

MNU 诱导视网膜变性大鼠 bax 和 bcl-xl 的表达及意义

陈金卯 杨锦南 林少春 吴开力

Expression and significance of bcl-xl and bax mRNA in rats with MNU-induced retinal degeneration

Chen Jinmao, Yang Jinnan, Lin Shaochun, Wu Kaili. Affiliated First Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract Objective It is indicated that apoptosis of photoreceptors can be induced in rats by intraperitoneal injection of N-methyl-N-nitrosourea (MNU). Researches demonstrated that bax has a promoting effect and bcl-xl has the inhibitory effect on cellular apoptosis. Present study was to detect bcl-xl and bax mRNA expression in rats with retinal degeneration induced by MNU and discuss its significance in apoptosis of photoreceptor cells. **Methods** 40 mg/kg of MNU was intraperitoneally injected to establish the models of retinal degeneration in 30 50-day female SD rats. The animals were sacrificed and eyeballs were extracted in 12 hours, 1 day, 2, 3, 5 days after MNU injection. Expression of bcl-xl mRNA and bax mRNA in normal control group and every model group were detected by Real-Time PCR. Simultaneously, apoptosis was marked with TUNEL in all groups. **Results** Apoptosis of photoreceptor was found in 12 hours after injection of MNU. Apoptosis rate of photoreceptors was $(19.2 \pm 5.2)\%$, $(36.8 \pm 6.8)\%$, $(81.1 \pm 9.7)\%$, $(51.9 \pm 8.4)\%$, $(38.1 \pm 10.7)\%$ in 12 hours, 1 day, 2, 3, 5 days after MNU injection. Bcl-xl mRNA was expressed in normal retina with the amount 25.00×10^6 . After MNU injection, the bcl-xl mRNA level was gradually declined with the number 9.71×10^6 , 8.57×10^6 , 5.44×10^6 , 10.39×10^6 , 10.93×10^6 in 12 hours, 1 day, 2, 3, 5 day respectively. Bax mRNA expression in retina could be detected in normal control group (4.02×10^4), and in the different time points above-mentioned, the expression of bax mRNA in retina was 13.31×10^4 , 42.42×10^4 , 27.17×10^4 , 10.83×10^4 , 7.03×10^4 respectively. The bax/bcl-xl value was 1.00, 8.52, 30.78, 31.06, 6.48 and 4.00 in normal group, MNU 12 hours group, MNU 1 day group, MNU 2 days group, MNU 3 days group, MNU 4 days group, MNU 5 days group respectively. **Conclusion** Bcl-xl and bax may play an important role in the MNU-induced retinal degeneration.

Key words N-methyl-N-nitrosourea; retinal degeneration; bax; bcl-xl

摘要 目的 检测 bax 和 bcl-xl 在 N-甲基-N-亚硝脲 (MNU) 诱导的视网膜变性大鼠中的表达, 并探讨其在光感受器细胞凋亡中的意义。 **方法** 采用 Real-Time PCR 法检测正常组和 MNU 腹腔注射后 0.5、1、2、3、5 d 大鼠视网膜中 bax 和 bcl-xl 的表达, TUNEL 法检测各组大鼠视网膜细胞的凋亡。 **结果** 正常组视网膜中可检测到 bax 和 bcl-xl 的表达, MNU 处理后 0.5 d, bax 表达上升, 第 1 天达顶峰, 第 5 天仍高于正常组; MNU 处理后 12 h, bcl-xl 表达下降, 第 2 天达低谷, 第 5 天仍低于正常组。正常组未见 TUNEL 阳性细胞, MNU 处理后 12 h, 外核层见少量 TUNEL 阳性细胞, MNU 处理后第 2 天阳性细胞达顶峰, 随后逐渐减少, 第 5 天外核层仍有少量阳性细胞。 **结论** bax 和 bcl-xl 表达量的变化可能在 MNU 诱导的视网膜变性发病机制中起着重要作用。

