

Nestin 在视神经横断大鼠视网膜 Müller 细胞上的诱导表达

薛黎萍^{1,2}, 丁 鹏³, 吴开力², 江春光¹, 胡竹林¹, 肖丽波¹, 刘 海¹, Eng-Ang Ling⁴

基金项目: 新加坡国防部 DSO 资助项目 (No. 88036)

作者单位: ¹(650031) 中国云南省昆明市, 云南省第二人民医院眼科; ²(510060) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心国家重点实验室; ³(650021) 中国云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院神经外科; ⁴(117597) 新加坡国立大学解剖学系

作者简介: 薛黎萍, 毕业于中山大学中山眼科中心, 眼科学博士, 主治医师, 研究方向: 眼底病防治。

通讯作者: 薛黎萍. xueliping001@163. com

收稿日期: 2008-12-05 修回日期: 2009-02-26

Nestin expression in Müller glial cells in rat retina following optic nerve transection

Li-Ping Xue^{1,2}, Peng Ding³, Kai-Li Wu², Chun-Guang Jiang¹, Zhu-Lin Hu¹, Li-Bo Xiao¹, Hai Liu¹, Eng-Ang Ling⁴

Foundation item: Singapore Defence Science Organization Foundation (No. 88036)

¹Department of Ophthalmology, Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650031, Yunnan Province, China; ²State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China; ³Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650021, Yunnan Province, China; ⁴Department of Anatomy, National University of Singapore, Singapore 117597

Correspondence to: Li-Ping Xue. Department of Ophthalmology, Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650031, Yunnan Province, China. xueliping001@163. com

Received: 2008-12-05 Accepted: 2009-02-26

Abstract

• AIM: To explore the expression of nestin in rat retina following optic nerve transection and its significance.

• METHODS: Optic nerve transection mode was made to examine the reactive changes of Müller glial cells. Three rats were killed at each of the points at 1, 3, 7 days post-operation for sagittal sections. Double labeled immunofluorescence was used to ascertain the cellular localization and the change of nestin in retina. Total RNA was extracted from the retina from the experimental and control rats for Real-time PCR analysis.

• RESULTS: Nestin-positive staining was negligible in Müller glial cells of the adult rat retina. After 1 day, the Müller cells appeared induced nestin expression; After 3 days, nestin in Müller cells further enhanced; After 1 week, nestin in Müller cells remained at a relatively high level. Real-time PCR semi-quantitative analysis with the

above results.

• CONCLUSION: Present results suggest that the induced expression of nestin in Müller glial cells is a reactive change in retinae subjected to optic nerve transection. The induced expression of nestin in Müller glial cells especially at their end-feet suggests a potential neuroprotective mechanism in neuronal degeneration.

• KEYWORDS: optic nerve transection; Müller cell; nestin

Xue LP, Ding P, Wu KL, *et al.* Nestin expression in Müller glial cells in rat retina following optic nerve transection. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(3):433-436

摘要

目的: 探讨中间丝蛋白 nestin 在视神经横断大鼠视网膜神经胶质细胞中的表达情况及可能的意义。

方法: 制作大鼠视神经横断模型, 分别于术后 1, 3, 7d 取材, 制作视网膜矢状位冰冻切片, 进行 GS/nestin, 免疫荧光双标。提取视网膜总 RNA 行 nestin Real-time PCR 半定量分析。结果: 正常大鼠视网膜中几乎看不到 nestin 阳性染色。术后 1d, 在 Müller 细胞上出现 nestin 的诱导表达, 术后 3d, nestin 在 Müller 细胞上的表达进一步增强, 术后 1wk, nestin 在 Müller 细胞上的表达保持在较高水平, Real-time PCR 半定量分析与以上结果吻合。

结论: 视神经横断后 nestin 在 Müller 细胞上的诱导表达是 Müller 细胞对视网膜损伤产生的一种反应, Nestin 的表达量在一定时间内与病程进展相一致。Nestin 在 Müller 细胞上的诱导表达尤其在足板处的强烈表达可能对视网膜神经节细胞具有保护作用。

