

• 实验研究 •

制瘤素通过其受体 gp130/OSMR β 诱发转基因鼠视网膜变性

夏晓波 周霞 许惠卓 陈勤

【摘要】 目的 研究晶状体特异性表达的制瘤素(OSM)诱发视网膜变性的信号途径。方法 将去除部分序列的小鼠 OSM cDNA(661 碱基对)连接到 α A-晶状体蛋白(α A-crystallin)启动子上,然后用显微注射的方法将其导入单细胞胚胎内,建立 OSM 转基因鼠。采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测非转基因鼠和 OSM 转基因鼠视网膜中 OSM 受体 gp130/OSMR β mRNA 的表达,兔抗磷酸化的转录信号传递和激活因子-3(STAT-3)抗体检测磷酸化的 STAT-3 蛋白质的表达,鼠抗细胞色素 C 抗体检测视网膜中细胞色素 C 的分布。结果 在新生的非转基因鼠视网膜中有 gp130/OSMR β mRNA 的表达。胚胎期 17.5 d,OSM 转基因鼠视网膜细胞核中有大量的磷酸化的 STAT-3 的积聚。出生后 1 d,OSM 转基因鼠视网膜中有大量细胞色素 C 分布。结论 晶状体特异性表达的 OSM 可能作用于视网膜中 gp130/OSMR β 受体,激活 STAT-3,引起细胞色素 C 从线粒体中大量释放,诱发广泛的视网膜变性。

【关键词】 视网膜变性; 细胞色素 C/免疫学; 小鼠,转基因; 白细胞介素 6; 细胞死亡/免疫学
中图分类号:R774.12 R446.62

Retinal degeneration in transgenic mice induced by oncostatin M through gp130/OSMR β receptor
XIA Xiao-bo, ZHOU Xia, XU Hui-zhuo, et al. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China
Corresponding author: XIA Xiao-bo, Email: xbxia@yahoo.com

【Abstract】 Objective To determine the signal pathway of specifically expressed oncostatin M (OSM) in lens inducing retinal degeneration in transgenic mice. **Methods** A sequence-truncated OSM cDNA (661 bp) of mice was linked to α A-crystallin promoter, and was micro-injected into unicellular embryo to set up the model of transgenic mice. Reversal transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of gp130/OSMR β receptor in the retinae of OSM transgenic and non-transgenic mice. Rabbit anti-phosphorylated STAT-3 antibody was used to detect the protein expression of phosphorylated STAT-3, and mouse anti-cytochrome C antibody was used to detect the distributing of cytochrome C in retinae. **Results** Expression of gp130/OSMR β mRNA was found in retina of non-transgenic mice. At the 17.5th day in the embryonic stage, significant accumulation of the phosphorylated STAT-3 was detected in the retinal nucleolus in OSM transgenic retina. At the first day after birth, intensive staining of cytochrome C in OSM transgenic retina was found. **Conclusions** specifically expressed OSM in lens may act on gp130/OSMR β receptor in retinae, activate STAT-3, and cause the release of cytochrome C from mitochondria, which eventually induces widespread retinal degeneration.

【Key words】 Retinal degeneration; Cytochrome C/immunology; Mice, transgenic; Interleukin-6; Cell death/immunology

制瘤素(OSM)是细胞因子白细胞介素 6(IL-6)家族中的成员,这些因子显示了类似的生物功能,而且均通过其受体的 gp130 亚单位传递信号^[1]。晶状体特异性表达的 OSM 可以诱导活体视网膜无长突细胞、神经胶质细胞和光感受器的提前分化和早熟,激活 caspase-3,导致视网膜细胞凋亡及广泛的视网膜变性^[2,3]。但 OSM 激活 caspase-3 的途径尚不清楚。本研

究旨在探讨晶状体特异性表达的制瘤素诱发视网膜变性的信号途径。

1 材料和方法

1.1 OSM 转基因鼠

我们将去除 C 末端的小鼠 OSM 基因片段[661 碱基对(bp),编码 1-206 氨基酸,日本 Dr. Takahike Hara 惠赠]克隆入 α A-晶状体蛋白载体^[4](α A-crystallin-CPV₂ 载体,含 α A-crystallin 启动子,能特异