关键词 N-甲基-N-亚硝脲; 视网膜变性; bax; bcl-xl

分类号 R 774.1⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0844-04

本课题为国家自然科学基金资助(30300467)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院眼科(陈金卯); 453003 新乡医学院药学院(杨锦南); 510060 广州, 中山大学中山眼科中心(林少春、吴开力)

通讯作者: 陈金卯 (Email: sportscjm@163.com)

研究证实, N-甲基-N-亚硝脲 (N-methyl-N-nitrosourea, MNU) 腹腔注射可选择性地作用于光感受器细胞, 导致其发生凋亡^[1-3]。bax 和 bcl-xl 是 bcl-2 蛋白家族中的两种重要基因, bax 具有促进细胞凋亡

的作用,而 bcl-xl 对细胞凋亡起抑制作用。本研究旨在探讨 bax 和 bcl-xl 表达量的变化与 MNU 诱导的光感受器细胞凋亡之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分组与造模 出生后 50 d 的雌性 SD 大鼠 36 只(广州中医药大学实验动物中心提供),随机数字表法分组。30 只雌性 SD 大鼠生后第 50 天行腹腔注射 MNU(40 mg/kg)建立视网膜变性模型。于 MNU 造模后 0.5、1、2、3、5 d 各处死 6 只动物,摘除双侧眼球。6 只大鼠作为正常对照组,出生后第 55 天时处死,摘除双侧眼球。左侧眼球置于固定液中固定,行 TUNEL 法检测各组大鼠光感受器细胞凋亡情况;右侧眼球摘除后立即分离视网膜,每组样本提取总 RNA。

1.1.2 主要试剂及仪器 MNU(美国 Sigma 公司), -20°C 避光保存,临用前用生理盐水配制为所需质量浓度;原位末端标记细胞凋亡检测试剂盒(德国 Roche Applied Science 公司);蛋白酶 K(广州宝泰克公司);bax 羊抗大鼠单克隆抗体、bcl-xl 羊抗大鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司);生物显微镜(日本 Olympus 公司);全自动图像分析系统(Kontron IBAS 2.0,德国 Zeiss 公司);彩色图像摄录输入仪(Axioplan2 imaging,德国 Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 TUNEL 检测 按细胞凋亡检测试剂盒操作要求进行。计数方法参照 Valter 等^[4]的方法并加以改进,400 倍镜下自视盘旁开始向锯齿缘方向连续取 4 个视野,记录每个视野中 TUNEL 阳性细胞核数和光感受器细胞核总数,计算凋亡指数(apoptotic index, AI)。AI 以外核层中凋亡细胞核总数占同等视野外核层细胞核总数的百分比表示。 $\text{AI} = \text{外核层中凋亡细胞核总数} / \text{外核层细胞核总数} \times 100\%$ 。

1.2.2 Real-Time RT-PCR 用 Trizol 试剂提取视网膜总 RNA,紫外分光光度法测量样品的浓度和纯度。bax:上游引物 5'-TCCCCCGAGAGGTCTTCT-3',下游引物 5'-CCCAGTTGAAGTTGCCATCA-3',荧光探针 5'-FAM-CCGGGTGGCAGCTGACATGTTTG-TAMRA-3'; bcl-xl:上游引物 5'-GCCACAGCAGCAGTTTGGAT-3',下游引物 5'-TCTCTCAGCGCTTGCTTCACT-3',荧光探针 5'-FAM-CGCGGGAGGTACTCCCCATG-TAMRA-3'。逆转录反应、质量控制、荧光定量 PCR 反应步骤见文献^[5]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,5 个组 TUNEL 标记的阳性细胞核数的总体比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠视网膜细胞的凋亡

正常对照组未见 TUNEL 标记的阳性细胞核。MNU 作用 0.5 d 后,光感受器细胞发生凋亡,视网膜外核层检测到阳性凋亡细胞核,1 d 时阳性细胞核增多,2 d 时达高峰,随后逐渐减少,5 d 时见少量阳性细胞核(图 1)(表 1)。神经节细胞层和内核层未见 TUNEL 阳性细胞核。1 d 组与 5 d 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),3 d 组与 1 d 组、3 d 组与 5 d 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 MNU 作用不同时间组视网膜细胞的凋亡指数($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 1 The apoptosis rate of retinal cells in MNU model($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	n	Apoptosis rate
0.5 d	6	19.2 ± 5.2
1 d	6	36.8 ± 6.8 ^{bc}
2 d	6	81.1 ± 9.7 ^{ch}
3 d	6	51.9 ± 8.4 ^c
5 d	6	38.1 ± 10.7 ^{bc}
F		45.29
P		<0.01