关键词: 视神经横断; Müller 细胞; nestin

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.03.009

薛黎萍, 丁鹏, 吴开力, 等. Nestin 在视神经横断大鼠视网膜 Müller 细胞上的诱导表达. 国际眼科杂志 2009;9(3):433-436

0 引言

视网膜属中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的一部分, 哺乳动物中枢神经系统包括两种细胞: 神经元和神经胶质细胞。Müller 细胞是视网膜特有的一种神经胶质细胞, 在视网膜各层之间构成精细的网状结构, 维持视网膜的正常结构, 营养神经元, 参与构成血-视网膜屏障等多种功能, 其足板与视网膜神经节细胞在解剖和功能上具有密切的关系。Müller 细胞中含有大量的中间丝蛋白。Nestin (巢蛋白) 属第六类中间丝蛋白, 主要在神经干细胞/神经前体细胞上表达^[1-3], 当神经干细胞分化成神经元或神经胶质细胞后, 其表达下调并逐渐被其他特异性中间丝蛋白 NF/GFAP 代替^[4]。因此, 在中枢神经系统研究中, 它被作为神经干细胞的标记物被广泛应用。我们的前

期研究已经证明,大鼠生后视网膜中分化中和分化成熟的 Müller 细胞表达 nestin,随视网膜日益成熟其表达逐渐减少,正常成年大鼠视网膜中几乎没有 nestin 表达。由此我们设计了本实验,制作视神经横断模型,探讨在视网膜神经节细胞急性大量死亡时 nestin 视网膜中的表达情况以及 Müller 细胞的反应,探讨是否如人们所推测 Müller 细胞就是一种特殊的神经前体细胞或者在特定情况下出现转分化,成为一种类似神经前体细胞的细胞。如果确实如此,意味着视网膜具有终生再生能力,这将对临床治疗一些疾病如晚期青光眼、视神经损伤等具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 SD 大鼠 21 只,雌雄不限(180~240g, 2mo),购自新加坡国立大学实验动物中心。实验动物均排除眼部及全身疾病,所有实验操作方案遵循 ARVO“眼科和视觉科学实验动物使用规范”。其中 3 只作为正常对照,18 只制作视神经横断模型,操作中尽量减少动物痛苦及意外致动物死亡。

1.2 方法 视神经横断动物模型制作:70g/L 水合氯醛按 350mg/kg 的剂量腹腔麻醉大鼠,沿眶上缘做皮肤切口,向下翻转眼球,暴露视神经,沿纵轴剪开硬脑膜,在球后 3mm 处完全剪断视神经,注意勿损伤眼动脉,避免牵拉视神经。所有视神经切断点尽量有一个一致的定位。6-0 尼龙线缝合皮下组织及皮肤切口。另 1 眼同样的操作仅暴露视神经后即关闭组织切口作为假手术组。所有大鼠均在右眼行视神经横断,左眼行假手术作为对照。大鼠眼球冰冻切片及免疫荧光染色:分别取术后 1,3,7d 大鼠,每组 3 只,腹腔麻醉后,40g/L 的多聚甲醛灌注固定,迅速取眼球,40g/L 多聚甲醛中 4℃ 浸泡过夜,200g/L 蔗糖 4℃ 浸泡 3~4h, OCT 包埋,矢状位冰冻切片,片厚 20μm,切取部位出现视神经后随机取 6 片,每片裱在明胶处理过的载玻片上,自然风干后置-20℃ 冰箱保存备用。取各组切片 0.01mol/L PBS 洗 3 次,滴加正常羊血清室温 1h,甩干,按照实验设计一抗为小鼠抗大鼠 NeuN,兔抗大鼠 GS/小鼠抗大鼠 nestin,4℃ 过夜,各一抗浓度分别是 GS(1:1600), NeuN(1:200), nestin(1:200)。PBS 洗 3 次,二抗是羊抗小鼠 IgG-Cy3(1:200)/羊抗兔 IgG-FITC(1:200),室温暗盒中孵育 1h, PBS 洗 3 次,封片,共聚焦激光显微镜(Olympus FV1000)读片记录。Real-time PCR 分析:分别取术后 1,3,7d 大鼠,每组 3 只过量水合氯醛处死大鼠,迅速取眼球置冰上,撕开眼球后剥出视网膜组织置小试管中迅速放入液氮中。按 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)说明抽提视网膜总 RNA;抽提液在分光光度仪上定量及检测 RNA 纯度。 A_{260}/A_{280} 比值在 1.6~2.1 之间认为 RNA 纯度较高,可以作为逆转录反应模板。引物由 Primer - Premier 5.0 软件设计,并经 NCBI BLAST 向基因库检索验证,与其他基因无同源性,由 TaKaYa 生物公司合成。

