

大鼠视网膜急性缺血损伤中脑红蛋白的表达

史少阳 冯雪梅

Expression of neuroglobin gene in acute hypoxic-ischemic retinal injury of rat

Shi Shaoyang, Feng Xuemei. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

Abstract Objective Neuroglobin is used to name the third kind of oxygen-carrying globulin, which mainly is expressed in brain, retina and endocrine tissue. Neuroglobin plays important roles during the hypoxic preconditioning, that is, the less neuroglobin level in tissue is, the lower the tolerable capacity of tissue to hypoxic condition. This study was designed to investigate the expression and change of neuroglobin (NGB) gene in hypoxic-ischemic retinal injury of rat. **Methods** Seventy Wistar rats were divided into 7 groups randomly. The experimental models of retinal hypoxic-ischemia injury were induced by elevating introcular pressure to 110 mmHg via anterior chamber canula insertion to infuse the normal saline solution from the container in the height of 150 cm in the left eyes of 70 Wistar rats, and the fellow eyes worked as normal controls. The animals were sacrificed at 1 minute, 5, 10, 15, 20, 30 and 60 minutes after retinal hypoxic-ischemia injury respectively and retinas were collected to extract the total RNA for the detect of NGB mRNA level using semiquantitative reverse transcription-PCR. The use of animal followed the Standard of Association for Research in Vision and Ophthalmology. **Results** The reverse transcription-PCR revealed that expression of neuroglobin mRNA in hypoxic-ischemic retina was consisted with the presenting value. A significant difference was found in expression of neuroglobin mRNA in hypoxic-ischemic retina among different time groups ($F = 8.036, P = 0.000$). From 1 minute through 15 minutes after operation, the expression value of NGB mRNA was significantly higher than that of normal control group ($P_{1\text{min}} = 0.017; P_{5\text{min}} = 0.000; P_{10\text{min}} = 0.001; P_{15\text{min}} = 0.038$) with the peak expression in 5 minutes after operation. No remarkable difference was seen between 20, 30, 60 minutes group and normal control group ($P_{20\text{min}} = 0.269; P_{30\text{min}} = 0.402; P_{60\text{min}} = 0.384$). **Conclusion** This study result suggests that NGB may play important function in the regulation of acute hypoxic-ischemic retinal injury.

Key words neuroglobin; hypoxia-ischemia injury; retina

摘要 目的 探讨大鼠急性缺血性视网膜损伤中脑红蛋白(NGB)基因的表达及变化。**方法** 随机将 50~60 日龄 Wistar 大鼠 70 只分为 7 组,左眼造模,制成高眼压诱导的视网膜急性缺血损伤模型,分别在眼压升高 1、5、10、15、20、30、60 min 迅速取视网膜,对侧眼作为自身正常对照直接取视网膜。提取视网膜组织总 RNA,用半定量 RT-PCR 进行检测。**结果** 检测中可见缺血 1 min 组,NGB mRNA 表达较对照组迅速增加($P = 0.017$),缺血 5 min 达高峰,与对照组比较差异有统计学意义($P = 0.000$);10~15 min 开始降低,但仍然保持在高水平(10 min, $P = 0.001$; 15 min, $P = 0.038$);20~30 min 已迅速降低,但仍高于对照组(20 min, $P = 0.269$; 30 min, $P = 0.402$);60 min 相对于对照组水平略有降低,与对照组比较差异无统计学意义($P = 0.384$)。**结论** 大鼠视网膜急性缺血损伤后 NGB mRNA 表达增强,提示 NGB 可能在视网膜缺氧的适应性调节过程中起了重要作用。

关键词 脑红蛋白; 缺氧缺血; 视网膜

分类号 R 774.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0915-04

脑红蛋白(neuroglobin, NGB)属于血红素类球蛋白家族,最初是由 Burmester 等^[1]发现的体内第 3 类携氧蛋白,因其主要在脑组织中表达,故称“脑红蛋白”。