^b $P < 0.05$ vs 3 d group, ^c $P < 0.05$ vs 0.5 d group, ^h $P < 0.05$ vs 1 d group (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

2.2 Real-Time RT-PCR 检测结果

因每只鼠样品量太少,故每组 6 个鼠样品集中为 1 份进行检测。正常组 bcl-xl mRNA 的表达量为 25.00×10^6 。MNU 腹腔注射后 0.5、1、2、3、5 d,视网膜中 bcl-xl mRNA 表达量分别为 9.71×10^6 、 8.57×10^6 、 5.44×10^6 、 10.39×10^6 、 10.93×10^6 。正常组 bax mRNA 的表达量为 4.02×10^4 。MNU 腹腔注射后 0.5、1、2、3、5 d 各时间点,视网膜中 bax mRNA 表达量分别为 13.31×10^4 、 42.42×10^4 、 27.17×10^4 、 10.83×10^4 、 7.03×10^4 。Bax/bcl-xl 比值:将正常组二者比值记为 1, MNU 处理后 0.5 d,二者比值升至 8.52(相当于正常组的 8.52 倍),1 d 时达 30.78,2 d 时达最高点 31.06,3 d 时降至 6.48,5 d 时为 4.00(表 2)。

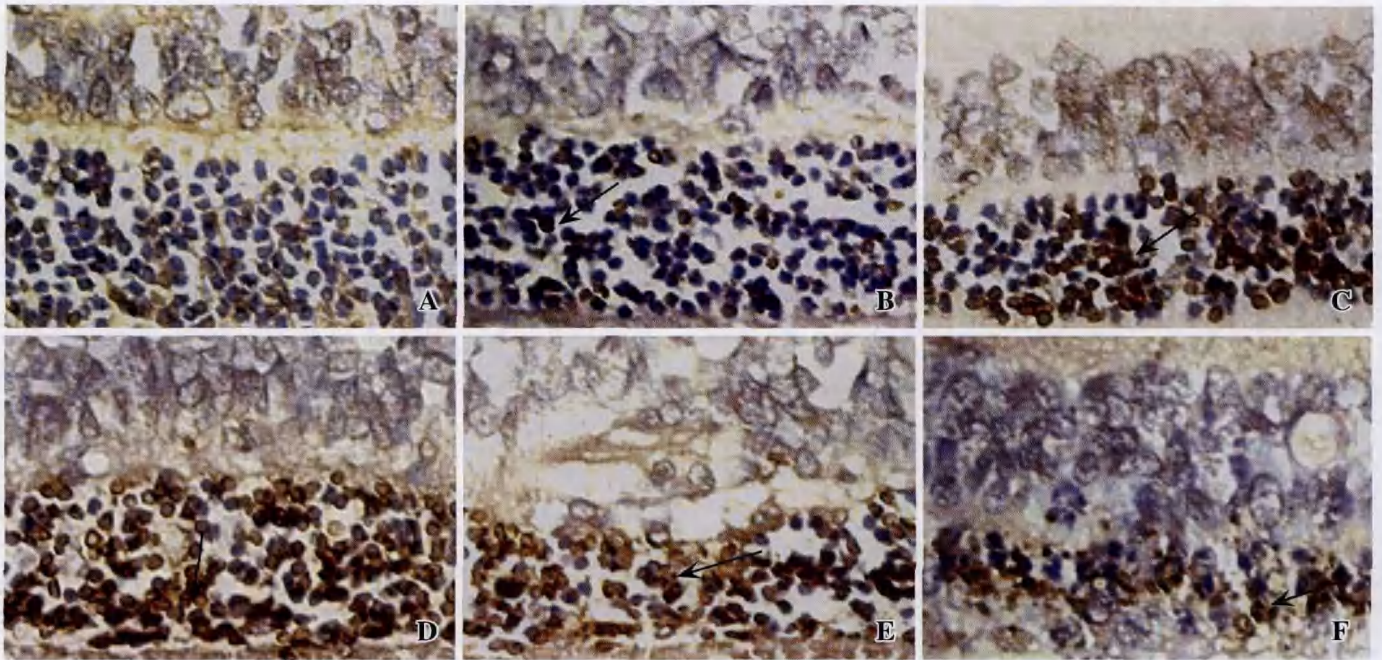


图1 TUNEL法检测视网膜细胞凋亡(×400) A:正常对照组未见TUNEL标记的阳性细胞核 B:MNU处理0.5d后,光感受器细胞开始发生凋亡,视网膜外核层检测到阳性凋亡细胞核 C:MNU处理1d时,外核层阳性细胞核增多 D:MNU处理2d时,外核层阳性细胞核达高峰 E:MNU处理3d时外核层仍见大量阳性细胞核 F:MNU处理5d时外核层见少量阳性细胞核

Fig.1 Detect of apoptosis of photoreceptor by TUNEL(×400) A:No positive apoptotic karyon was detected in normal control group B:A few positive cells were detected in retinal outer nuclear layer 12 hours after MNU injection C:The number of positive cells increased in retinal outer nuclear layer 1 day after MNU injection D:The number of positive cells peaked in retinal outer nuclear layer 2 days after MNU injection E:A large number of positive cells could be detected in retinal outer nuclear layer 3 days after MNU injection F:A few positive cells were still detected in retinal outer nuclear layer 5 days after MNU injection

