

葡萄糖调节蛋白在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的时相性表达及意义

李漫丽 吴雅臻 戚卉 范斌 张小猛

Phase expression of glucose-regulated protein in rat retina induced by ischemic reperfusion injury

LI Man-Li, WU Ya-Zhen, QI Hui, FAN Bin, ZHANG Xiao-Meng

[Key words] glucose-regulated protein; ischemic reperfusion injury; retina; endoplasmic reticulum stress

[Abstract] Objective To observe the expression of glucose-regulated protein 78 (grp78) in the rat retina induced by ischemic reperfusion injury, and investigate the possible effect of endoplasmic reticulum stress in the ischemic process. **Methods** Thirty-six wistar rats were equally divided into 6 groups randomly; normal control group and 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours after ischemic reperfusion groups, 6 rats in each group. The rat retinal ischemia reperfusion model was established by acute elevated intraocular pressure through normal saline intracameral perfusion (110 mmHg × 60 min, 1 kPa = 7.5 mmHg). The expression of grp78 in rats retina was detected by immunohistochemistry and semiquantitative RT-PCR methods at the different time points. The average optical density was statistically analyzed by SPSS software.

Results The expression of grp78 was mainly located in retinal ganglion cell layer and inner nuclear layer. The expression of grp78 began to increase and augmented gradually at 6 hours ($A: 0.778 \pm 0.004$) after reperfusion compare with control ($A: 0.756 \pm 0.007$) ($P < 0.05$). The highest level of expression was reached at 24 hours ($A: 0.851 \pm 0.040$) after reperfusion comparing with hour 12 ($A: 0.799 \pm 0.010$) ($P < 0.01$). The level then began to decrease at hour 48 ($A: 0.825 \pm 0.007$) comparing with hour 24 ($P < 0.05$), but still higher than control ($P < 0.01$). There was no significant grp78 expression between hour 72 and control. **Conclusion** Grp78 participate the process of retina ischemic reperfusion injury. It can provide theoretical data for clinical treatment, if we interfere endoplasmic reticulum stress at the early stage.

[Rec Adv Ophthalmol 2008; 28(1): 29-32]

【中图分类号】 R774; Q959.836 【文献标识码】 A

【文章编号】 1003-5141(2008)01-0029-04

【关键词】 葡萄糖调节蛋白; 缺血再灌注损伤; 视网膜; 内质网应激

[摘要] 目的 检测葡萄糖调节蛋白 (glucose-regulated protein 78, grp78) 在大鼠视网膜缺血再灌注后不同时期的表达情况, 探讨内质网应激在视网膜缺血再灌注损伤中的作用及机制。方法 36只 Wistar 大鼠随机分为6组: 缺血再灌注6 h、12 h、24 h、48 h和72 h组, 以及正常对照组, 每组6只大鼠。缺血组大鼠均行单眼生理盐水前房高压灌注 (110 mmHg × 60 min, 1 kPa = 7.5 mmHg) 的方法建立视网膜缺血再灌注模型, 用免疫组织化学和半定量 RT-PCR 方法检测 grp78 在视网膜中的定位及时相性表达, 取各组平均光密度值进行统计分析。结果 grp78 在正常大鼠视网膜中少量表达, 主要分布于视网膜内核层和神经节细胞层, 免疫组织化学和 RT-PCR 检测均发现在视网膜缺血再灌注后6 h grp78 的表达量开始升高 (A 值为 0.778 ± 0.004 , 与正常对照组 0.756 ± 0.007 相比 $P < 0.05$); 再灌注后24 h 其表达量达到峰值 (A 值为 0.851 ± 0.040), 与正常对照组比较 $P < 0.01$, 与12 h组 (A 值为 0.799 ± 0.010) 相比 $P < 0.01$; 再灌注48 h grp78 表达开始下降 (A 值为 0.825 ± 0.007 , 与24 h 相比 $P < 0.05$), 但仍高于正常对照组 ($P < 0.01$); 72 h 组 grp78 的表达与正常组相比, 差异无统计学意义。结论 grp78 参与了大鼠视网膜缺血再灌注损伤机制, 若能在损伤早期内质网应激环节上加以干预, 可为临床治疗和干预提供一定的理论依据。