基因	引物序列	片段长度
nestin	5-CAACCACAGGAGTGGGA ACT-3	220bp
	5-TCTGGCATTGACTGAGCAAC-3	
GFAP	5-GAAGAAAACCGCATCACCAT-3	190bp
	5-GCACACCTCACATCACATCC-3	

将视网膜总 RNA 提取液按 M-MLVRT 试剂盒要求行反转录反应,反应步骤如下:2μg RNA, 1μL Oligo-dT primer,加 RNase-free water 定容至 15μL, 70℃ 反应 5min,反应结束后置冰上。配置反转录反应体系如下:5× M-MLVRT Reaction Buffer 5μL, M-MLVRT 1μL, RNase inhibitor

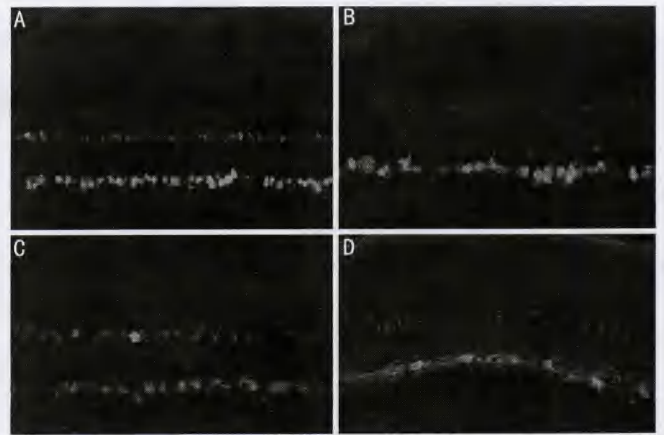


图1 视神经横断后 NeuN 在视网膜中的表达(图 A 标尺为 100μm,图 B,C,D 标尺为 50μm)A:正常大鼠;B:术后 1d;C:术后 3d;D:术后 1wk

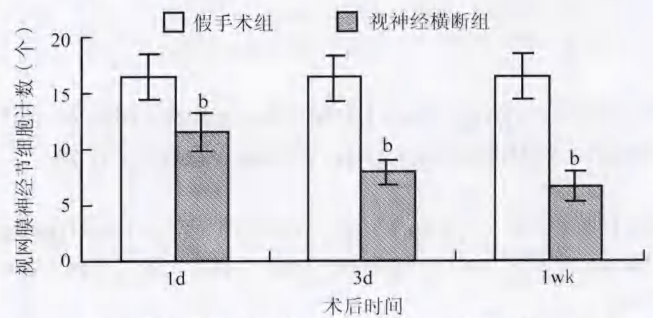


图2 视神经横断后视网膜神经节细胞计数($^b P \leq 0.01$)

