封片。每组中 PBS 冲洗均为 3 次,每次 5min。于显微镜下观察并检测视网膜内 Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性表达。Bcl-2 阳性表达为细胞膜或细胞浆呈棕褐色染色, Bax 阳性表达为细胞浆呈棕褐色染色。应用多功能彩色细胞图像分析管理系统测定 Bcl-2 和 Bax 的平均光密度值(AOD)。

统计学分析:应用 SPSS 16.0 统计软件进行处理,数据以均数 \pm 标准差表示,采用单因素方差分析进行三组间的比较,组间资料进行 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为有差异统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠视网膜形态学观察 HE 染色观察,空白组大鼠视网膜结构各层组织层次清楚,细胞排列整齐,神经纤维层排列规整,神经节细胞层单层排列,胞核较大。模型组和实验组的神经节细胞层变薄萎缩,可见大片神经纤维空泡样变性。PEDF 实验组(14.25 \pm 1.65,图 1A)和模型组(7.98 \pm 1.69,图 1B)的神经节细胞数都明显低于空白组(29.62 \pm 2.24,图 1C),三组间行方差分析,差异有统计学意义($F=1.410, P<0.01$)。模型组和实验组神经节细胞计数较空白组分别下降 73.3%、53.3%。实验组视网膜神经节细胞数同空白组相比,两者之间差异有显著统计学意义($P<0.01$)。实验组神经节细胞从细胞形态上要优于模型组,且 RGCs 数量较模型组多,两者之间差异有显著统计学意义($P<0.01$)。

2.2 大鼠视网膜组织 Bcl-2 的表达 细胞浆内出现棕黄色细微颗粒为阳性表达。空白组(图 2A)视网膜内 Bcl-2 可见一定表达。模型组(图 2B)、实验组(图 2C)中 Bcl-2 较空白组增多。模型组(0.1526 \pm 0.0045)、空白组(0.1070 \pm 0.0121)和实验组(0.1975 \pm 0.0105)间行方差分析,差异有统计学意义($F=445.098, P<0.01$)。实验组视网膜内 Bcl-2 的平均光密度值明显高于空白组,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。同时实验组视网膜组织 Bcl-2 的平均光密度值高于模型组,两者之间差异有显著统计学意义($P<0.01$),说明 PEDF 具有增加 Bcl-2 表达的作用。

2.3 大鼠视网膜组织 Bax 的表达 细胞浆内出现棕黄色细微颗粒为阳性表达。空白组(图 3A)视网膜内 Bax 可见一定表达,模型组(图 3B)、实验组(图 3C) Bax 较空白组增多。模型组(0.1496 \pm 0.0076)、空白组(0.0950 \pm 0.0090)与实验组(0.1355 \pm 0.0030)间行方差分析,差异有显著统计学意义($F=323.156, P<0.01$)。实验组视网膜内 Bax 的平均光密度值明显高于空白组,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。同时实验组视网膜组织 Bax 的平均光密度值低于模型组,两者之间差异有显著统计学意义($P<0.01$),说明 PEDF 能降低 Bax 蛋白表达。

3 讨论

视神经损伤又称为外伤性视神经病变,主要由头面部和眼眶外伤导致的视神经水肿、缺血、断裂、萎缩引起的视神经病变。在头面颅脑复合伤患者中的发病率为 0.5% ~ 5%^[2]。其预后不良,目前仍缺乏有效的治疗方法。大鼠是外伤性视神经损伤动物模型的常用动物。视神经损伤的动物模型建模方式主要有夹持伤、撞击伤、牵拉伤等,其中视神经夹持伤动物模型在外伤性不完全损伤等