[眼科新进展 2008; 28(1): 29-32]

作者简介: 李漫丽, 女, 1980年6月出生, 河南洛阳人, 在读博士研究生, 研究方向为玻璃体视网膜疾病的临床和基础研究。联系电话: 0431-88766135 (O), 13578926929; E-mail: limanli1980@sina.com

About LI Man-Li: Female, born in June, 1980. Doctor degree. Tel: +86-431-88766135 (O), 13578926929; E-mail: limanli1980@sina.com

收稿日期: 2007-06-22

修回日期: 2007-08-20

本文编辑: 盛丽娜

作者单位: 130041 吉林省长春市, 吉林大学第二附属医院眼科

通讯作者: 吴雅臻, E-mail: wuyazhen@yahoo.com

Received date: Jun 22, 2007

Accepted date: Aug 20, 2007

From the Department of Ophthalmology, the Second Hospital Affiliated to Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China

Responsible author: WU Ya-Zhen, E-mail: wuyazhen@yahoo.com

视网膜缺血再灌注损伤 (retina ischemia reperfusion injury, RIR) 是

多因素综合作用的结果。内质网应激是指在缺血、缺氧或氧化应激等各

种因素使细胞内质网生理功能紊乱时,细胞启动的自我保护反应机制,它有利于细胞内环境稳态的恢复和维持细胞存活。近年来对于内质网应激与全身多种疾病发生发展的关系研究较多。视网膜结构复杂而且代谢旺盛,对缺血缺氧等刺激敏感,本实验采用大鼠 RIR 模型,观察内质网应激标志物—葡萄糖调节蛋白 (glucose-regulated protein 78, grp78) 在视网膜组织中的表达变化,探讨内质网应激在大鼠 RIR 中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 220 ~ 250 g。随机分成 6 组:视网膜缺血再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 组,以及正常对照组,每组 6 只大鼠。缺血组所有大鼠均行单眼生理盐水前房加压灌注制作视网膜缺血再灌注模型。每组各取 3 只大鼠取眼球做免疫组织化学及视网膜病理(HE)染色,另 3 只用半定量 RT-PCR 方法检测 grp78 mRNA 在视网膜中的表达。

1.2 主要试剂 兔抗鼠 grp78 多克隆抗体(美国 Stressgen 公司),免疫组织化学 Biotin SP-HRP Kit(北京中杉公司),Trizol (invitrogen 公司),M-MLV 逆转录酶、rTaq 酶(Takara 公司),引物设计合成、PCR Marker DL-2000(大连宝生物公司)。

1.3 缺血再灌注模型的建立 大鼠全身麻醉后,10 g · L⁻¹地卡因滴眼表面麻醉 2 次,侧卧固定,以 4.5 号输液器针头自大鼠颞侧角膜缘刺入前房,固定针头,针头远端连接于生理盐水瓶,升高输液平面至与动物垂直距离为 150 cm(110 mmHg, 1 kPa = 7.5 mmHg),可观察到球结膜苍白、前房加深、虹膜红色变淡,直接眼底镜下见视网膜血管缺血,约 10 min 后角膜水肿混浊,瞳孔散大,眼底红光反射完全消失,持续 60 min 后缓慢降低输液瓶,拔除前房针头,可见球结膜充血,眼底恢复红色反光,术前术后行局部抗感染处理。在缺血再灌注后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 分批处死大鼠,摘除眼球。