Schmidt 等^[2]发现小鼠视网膜神经所有神经元中均有 NGB 表达,其浓度为脑内浓度的 100 倍。NGB 能够可逆性地结合氧,且与氧有很高的亲和力,在神经系统氧的摄取、运输和利用等生理过程中起着极其重要的作用。在脑和视网膜的不同区域 NGB 含量各异,与各地区对缺氧的敏感性不同是一致的。NGB 在神经系统

缺氧的适应性反应过程中起重要作用,体外低氧损伤和体外中枢系统缺血试验中NGB的表达增高,且NGB的含量越低对缺氧的耐受性越差。关于视网膜NGB的研究尚处于初级阶段,本研究采用大鼠视网膜急性缺血缺氧模型通过RT-PCR技术对大鼠视网膜缺血缺氧损伤模型中不同时间点NGB mRNA的表达情况进行检测分析,探讨NGB与视网膜缺血缺氧损伤之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选择健康50~60日龄Wistar大鼠70只,雌雄不限;体重200~230g(均系普通级动物),饲料为全价鼠颗粒饲料。大鼠及饲料均由中国医科大学实验动物中心提供。饲养温度18~22℃,相对湿度55%~75%,12h光照维持,自由摄食饮水。纳入标准:外眼正常,无眼部疾病,双眼瞳孔直接对光反射和间接对光反射均正常。适应性驯养3d后,按照分层随机的原则,将70只大鼠按体重大小依次编号后,使用随机数字表法将大鼠随机分为7组,每组10只,左眼制作视网膜缺血缺氧损伤模型,对侧眼为正常对照。动物的使用遵循ARVO标准。

1.2 模型的制作及取材

所有动物称重后用10%水合氯醛左下腹腔注射麻醉(0.3 mL/100 g)。固定动物,将连接生理盐水瓶输液管的5号半头皮针沿颞侧角膜缘刺入眼前房,然后升高输液瓶至输液的高度与动物眼垂直距离为150 cm处,可造成大鼠眼内110 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)的人为高眼压,这一压力接近大鼠体循环收缩压。因此,完全能造成视网膜血流阻断^[3-4]。当输液瓶升高到150 cm处时,可观察到结膜苍白,检眼镜下(+8~+10)D可见血管断流,视网膜缺血,眼底红色反光消失,此时,大鼠眼内压约为110 mmHg。分别在眼压升高1、5、10、15、20、30、60 min将动物处死后,迅速摘除眼球,分离视网膜放入1.5 mL离心管中,置-80℃冰箱中保存待用。

1.3 NGB基因mRNA表达的半定量RT-PCR测定

1.3.1 NGB基因引物的设计与合成 参照张成岗等^[5]的方法,大鼠NGB引物序列上游为5'-GCAGCATCAATCACAAGCA-3',下游为5'-AGCCGCAGCCCCTCTGGAACA-3'。对应大鼠NGB基因编码区49~224位,扩增产物为176 bp。 β -actin作为内参照,引物序列上游为5'-CACCTGTGCTGCTCACCAGGCC-3',下游为5'-CCACACAGATGACTTGCCTCAGG-3',扩增产

物为690 bp(上海英骏生物技术公司合成)。

1.3.2 视网膜组织总RNA的提取 采用Trizol法提取大鼠视网膜总RNA,并经紫外分光光度计测A260/A280值,计算总RNA的纯度及浓度。

1.3.3 逆转录-单链cDNA的合成 等量取上述每个标本总RNA 1 μ g,分别使用AMV逆转录酶(大连宝生物工程有限公司)逆转录成cDNA。

1.3.4 PCR反应 分别取上述逆转录产物cDNA 3 μ L作为模板进行PCR反应。反应体系:模板cDNA 3 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L dNTP 2 μ L, NGB上下游引物各 0.1 μ L,加水补至25 μ L,混匀。按下列条件扩增:94℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min,共30个循环,72℃延伸7 min。

1.3.5 结果分析 取PCR产物10 μ L及 β -actin 2 μ L进行1.5% EB琼脂糖凝胶电泳,采用紫外-凝胶成像分析系统(G:BOX syngene,美国Gene公司)记录电泳结果,采用Genetools图像分析软件定量分析电泳结果。