表2 Real-Time PCR检测大鼠视网膜 bcl-xl 和 bax mRNA 的表达

Table 2 Bcl-xl and bax mRNA expression of retina in SD rat detected by Real-Time PCR

Group	bcl-xl				bax		
	Ct ₁	Qty ₁ (e+6)	A ₁ (e+6)	bcl-xl / bax	Ct ₂	Qty ₂ (e+4)	A ₂ (e+4)
Normal control	22.29	6.09	25.00	1.00	25.16	0.98	4.02
Injection 0.5 d	25.17	1.62	9.71	8.52	24.04	2.22	13.31
Injection 1 d	24.92	1.82	8.57	30.78	22.11	9.01	42.42
Injection 2 d	25.68	1.28	5.44	31.06	22.58	6.39	27.17
Injection 3 d	24.34	2.37	10.39	6.48	23.89	2.47	10.83
Injection 5 d	28.09	0.42	10.93	4.00	26.93	0.27	7.03

Ct: circle threshold, Qty: initial copy/μL Cdna, A: copy/μg total RNA, (e+n): ×10ⁿ

3 讨论

MNU 诱导光感受器细胞发生凋亡的机制可能与立早基因表达、caspase-3 上调和细胞因子分泌等有关^[6-8]。探讨 bcl-2 基因家族是否在 MNU 诱导光感受器细胞凋亡中发挥重要作用是本研究的目的。

Gauthier 等^[9]和 Mastrangelo 等^[10]的研究表明,在凋亡的早期阶段线粒体通透性转运孔开放,凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)和细胞色素 C 外

流入细胞质,被认为是凋亡发生的关键事件。Bcl-2 基因家族成员可调节这一关键步骤,bcl-2 和 bcl-xl 能阻止线粒体通透性转运孔开放,在抑制细胞凋亡的发生中起重要作用。细胞受外部刺激时,bcl-xl 可阻止线粒体释放 AIF 和细胞色素 C 而抑制细胞凋亡的发生;bax 是重要的异二聚体伴分子,生物活性与 bcl-xl 相反,可促进细胞内 AIF 和细胞色素 C 释放,从而促进细胞凋亡。bax 在组织中广泛表达,包括在细胞正常成熟过程中发生死亡的许多部位均有表达。死亡信号能激活 bax,使 bax 从细胞浆移位到线粒体膜上。在哺乳动物中 bcl-xl 必须与 bax 结合,形成异源二聚体而抑制细胞凋亡;当 bcl-xl、bcl-2 与 bax 的结合点断裂时,对细胞的保护作用消失。Bcl-xl 和 bax 二者的比值在一定程度上可反映细胞的凋亡趋势。