性地在晶状体中表达 OSM) 的 EcoRV 酶切位点内, 构建 CPV₂-mOSM 的质粒^[2]。用限制性内切酶 SacI 消化 CPV₂-mOSM 质粒, 释放 1.9×10^3 bp 的片段, 该片段含 α A-crystallin 启动子、OSM 基因片段及 simian 病毒 40(SV40) 序列。1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用 QiaexII 胶提取试剂盒(德国 Qiagen Hilden 公司)纯化, 经 10 mmol/L 盐酸三磷酸酯、0.1 mmol/L 依地酸钠溶解, 稀释成 2 ng/ μ l, 然后注射到单细胞阶段的 FVB(鼠种系代号)/正常鼠(FVB/N, 即非转基因鼠)胚胎细胞核内^[5]。建立转基因鼠并鉴定^[2]。

1.2 组织切片

鼠龄为 5~6 周的 20 只雌性 FVB/N 小鼠分别与 10 只雄性转基因鼠或 10 只雄性 FVB/N 交配, 经剖宫产获取胚胎期 17.5 d 的鼠胚胎 32 只以及出生后 1 d 新生鼠 37 只, 雌雄不限。从新生鼠尾或胚胎躯体中提取基因组 DNA 鉴定转基因鼠^[2]。胚胎鼠的头和出生后的眼经 10% 福尔马林固定, 70% 乙醇脱水, 石蜡包埋, 切成 5 μ m 切片。

1.3 逆转录多聚酶链反应

采用 RNA Stat-60 (美国 Tel-test B 公司) 试剂盒, 从出生后 1~3 d 的 FVB/N 鼠的晶状体、视网膜、大脑、心脏中提取 RNA, 逆转录(RT)后用多聚酶链反应(PCR)方法扩增 500 bp 大小的 gp130 cDNA 片段(上游引物 CTACCCTGAATTTCCAGTTG, 下游引物 CTTCCACCCAGACTTCAATG), 以及 450 bp 大小的 OSMR β cDNA 片段(上游引物 GAGCCTTTACCATTGACTCC, 下游引物 GCCATACATCAGACAGATG)。1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 鉴定片段大小。

1.4 免疫荧光染色

兔抗磷酸化的转录信号传递和激活因子-3 (STAT-3) 抗体(1:50 稀释度, 美国 Cell Signaling

Tech 公司产品)用于检测磷酸化的 STAT-3 蛋白质的表达。鼠抗细胞色素 C(1:50 稀释度, 美国 NeoMarkers Inc. 公司产品)抗体检测视网膜中细胞色素 C 的分布。组织切片经脱蜡, 10 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液微波处理 5 min, 10% 马血清 37 C 预处理 1 h, 加入抗体 4 C 过夜, 经磷酸缓冲液(PBS)洗涤, 加入二抗花青苷 3, 室温下放置 1 h, PBS 洗涤, DAPI(4,6 diamino-2-phenylindole, 美国 Sigma 公司产品)复染, 荧光显微镜下观察视网膜免疫染色分布。

2 结果

2.1 FVB/N 鼠晶状体和视网膜中 OSM 受体 mRNA 的表达

在 FVB/N 鼠的晶状体、视网膜、大脑、心脏中有近似水平的 gp130 mRNA 的表达(图 1)。但视网膜中只有微弱的 OSMR β 受体的表达, 而晶状体中则基本没有表达(图 1)。

2.2 视网膜中磷酸化的 STAT-3 蛋白质的表达及细胞色素 C 的分布

免疫荧光染色结果发现, 胚胎期 17.5 d, OSM 转基因鼠视网膜细胞核中有大量的磷酸化的 STAT-3 的积聚(红色荧光), 而 FVB/N 鼠视网膜中却未检测到磷酸化的 STAT-3 蛋白质(图 2A, 2B); 转基因鼠和 FVB/N 鼠晶状体中未检测到磷酸化的 STAT-3 蛋白质。

细胞色素 C 从线粒体中大量释放可激活 caspase-3。免疫荧光染色结果发现, 出生后 1 d, OSM 转基因鼠视网膜中有细胞色素 C 强荧光, FVB/N 鼠视网膜中则无(图 2C, 2D)。