1.4 统计学方法

采用SPSS 15.0统计学软件对所有数据进行统计学处理。测试指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组测试数据的方差齐性检验采用Levene检验,证实方差齐($P=0.072$)。各时间组NGB mRNA在视网膜中表达的比较采用完全随机设计的单因素方差分析,各时间组间NGB mRNA在视网膜中表达的两两比较采用Dunnnett t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NGB mRNA的测定

NGB、 β -actin扩增后的产物片段与设计相符,结果见图1。

2.2 视网膜组织NGB mRNA表达的变化

NGB mRNA在高眼压诱导的大鼠视网膜急性缺血损伤模型中不同时间点各组的差异有统计学意义($F=8.036, P=0.000$)。缺血1 min, NGB mRNA表达量迅速增加,与对照组比较差异有统计学意义($P=0.017$);缺血5 min, NGB mRNA表达达高峰,与对照组比较差异有统计学意义($P=0.000$);10~15 min开始降低,但仍保持在高水平,与对照组比较差异有统计学意义(10 min, $P=0.001$; 15 min, $P=0.038$);20~30 min已迅速降低,但仍高于对照组,与对照组相比差异无统计学意义(20 min, $P=0.269$; 30 min, $P=0.402$);60 min相对于对照组水平略有降低,与对照组相比差

异无统计学意义 ($P = 0.384$) (表 1)。

表 1 半定量 RT-PCR 检测大鼠视网膜缺血损伤 NGB mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of neuroglobin mRNA in retina after hypoxic-ischemic retinal injury ($\bar{x} \pm s$)

Time after operation (minute)	NGB	P
Control	1.54 ± 0.08	
1	1.83 ± 0.27 ^b	0.017
5	2.15 ± 0.30 ^c	0.000
10	1.96 ± 0.17 ^c	0.001
15	1.79 ± 0.11 ^b	0.038
20	1.66 ± 0.12	0.269
30	1.63 ± 0.13	0.402
60	1.43 ± 0.16	0.384
F	8.036	
P	0.000	

^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs control group (One-way ANOVA, Dunnett *t* test)



图 1 脑红蛋白及 β -actin 的 RT-PCR 产物琼脂糖电泳凝胶电泳图 1: marker 2: 正常对照组 3: 缺血 1 min 4: 缺血 5 min 5: 缺血 10 min 6: 缺血 15 min 7: 缺血 20 min 8: 缺血 30 min 9: 缺血 60 min

Fig. 1 Neuroglobin and β -actin expression in hypoxic-ischemic retinal injury of rats 1: marker 2: normal control 3: hypoxic-ischemic injury for 1 minute 4: hypoxic-ischemic injury for 5 minutes 5: hypoxic-ischemic injury for 10 minutes 6: hypoxic-ischemic injury for 15 minutes 7: hypoxic-ischemic injury for 20 minutes 8: hypoxic-ischemic injury for 30 minutes 9: hypoxic-ischemic injury for 60 minutes

3 讨论

人 NGB 基因^[6]位于染色体 14q24, 在高级脊椎动物 NGB 基因是一种高度保守的基因, 其相对分子质量约为 17 000, 主要以单体形式存在于神经细胞中。NGB 在大多数中央和周围神经细胞中均有表达^[7], 在外周神经系统和代谢活跃的内分泌组织 (如肾上腺和垂体) 以及一些其他组织 (如肝、肾、心肌和骨骼肌等) 也有表达^[8]。NGB 仅在脑和视网膜的神经元中表达, 在胶质细胞中无表达^[9-10]。视觉系统中, 除色素上皮层和光感受器外节, NGB 分布于视网膜全层, 主要集中于视网膜丛状层和光感受器内节的椭圆体中, 这些均与视网膜的耗氧和线粒体的亚细胞定位相一致^[11]。