本研究结果提示,MNU 腹腔注射后 0.5 d 视网膜中 bax mRNA 表达量上升,第 1 天时最高,达正常组表达量的 10 倍,此后逐渐下降,第 5 天表达量仍约为正常组的 2 倍。MNU 腹腔注射后 0.5 d 视网膜中 bcl-xl mRNA 的表达量下降,第 2 天降至最低,表达量约为正常组的 1/5,此后缓慢回升,第 5 天表达量约为正常组的 2/5。bax/bcl-xl 比值在 MNU 腹腔注射后 0.5 d 显

著上升,第 2 天升至最高,为正常组的 31.06 倍,2 d 后开始下降,5 d 时仍为正常组的 4 倍。

TUNEL 结果显示,MNU 处理后 12 h 外核层细胞可见阳性细胞核,2 d 时阳性细胞核最多,此后逐渐减少,5 d 时见少量阳性细胞核,其变化趋势与 bax/bcl-xl 比值变化相似,即 bax/bcl-xl 比值升高,外核层细胞凋亡百分率增加,bax/bcl-xl 比值降低,外核层细胞凋亡百分率减少。由此,本研究推测 MNU 腹腔注射所导致的外核层改变可能是由于 bax/bax 同源二聚体增多而启动了凋亡程序;而 bcl-xl 的表达下降,无法形成比 bax/bax 同源二聚体更稳定的 bax/bcl-xl 异源二聚体而阻止凋亡,这符合 bax 和 bcl-xl 二聚体的比例决定细胞凋亡走向的观点。

综上所述,在 MNU 诱导的视网膜变性大鼠模型中,bax 和 bcl-xl 表达量的变化可能与光感受器细胞的凋亡有着密切的联系。

参考文献

1 Nakjima M, Yuge K, Senzaki N, et al. Photoreceptor apoptosis induced by a single systemic administration of N-methyl-N-nitrosourea in the rat

retina[J]. Am J Pathol, 1996, 148: 631 - 641

2 陈金卯,杨锦南,李岱,等.腹腔注射 MNU 对大鼠视网膜结构与功能的影响[J].眼科新进展,2004,24(5):349-351

3 Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, et al. Early remodeling in an inducible animal model of retinal degeneration[J]. Neuroscience, 2009, 160(2):517-529

4 Valter K, Maslim J, Bowers F, et al. Photoreceptor dystrophy in the RCS rats: role of oxygen, debris, and bFGF[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39: 2427 - 2442

5 陈金卯,杨锦南,林少春,等.荧光定量聚合酶链反应法检测光感受器细胞凋亡大鼠视网膜半胱氨酸蛋白酶 3 mRNA 的表达[J].中国临床康复,2006,10(26):95-97

6 杨锦南,石如玲,林少春,等.即早基因在 N-甲基-N-亚硝脲诱导 SD 大鼠视网膜变性中的表达[J].中国药理学通报,2005,21:1065-1069

7 陈金卯,胡世兴,邓新国,等. Caspase-3 在 MNU 诱导的视网膜变性大鼠中的作用[J].眼科研究,2005,23(3):238-240

8 王芳,万瑾,肖虹蕾,等. N-甲基-N-亚硝脲诱导的大鼠视网膜感光细胞损伤模型中 Müller 细胞增殖和细胞因子分泌的变化[J].解剖学杂志,2007,30:171-173

9 Gauthier ER, Piche L, Lemieux G. Role of bcl-xl in the control of apoptosis in murine myeloma cells[J]. Cancer Res, 1996, 56(6):1451-1456

10 Mastrangelo AJ, Zou S, Betenbaugh MJ. Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults[J]. Biotech Bioengin, 2000, 67(5):555-564