3 讨论

我们利用转基因鼠模型分析了晶状体特异性表达

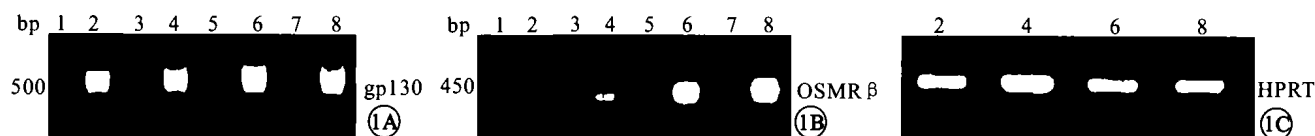


图 1 FVB/N 鼠晶状体和视网膜中 OSM 受体的 mRNA 表达的 RT-PCR 电泳图。1A. 1、2: 分别为晶状体 gp130 受体阴性对照和阳性结果; 3、4: 分别为视网膜中 gp130 受体的阴性对照和阳性结果; 5、6: 分别为脑组织中 gp130 受体的阴性对照和阳性结果; 7、8: 分别为心脏组织中 gp130 受体的阴性对照和阳性结果。1B. 1、2: 分别为 OSMR β 受体在晶状体中 mRNA 表达的阴性对照和阳性结果; 3、4: 分别为 OSMR β 受体在视网膜中 mRNA 表达的阴性对照和阳性结果; 5、6: 分别为 OSMR β 受体在脑组织中 mRNA 表达的阴性对照和阳性结果; 7、8: 分别为 OSMR β 受体在心脏中 mRNA 表达的阴性对照和阳性结果。1C. 2、4、6、8: 分别代表晶状体、视网膜、脑组织、心脏组织的内对照。在 FVB/N 鼠的晶状体、视网膜、大脑、心脏中有近似水平的 gp130 受体 mRNA 的表达(500 bp); 大脑、心脏中有近似水平的 OSMR β 受体 mRNA 的表达, 但视网膜中只有微弱的 OSMR β 受体 mRNA 的表达(450 bp), 晶状体中则基本上没有表达

Fig. 1 Electrophotogram of expression of OSMR β mRNA receptor in lens and retina in FVB/N mice. 1A. The negative control and positive result of gp130 receptor in lens (1,2), retinae(3,4), brains(5,6), and heart(7,8), respectively. 1B. The negative control and positive result of expression of OSMR β mRNA in lens, (1,2), retina(3,4), brain(5,6) and heart(7,8) respectively. 1C. HPRT as an internal control in lens(2), retina(4), brain(6) and heart(8). The expression of gp130 mRNA expression (500 bp) is found in lens, retina, brain and heart in FVB/N mice; approximative expression of OSMR β mRNA (450 bp) is found in brain and heart, and a few or no expressions are found in retina and lens, respectively

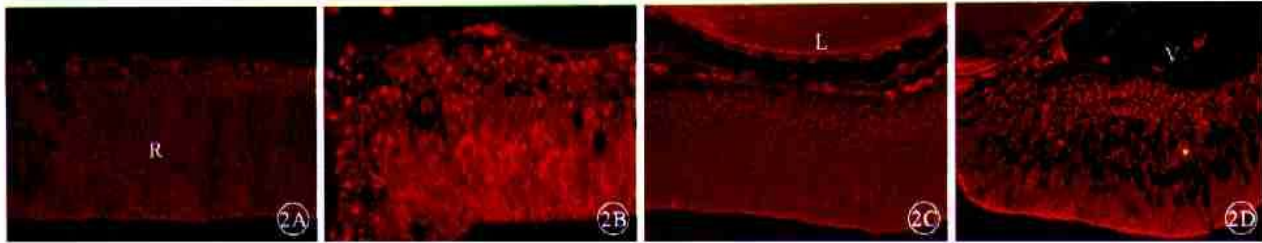


图 2 转基因鼠及 FVB/N 鼠视网膜中磷酸化的 STAT-3 蛋白质的表达及 cytochrome C 的分布的免疫荧光染色像。2A. 胚胎期 17.5 d, OSM 转基因鼠视网膜细胞核中有大量的磷酸化的 STAT-3 的积聚(红色荧光), 而晶状体中没有。2B. FVB/N 鼠视网膜和晶状体中没有检测到磷酸化的 STAT-3 蛋白质。2C. 出生后 1 d, OSM 转基因鼠视网膜中有 cytochrome C 强荧光(红色荧光)。2D. FVB/N 鼠视网膜中没有 cytochrome C 强荧光。L, 晶状体; R, 视网膜; V, 玻璃体。标尺: 500 μm 。

Fig. 2 Photograph of immunohistochemical staining of protein expression of phosphorylated STAT-3 and distribution of cytochrome C in retinae of transgenic and FVB/N mice. 2A. At the 17.5th day in the embryonic stage, lots of phosphorylated STAT-3 congregates in the retinal karyon in OSM transgenic mice (red fluorescence), while no STAT-3 in lens is found. 2B. Protein expression of phosphorylated STAT-3 is undetectable in retinae and lens in FVB/N mice. 2C. One day after birth, hyperfluorescence of cytochrome C is seen in retina in OSM transgenic mice (red fluorescence). 2D. No hyperfluorescence of cytochrome C in FVB/N mice' retinae is found. Abbreviations: L, lens; R, retina; V, vitreous. Scale bar: 500 μm