还有研究发现, NGB 在虹膜、睫状体和视神经中亦有一定的表达, 而且其黄斑区域的含量明显高于其他部位, 由于黄斑是视功能最重要的区域, 因此进一步地支持了 NGB 与视网膜耗氧有关的假设^[12]。此外, 通过免疫荧光和电镜技术检测正常人眼视网膜和末期青光眼患者的视网膜切片发现, 在末期青光眼患者视网膜的丛状层和光感受器内节以及核层 NGB 表达增强, 而在视网膜其他层很少表达。并提示在视网膜病理因素 (如低氧、缺血和氧化应激) 作用的过程中 NGB 可能起到保护作用^[13]。

视网膜是人体中耗氧量最大的组织, 缺氧将直接导致视觉传导过程的严重障碍。临床上常见的青光眼、糖尿病视网膜病变、视网膜中央动脉、静脉阻塞等疾病的发生发展都与视网膜缺氧有关系。本研究测量了高眼压诱导的大鼠视网膜急性缺血不同时间 NGB mRNA 表达量的变化, 结果发现 NGB mRNA 的表达呈现时相性变化, 视网膜缺血后 NGB 转录水平迅速增高, 说明 NGB 对缺氧的反应非常敏感, 提示该基因有可能在视网膜缺氧的适应性保护过程中起重要作用。缺血缺氧条件下, NGB 的反应性升高可能加速氧向神经组织及在神经组织中的转运, NGB 贮存氧的释放可能在一定程度上延缓神经细胞的死亡以及增强对缺氧的耐受性。因此, 推测缺血 1 ~ 15 min 这一阶段为神经细胞缺血缺氧代偿期, 视网膜缺血缺氧条件下, NGB 可能通过其结合氧的释放及基因转录加速其内源性表达增加 2 个途径缓冲缺氧程度。但机体的代偿是有限的, 20 min 时 NGB 的表达量开始下降, 但仍高于正常对照组, 到 60 min 后 NGB 的表达下降至正常水平以下, 推测此时由于持续缺血缺氧已渐渐进入失代偿期, 严重的缺氧已经不能引起 NGB 表达的明显改变, 神经元开始出现不可逆性改变。这与 Smith 等^[14]和 Johnson 等^[15]的研究发现升高眼压至 110 mmHg 造成大鼠视网膜缺血的组织学耐受时间为 15 min 相一致。视网膜缺氧缺血性损伤一直是临床上难以解决的问题, 目前研究大多集中在缺氧缺血后引起的形态学改变及代谢改变, 如细胞内 Ca^{2+} 超载产生的损伤作用、刺激性氨基酸的毒性、自由基的氧化作用等, 保护剂的研究也围绕这几个方面, 如钙拮抗剂、刺激性氨基酸拮抗剂、自由基清除剂及抗氧化剂等^[16], 另外, 一些细胞因子, 如脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子、碱性成纤维细胞生长因子及热休克蛋白 70 等也被应用于保护剂的研究, 结果并不理想。NGB 这一对氧转运和氧储存起重要作用分子的发现, 为缺氧及缺血损伤的研究提供了全新的方向, 使我们有可能在缺氧的极

早期就利用此携氧载体干预缺氧的发生和发展,为临床上常见且难治的视网膜缺血缺氧性疾病的预防和治疗带来新的希望。

参考文献

1 Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. Nature, 2000, 407: 520 - 523

2 Schmidt M, Giessel A, Laufs T, et al. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 1932 - 1935

3 Buchi ER, Suivaizdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rat: an experimental model for quantitative study[J]. Ophthalmologica, 1991, 203: 138 - 147

4 Buchi ER. Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischemia-reperfusion insult: an electron microscopical study in ganglion cell layer and inner nuclear layer[J]. Exp Eye Res, 1992, 55: 605 - 612

5 张成岗, 李林, 邓美玉, 等. 大鼠神经蛋白基因编码区的克隆、多态性分析及该基因组织表达谱分析[J]. 遗传学报, 2001, 28: 997 - 1001