(收稿:2009-06-16 修回:2009-08-28)

(本文编辑:王莉红)

· 病例报告 ·

脑出血后单侧枕叶梗死继发视神经萎缩一例

毛俊峰 魏世辉

枕叶梗死主要以中枢性眼部表现为特征,很少出现视神经萎缩。现将我们收治的 1 例脑出血后继发枕叶梗死随诊中发现双眼视神经萎缩的病例报告如下。

患者,男,30 岁。2007 年 11 月 23 日突然出现头晕、头痛、烦躁不安,继而昏睡、神智不清,在青岛市立医院行头颅 CT、MRI 检查后诊断为左侧颅内血肿,给予甘露醇、地塞米松及止血等治疗。2007 年 12 月 3 日行左侧开颅血肿清除联合去骨瓣减压术,手术顺利。术后 20 d,患者清醒后发现双眼视力下降,以左眼明显,无眼红、眼胀、眼痛及复视。请眼科会诊,查视力右眼 0.4、左眼 0.1,眼底无明显异常,考虑视力下降与颅内血肿有关,未进行深入检查,给予营养神经等治疗,效果不明显。2008 年 5 月 7 日在青岛市立医院行颅脑 MRI 检查发现左枕叶软化灶,考虑患者视力下降是颅内血肿继发枕叶梗死所致,查视力右眼 0.4、左眼 0.2,双侧瞳孔直径 3 mm、对光反应灵敏, RAPD 阴性,视盘色淡红、边界清楚。2008 年 5 月 10 日行自体颅骨修补术。颅骨修补 4 个月后发现双眼视力下降加重,在哈尔滨医科大学附属第一医院诊断为双眼视神经萎缩,视力右眼 0.2、左眼 0.1,无瞳孔改变,双眼视盘色白,边界清楚,中心 30°视野

示双眼右侧同向偏盲,伴黄斑分裂,继续保守治疗。2008 年 12 月 22 日头颅 CT 回报左侧额叶、颞叶、顶叶术后改变,枕叶梗死。2009 年 3 月 9 日就诊于中国人民解放军总医院眼科。否认高血压、糖尿病、心脏病史;否认眼病史。眼科检查:视力右眼 0.2、左眼 0.1,矫正无助;双侧角膜透明,瞳孔直径 3 mm,直接和间接对光反应灵敏,相对性传入性瞳孔障碍(RAPD)阴性;晶状体透明;双眼视盘色白、边界清楚,视网膜未见出血、渗出及水肿;眼球运动不受限;眼压右眼 12 mmHg,左眼 11 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。实验室检查:红细胞 $4.0 \times 10^{12}/L$,白细胞 $6.9 \times 10^9/L$,血小板 $210 \times 10^9/L$,凝血功能正常,血沉及 C 反应蛋白均正常。特殊检查:头颅 CT 示左侧额叶、颞叶内见数个高密度灶(2007 年 11 月 25 日,术前)(图 1);左侧大片颅骨缺损,额叶、颞叶及顶枕叶交界区见数片低密度灶(2007 年 12 月 12 日,术后)(图 2)。颅脑 MRI 示左额叶不规则的高低混杂信号影(图 3),T₂表现为血肿呈极低信号影(图 4)(2007 年 11 月 26 日,术前);左枕叶大片软化灶,T₂表现为高信号,左额叶见小片高信号影(图 5),左颞叶大片高信号影(图 6)(2008 年 5 月 7 日,术后)。P-VEP(2009 年 3 月 11 日)示双眼 P100 波的波幅降低,潜伏期延长。中心 30°视野示双眼右侧同向偏盲、伴黄斑分裂(2009 年 3 月 9 日)。眼底照相(2009 年 3 月 13 日)示双眼视盘色白、边界清楚(图 7,8)。颈动脉、椎动脉及心脏

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院眼科(毛俊峰,进修医师,现在中南大学湘雅医院眼科,长沙 410008)

通讯作者:魏世辉 (Email: weishihui706@sohu.com)