的蛋白质 OSM 对眼球发育的影响, 结果表明 OSM 可诱导视网膜细胞凋亡和视网膜变性。我们在早期研究中发现, FVB/N 鼠晶状体和视网膜中未见内源性 OSM 蛋白质的表达, 而 OSM 转基因鼠 OSM 的表达是晶状体特异性的异构表达^[2,3]。此外, 在 OSM 转基因鼠的玻璃体中发现有更多的阳性信号, 表明 OSM 蛋白质可能从晶状体分泌进入玻璃体^[2]。因此我们推测, 视网膜的表型是由于蛋白质的旁分泌作用所致。

研究表明, 磷酸化的 STAT-3 是 OSM 诱导反应的主要信号途径之一, OSM 与由 OSM 受体 gp130 亚单位和 OSM 受体 β 亚单位 (OSMR β) 组成的二聚体受体结合, 激活酪氨酸激酶 1 或 2 (Jak1 或 Jak2, Janus 酪氨酸激酶家族), 导致 STAT-1 或 STAT-3 磷酸化被激活^[6]。本实验中, RT-PCR 结果显示 FVB/N 鼠的视网膜中有 gp130 和 OSMR β 受体的表达; 免疫荧光染色结果发现, OSM 转基因鼠视网膜细胞核中有大量的磷酸化 STAT-3 的积聚, 细胞色素 C 从线粒体中大量释放, 从而激活了 caspase-3, 诱发了视网膜变性。这说明 caspase-3 的活化可能是通过常见的配体-受体途

径。

综上所述, 晶状体特异性表达的 OSM 通过旁分泌作用于视网膜中 gp130/OSMR β 受体, 通过磷酸化激活 STAT-3, 引起了细胞色素 C 从线粒体中大量释放, 从而导致了 caspase-3 激活, 诱发了视网膜细胞凋亡及广泛的视网膜变性。

4 参考文献

- 1 Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15:797-819.
- 2 Xia XB, Chen Q. The effects of transgene oncostatin M on the development of retinal neuron in transgenic mice. *Eye Science*, 2003, 19:44-48.
- 3 夏晓波, 许志卓, 周霞, 等. 转基因鼠晶状体特异性表达的制瘤素对眼发育的影响. *中华眼底病杂志*, 2003, 19:239-243.
- 4 Rao MS, Symes A, Malik N, et al. Oncostatin M regulates VIP expression in a human neuroblastoma cell line. *Neuroreport*, 1992, 3: 865-868.
- 5 Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, et al. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J*, 1996, 15: 1055-1063.
- 6 Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, et al. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 1998, 334: 297-314.

(收稿日期: 2004-11-04)

(本文编辑: 朱敏)

· 消息 ·

沃丽汀®临床应用有奖征文

沃丽汀®在日本等国眼科临床应用 50 余年, 在我国眼科临床应用也已 7 年。国内外临床应用结果表明: 沃丽汀®疗效确切, 服用方便, 性价比合理, 现已成为眼科专家治疗眼底病的常规用药。为进一步总结沃丽汀®的临床疗效, 增进学术交流, 武汉市威康药品分公司将于 2005 年 4 月至 2005 年 8 月在全国范围内举办“沃丽汀®临床应用”有奖征文活动, 欢迎全国眼科医生积极参与。

征文要求: 凡未在国内外杂志上公开发表的论文均可投稿。内容为沃丽汀®的临床应用。论文需具有真实性、科学性、先进性, 来稿请附 400 字左右摘要并加盖所在单位医务或科研部门专用章。所有来稿恕不退还, 请自留底稿。

评审奖励办法: (1) 本次活动收到论文数量大于 15 篇后起评; (2) 设一等奖 2 名, 各奖励科研经费 8000 元; 二等奖 5 名, 各奖励科研经费 5000 元; 三等奖 8 名, 各奖励科研经费 3000 元。获奖者为论文第一作者; (3) 邀请全国著名眼科专家进行评审; (4) 获奖论文收入《沃丽汀®论文汇编》。

征文截止日期: 2005 年 8 月 30 日, 以邮戳为准。投稿地址: 武汉市江岸区云林街 31 号中环大厦 B 座 2303 武汉市威康药品分公司, 邮政编码: 430015。电话: 027-85731751。信封上请注明“沃丽汀®征文”字样。

武汉市威康药品分公司