0.625μL, 1.25μL dNTP,加 RNase-free water 至 25μL,将上述混合物加于 15μL RNA 混合物中置 42℃ 反应 1h,反应结束后置-20℃ 保存。Real-time PCR 反应体系如下:5μL 反转录产物,5μmol/L 目的基因引物各 1μL,5× 反应混合物 4μL,加水定容至 20μL。95℃ 预热 10min 后,以 95℃ 变性 5s,61℃ 退火 10s(nestin 和 GS)或 60℃ 退火 5s(GFAP), 72℃ 延伸 4s,反应 35 循环。RNA 定量以 Ct 值表示,即 PCR 产物到达指数增长期的循环数,同时以样本中内对照 GAPDH 的量来标化,实验结果以相对于正常视网膜 RNA 量的 2 倍为有统计学显著性差异。

统计学分析:应用配对 *t* 检验,SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析,以 $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视神经横断后神经节细胞计数 我们用 NeuN 来标记视网膜内侧 RGC,参考 Xue 等^[5]方法取视神经颞侧 1mm 处计数 3 个高倍镜下 0.173mm 长度中 NeuN 阳性细胞。正常大鼠 RGC 基数为 16.24 ± 2.68 个(图 1A),术后 1d, RGC 即出现显著减少(图 1B),术后 3d, RGC 数量进一步减少(图 1C),至术后 1wk(图 1D)。和对照组相比差异有显著性,术后 1wk RGC 只有假手术组 RGC 的 40% 左右(图 2)。

2.2 视神经横断后 nestin 表达情况 术后 1d, nestin 表达即有增加,主要呈栅栏状分布于 GCL 和 IPL,位于内界膜的 Müller 细胞足板处 nestin 染色强,向 INL 方向染色强度减弱(图 3 A-C)。术后 3d, nestin 在 Müller 细胞上的表达进一步增强(图 3D-F)。术后 1wk, nestin 在 Müller 细胞上的表达保持在较高水平(图 3G-I)。所有 nestin 阳性细胞同时表达 GS(图 3 C, F, I)。GS 标记的 Müller 细胞从术后 1d 到术后 1wk 数量上未见明显改变,但 GS 的表达位置则更集中于 Müller 细胞足板处(图 3A, D, G)。