6 Zhang C, Wang C, Deng M, et al. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290: 1411 - 1419

7 Sylvia W, Laufs T, Schmidt M, et al. Localization of neuroglobin protein in the mouse brain[J]. Neurosci Lett, 2003, 346: 114 - 116

8 王航雁, 邓美玉, 王静, 等. 脑红蛋白基因在人体不同细胞组织中的

表达[J]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19: 278 - 280

9 Laufs TL, Wystub S, Reuss S, et al. Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals[J]. Neurosci Lett, 2004, 362: 83 - 86

10 Ostojic J, Sakaguchi DS, de Lathouder Y, et al. Neuroglobin and cytoglobin: oxygen-binding proteins in retinal neurons[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 1016 - 1023

11 Schmidt M, Laufs T, Reuss S, et al. Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye[J]. Neurosci Lett, 2005, 374: 207 - 211

12 李耀宇, 刘惠玲, 童绎, 等. 脑红蛋白在大鼠眼球中分布的免疫组织化学研究[J]. 眼科研究, 2006, 5: 461 - 464

13 Rajendram R, Rao NA. Neuroglobin in normal retina and retina from eyes with advanced glaucoma[J]. Br J Ophthalmol, 2007, 91: 663 - 666

14 Smith GG, Baird CD. Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure[J]. Am J Ophthalmol, 1952, 35: 133 - 136

15 Johnson AR, Gregson NA, Wigley CB, et al. The regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons in vitro[J]. Biochem Soc Trans, 1988, 16: 440 - 441

16 周跃华, 李志辉, 孙葆忱. 缺血性视网膜损伤机制的研究[下]—损伤的机制和治疗[J]. 国外医学. 眼科学分册, 1999, 23: 105 - 109

(收稿:2008-12-10 修回:2009-07-18)

(本文编辑:王莉红)

读者·作者·编者

英文参考文献著录的注意事项

按照我国出版物中的文后参考文献的著录规则,英文的参考文献主要涉及主要责任者、题名、版本、出版项(出版地、出版者、出版日期)、期刊名称、出版年、卷(期)和页码等信息。

1 主要责任者的著录方法

1.1 个人著者采用姓在前用全称,名在后用缩写的著录形式。一般来说,国外作者在发表文章时常采用名前姓后的形式,所以作者在著录参考文献时应注意交换原文中作者姓名的书写顺序。

1.2 姓名中若表示“小”或“几世”时,应将其放置于姓名最后,并用逗号隔开,如 Day FW, Jr。

1.3 西方人姓名中的 von, van, de, la 为姓的组成部分,当其移至前面时,首字母大小写均可,如 von Hindenberg P。

1.4 如姓名中出现复姓时,著录格式为夫姓-妇姓在前均用全称,名在后用缩写的形式。

1.5 著作方式相同的责任者不超过3人时,可全部照录。责任者超过3人时,只著录前3位责任者,其后加“et al”字样。

1.6 集体责任者,可直接按照著录来源著录,每个词的首字母大写。

2 题名和出版项的著录方法

2.1 题名 包括书名和刊名。作者书写刊名时可采用国际上通行刊名缩写的方法。有以下规则供作者参考:1个单音节或5个以下字母组成的词不缩写;由一个单独的词构成的刊名不缩写(如 Ophthalmology);一般可从缩写刊名中删除英文的虚词;参考各英文期刊惯用的缩写刊名。题名的字母大小写可参考拟投稿期刊的格式要求。

2.2 出版项 参考文献的出版项按出版地、出版者和出版年顺序著录。如 New York: Academic Press, 1978。

2.2.1 出版地 即出版者所在的城市名称。原著作中若著有多个出版地时,只著录一个处于明显位置的出版地。原著作无出版地时,应注明[s. l.]字样(出版地不详)。

2.2.2 出版者 可按照原著作中的形式、公认的简化形式或缩写形式著录。原著作中若著有多个出版者时,只著录一个处于明显位置的出版者。无出版者时应注明[s. n.]字样(出版者不详)。

2.2.3 出版日期 以阿拉伯数字著录。

(本刊编辑部)