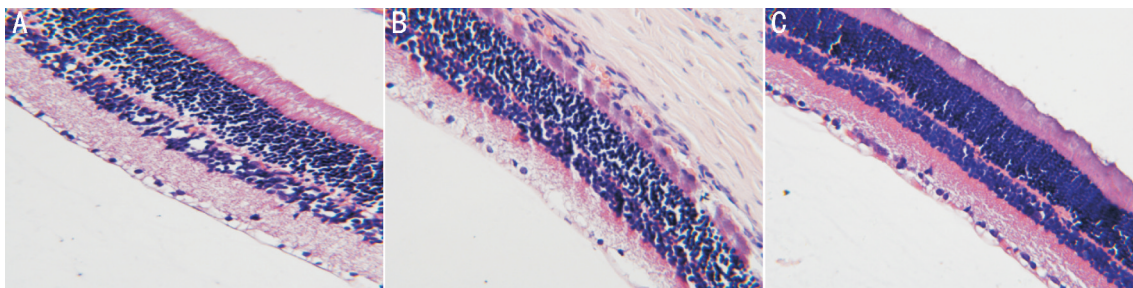


图1 大鼠视网膜切片形态学观察(HE×400) A:实验组;B:模型组;C:空白组。

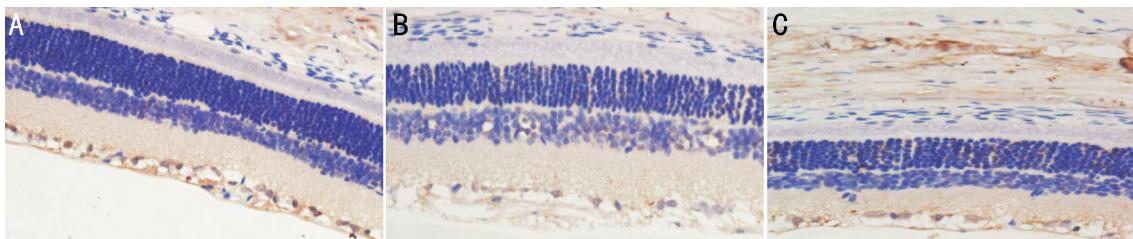


图2 免疫组织染色检测大鼠视网膜 Bcl-2 蛋白的表达(SABC法×400) A:空白组;B:模型组;C:实验组。

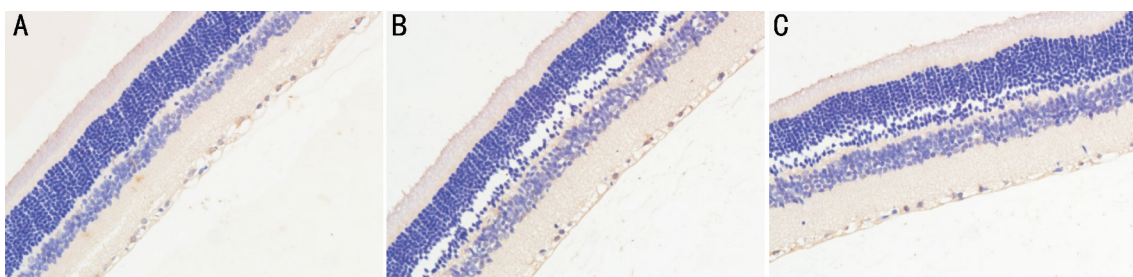


图3 免疫组织染色检测大鼠视网膜 Bax 蛋白的表达(SABC法×400) A:空白组;B:模型组;C:实验组。

模型研究中应用较多,与临床上的急性外伤性视神经损伤的特点最相符合,视神经夹持伤大鼠模型的特点为操作简单、实验方案容易设计、动物损伤轻、损伤程度范围均可控制、损伤后神经鞘膜依旧完整等^[3]。视神经受损后可造成视网膜神经节细胞的损伤、凋亡,而抑制神经节细胞凋亡能够减轻视神经损伤^[4]。细胞凋亡过程不是受单一因子调控的,Bcl-2和Bax是在功能上相反的一对因子。Bcl-2是一种抑制细胞凋亡的因子,体内Bcl-2在线粒体外膜上含量较高,视网膜内含有的线粒体能够为细胞内物质运输及视觉信号传导提供能量^[5]。Bcl-2可以维持线粒体膜的稳定性,当凋亡刺激传递到细胞接收器后,Bcl-2可以维持线粒体膜的稳定并减弱线粒体外膜通透性,抑制线粒体膜电位的变化,减少有害因子的释放,阻止Caspase的激活,进而起到了保护视神经的作用^[6]。此外Bcl-2抗凋亡作用机制还包括作为抗氧化剂具有相应的调节作用,当神经损伤后会发生氧化应激反应,Bcl-2可以减少自由基的产生并抑制其功能。同时在组织缺血缺氧时,Bcl-2还可以抑制促凋亡因子Bax的移动,并通过减弱促凋亡作用而抑制细胞凋亡。Bcl-2可能使Bax形成的一些孔道发生性状的改变,这种变化使一些小分子的因子或物质不能自由通过,从而拮抗Bax促凋亡功能。并且Bcl-2还能使凋亡蛋白前体等因子在细胞受到凋亡信号后无法正常移动到功能位,而被定位在线粒体膜上,无法发挥应有的作用。而Bax的作用是诱发细胞凋亡,为促凋亡因子,当凋亡信号启动后,Bax从胞液开始移动,到达线粒体外膜导致线粒体通透性转换孔开发致使细胞色素C释放,激活

线粒体介导的细胞凋亡,致使DNA链断裂,最后导致神经节细胞的严重损伤^[7]。此外还有学者提出Bcl-2/Bax的动态平衡也是维持细胞稳定的一个因素,在一些氧化应激损伤、缺氧、灌注损伤以及外伤性损伤后,Bcl-2/Bax两者的动态平衡遭受破坏,就可启动凋亡程序,而两者之间的这种平衡关系的作用能力也是目前研究的一个重点方向。本实验通过视神经夹持伤大鼠模型,研究PEDF对视网膜神经节细胞Bcl-2/Bax表达的影响,以探讨PEDF在外伤性视神经损伤治疗中的作用机制,进而为临床治疗急性视神经损伤提供理论依据和新思路。