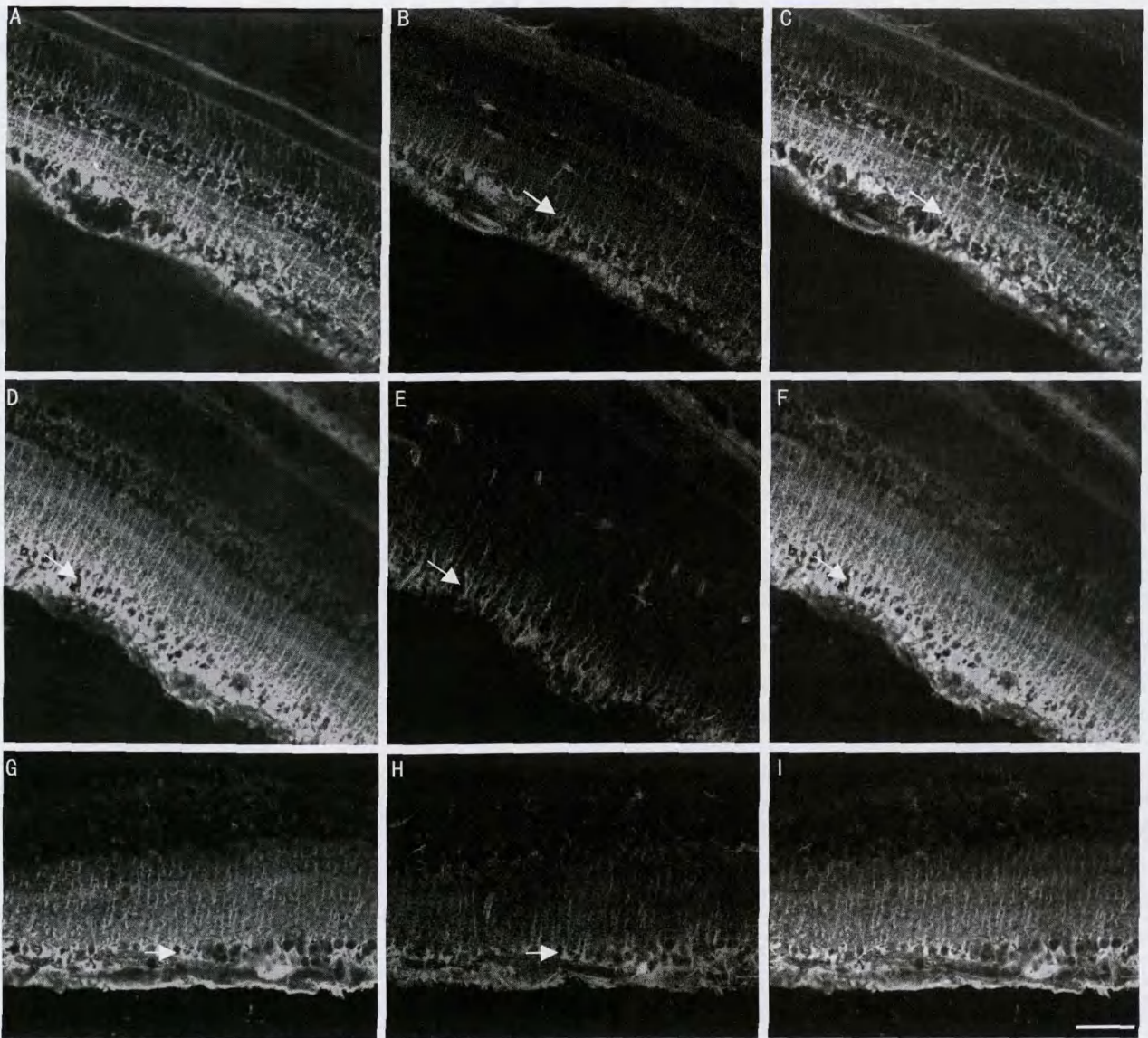


图3 视神经横断后 nestin 在 Müller 细胞上的诱导表达 (标尺为 50µm) A-C: 术后 1d, nestin 表达有增加; D-F: 术后 3d, nestin 表达进一步增强; G-I: 术后 1wk, nestin 表达保持在较高水平

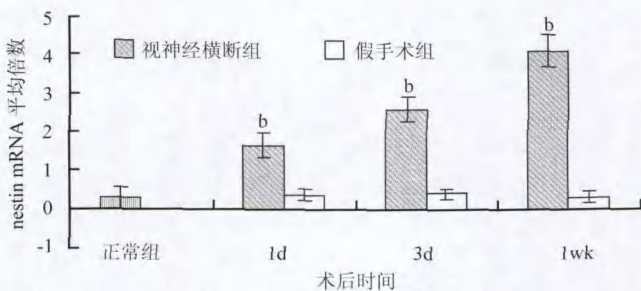


图4 视神经横断后 nestin mRNA Real-time PCR 半定量分析结果 ($^bP \leq 0.01$)

2.3 视神经横断后 nestin mRNA 表达情况 Real-time PCR 分析结果显示视神经横断后检测到 220bp 的 nestin mRNA, 术后表达呈上升趋势, 术后 1wk 表达水平最高, 各时间点实验组和对照组差异有显著性(图4)。

3 讨论

Müller 细胞是视网膜特有的主要的神经胶质细胞, 它和神经节细胞有密切的关系, 能识别多种神经信号, 并能敏感地感受和调控细胞外 K^+ , H^+ , Na^+ 和神经递质浓度