PEDF属于细胞外的营养因子,具有神经营养、保护神经及抑制新生血管形成等多种作用^[8]。在眼内PEDF由多种组织合成,如视网膜、脉络膜等,并分泌作用于眼内视网膜神经节细胞等多种组织。PEDF能够刺激轴突的外向生长、延缓光感受器细胞的死亡^[9]、减轻视网膜缺血再灌注改变引起眼内压增高导致的视网膜神经元损伤^[10]。Li等^[11]在小鼠视网膜缺血再灌注模型实验中应用PEDF,发现PEDF明显阻止了视网膜神经节细胞的凋亡。而Yabe等^[12]在小脑颗粒细胞的研究表明,PEDF可诱导抑制凋亡因子表达而发挥神经保护作用。在一些青光动物模型的研究中发现,PEDF除了能够减少视网膜神经节细胞坏死,使视网膜神经纤维层变薄,还能够使视野缺失减轻、减少一些坏死物质在视神经的表达^[13]。此外有人切断小鼠坐骨神经后给予PEDF干预治疗观察PEDF对周围神经元的保护作用,发现手术部位应用PEDF后,神经元存活数量明显增加、残存的神经

元的损伤减轻,说明 PEDF 不仅能保护中枢神经,还对周围神经有一定的保护作用^[10]。本实验通过反向镊钳夹大鼠视神经成功建立大鼠视神经急性损伤模型,并对实验组予以 PEDF 玻璃体腔注射,发现损伤后视网膜出现神经水肿、神经纤维空泡样变性,但实验组神经节细胞从细胞形态上要好于模型组,且 RGCs 数量较模型组明显增多;并发现实验组与模型组比较,视网膜内 Bcl-2 表达较强, Bax 表达较弱,差异具有统计学意义,说明 PEDF 可通过增加视网膜 Bcl-2 蛋白的表达、降低 Bax 蛋白表达,以减弱或抑制视神经损伤后 RGCs 细胞凋亡,从而起到降低急性视神经损伤、促进其修复的作用。本实验为 PEDF 治疗 TON 提供了实验依据,为 TON 治疗提供了新的思路。

参考文献

- 1 Araki T, Taniwaki T, Beeerra SP, *et al.* Pigment epithelium-derived factor(PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. *Neurosci Res* 1998;53(1):7215-7219
- 2 Warner N, Eggenberger E. Traumatic optic neuropathy: a review of the current literature. *Curr Opin Ophthalmol* 2010;21(6):459-462
- 3 朱夏茹,陈晓明.大鼠外伤性视神经损伤模型建立的研究进展. *国际眼科杂志* 2014;14(12):2182-2184

- 4 李耀宇,游思维,苏国辉,等.视神经损伤后神经节细胞的保护和神经修复的研究进展. *中华眼科杂志* 2004;40(2):141-144
- 5 韩茜,余玲.氧化应激-线粒体功能异常与视网膜神经节细胞凋亡的关系. *国际眼科杂志* 2015;15(2):238-241
- 6 王亚娜,高莎,沈玺.色素上皮衍生因子对氧诱导视网膜神经节细胞凋亡及 Bcl 表达的影响. *眼科新进展* 2014;34(6):501-505
- 7 祝文文,曹永亮,王晓莉,等. MSC 移植对缺血再灌注损伤视网膜神经节细胞 Bcl-2/Bax 表达的影响. *眼科新进展* 2011;31(5):404-406
- 8 王绍飞,任兵,高晓唯. PEDF 的研究进展. *国际眼科杂志* 2007;7(4):1116-1118
- 9 吕炳健,高晓唯,王瑞夫,等.色素上皮衍生因子对大鼠慢性高眼压视网膜神经节细胞的保护作用. *眼科研究* 2010;28(5):427-431
- 10 李锐,盛文利.色素上皮源性因子-神经营养和保护因子. *国外医学神经病学神经外科分册* 2005;32(3):289-292
- 11 Li H, Tran VV, Hu Y, *et al.* A PEDF N-terminal peptide protects the retina from ischemic injury when delivered in PLGA nanospheres. *Exp Eye Res* 2006;83(4):824-833
- 12 Yabe T, Wilson D, Schwartz JP. NF kappa B Activation is Required for the Neuroprotective Effects of Pigment Epithelium - derived Factor (PEDF) on Cerebellar Granule Neurons. *J Biol Chem* 2001;276(46):43313-43319
- 13 江新利,赵平,刘岩. PEDF 在眼部疾病中的研究进展. *眼科新进展* 2013;5(5):485-488