的改变, 它在视网膜损伤后早期就具有明显的病理改变^[6]。已有研究证实 Müller 细胞参与神经元损伤、变性和再生^[6-8]。Nestin 属第六类中间丝蛋白, 以往的研究认为它只出现在 CNS 发育过程的神经干细胞中, 干细胞分化成成熟的神经元或伸进胶质细胞后即不再表达 nestin, 因此, 它被用来作为神经干细胞的标记物^[1-3]。最近的研究对这种观点提出的质疑, Frisen 等^[9] 提出大脑和脊髓外伤后, 反应性星形胶质细胞表达 nestin。中枢神经系统肿瘤中也发现了 nestin 阳性细胞, 并且随着恶性程度的升高, 其表达也要更强烈一些^[10]。在成年纹状体和体外培养的纹状体细胞中也发现了 nestin 阳性细胞^[11]。在眼科方面的研究中, 视网膜毒性损伤、激光损伤和眼压升高后 Müller 细胞出现 nestin 的诱导表达^[5, 12, 13]。人胎儿视网膜分化成熟和未分化的 Müller 细胞表达 nestin^[14]。对于视网膜中出现的这些 nestin 阳性细胞人们提出了不同的解释, 大部分人认为在特定情况下表达 nestin 的 Müller 细胞可能代表一种神经前体细胞, 或具有神经干细胞特点的一类细胞, 在特定情况下可以出现去分化或转分化^[7, 12, 13], 另外也有人提出它仅仅是一种胶质化反应^[3]。我们的前期研究发现, 正常大鼠视网膜 Müller 细胞几乎不表达 nes-

tin,在青光眼模型中可以检测到 nestin 和 GFAP 在 Müller 细胞上的诱导表达。本实验中,我们发现视神经横断后 Müller 细胞上出现了 nestin,随病程进展 RGC 数量仍然急剧减少。因此我们认为病理情况下,Nestin 在 Müller 细胞上的诱导表达是 Müller 细胞针对损伤发生的一种反应性改变,而不是说明 Müller 细胞具有了干细胞特性。视神经横断后,Nestin 在 Müller 细胞上的诱导表达的原因和意义尚不是很明确,实验中我们发现 nestin 在 Müller 细胞上的诱导表达在足板处尤其强烈,Müller 细胞足板包绕 RGC 与其功能的完整性有着密切的关系,当 RGC 的轴浆流突然中断后,Müller 敏感的感受受到外环境的改变,胞浆中的细胞骨架蛋白 nestin 发生改变,这种改变可能通过活化 Müller 细胞释放一系列生长因子如神经生长因子(NGF),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),胰岛素样生长因子(IGF)和睫状生长因子(CNTF)等对神经节细胞有保护作用。

参考文献

- 1 Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60(4):585-595
- 2 Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 1985;5(12):3310-3328
- 3 Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, et al. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 1996;16:2649-2658
- 4 Frederiksen K, McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* 1988;8(4):1144-1151
- 5 Xue LP, Lu J, Cao Q, et al. Müller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina. *Neuroscience* 2006;139(2):723-732
- 6 Newman E, Reichenbach A. The Müller cell; a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 1996;19(8):307-312
- 7 Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV. Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25(11):1321-1328
- 8 Battisti WP, Wang J, Bozek K, et al. Macrophages, microglia, and astrocytes are rapidly activated after crush injury of the goldfish optic nerve; a light and electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* 1995;354(2):306-320
- 9 Frisen J, Johansson CB, Torok C, et al. Rapid, widespread, and long-lasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 1995;131(2):453-464
- 10 Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, et al. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest* 1992;66(3):303-313
- 11 Reynolds BA, Weiss A. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255(5052):1707-1710
- 12 Fischer AJ, Omar G. Transitin, a nestin-related intermediate filament, is expressed by neural progenitors and can be induced in Müller glia in the chicken retina. *J Comp Neuro* 2005;484(1):1-14
- 13 Kohno H, Sakai T, Kitahara K. Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244(1):90-95
- 14 Walcott JC, Provis JM. Müller cells express the neuronal progenitor cell marker nestin in both differentiated and undifferentiated human foetal retina. *Clin Exp Ophthalmol* 2003;31(3):246-249