1.4 病理学观察 在不同时段分批处死大鼠,迅速摘取眼球放入体积分数 10% 中性甲醛中固定,常规洗涤、脱水、透明、浸蜡包埋。常规 HE 染色。

1.5 免疫组织化学染色 石蜡切片经常规脱蜡、复水;按照免疫组织化学试剂盒说明行常规过氧化物酶标记的链霉卵蛋白(SP)法染色,阴性对照采用 PBS 代替一抗。显微镜下观察视网膜组织中 grp78 的表达情况,染色阳性反应物质表现为棕黄色颗粒,每组标本取 5 张切片,每张切片取 5 个视野,数码照相机采集图像,用 Image-pro-plus 6.0 图像分析软件测定细胞平均光密度值(A 值),并取平均值进行统计学分析。

1.6 逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR) (1)总 RNA 提取:大鼠处死后立即摘除眼球,沿角巩膜缘撕

除角膜,小心拨除晶状体和玻璃体,完整分离视网膜,研磨后加入 1 mL trizol,按照 trizol 提取 RNA 方法提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 含量;(2) RT 反应:按照试剂盒说明书进行;(3) PCR 反应:grp78 引物序列为:上游:5'-AGCCACCGTAACAAT-CAAG-3',下游:5'-TCCAGCCATTGATCTTTTC-3',预计扩增片段长度为 445 bp,β-actin 用作内参照(片段长度 560 bp)。反应条件:95 °C 预变性 3 min;循环:95 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s,共 30 个循环;72 °C 再延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物,以 12 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳分离目的基因片段,溴化乙锭染色,在紫外灯下观察并摄片,经图像分析系统测定光密度值,采用半定量法,即 grp78 mRNA 的表达丰度等于 grp78 与 β-actin 光密度值(A 值)之比,取各组平均值进行统计学分析。

1.7 统计学处理 所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 软件包进行处理,各组之间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果 正常对照组大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)呈单层整齐排列,数目较多,内核层由 3 ~ 5 层细胞构成,染色深,外核层较厚,有 8 ~ 10 层细胞,排列紧密,染色深。缺血再灌注后 6 h,即出现 RGC 层和内核层细胞排列紊乱,12 h 组上述变化更加明显,视网膜明显水肿,细胞排列疏松而紊乱,较多 RGC 胞浆呈空泡样变;再灌注 24 h 后水肿仍较重,48 h 时水肿有所减轻;再灌注 72 h 后视网膜水肿已基本消退,可见 RGC 数目减少。

2.2 免疫组织化学染色结果 各组 grp78 免疫组织化学染色结果见图 1。正常大鼠视网膜中 grp78 弱阳性表达,主要分布于 RGC 层和内核层,缺血再灌注后 6 h grp78 的表达开始升高,其平均光密度值与正常对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),12 h 即可见 grp78 表达明显增多(与正常组相比, $P < 0.01$),grp78 的表达高峰出现在再灌注后 24 h(与 12 h 组相比, $P < 0.01$),再灌注后 48 h grp78 表达开始下降(与 24 h 相比, $P < 0.05$),但仍强于正常对照组($P < 0.01$);72 h 组 grp78 的表达与正常组相比,差异无统计学意义($P = 1.000$)。

2.3 RT-PCR 结果 各组视网膜 grp78 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果见图 2。由图 2 可见 PCR 扩增的 grp78 基因片段大小与预计的 445 bp 相符。各组光密度值相关性分析结果显示,正常大鼠视网膜中 grp78 mRNA 表达 A 值为 0.756 ± 0.007 ,视网膜缺血再灌注 6 h grp78 的表达开始迅速上升(A 值为 0.778 ± 0.004),与正常对照组相比 $P < 0.05$;再灌注 12 h 其表达继续上升(A 值 0.799 ± 0.010),与正常对照组相比 $P < 0.01$;到 24 h 达到高峰(A 值为 0.851 ± 0.040),与 12 h 组相比 $P < 0.01$;48 h 组表

达量有所下降(A 值为 0.825 ± 0.007), 与 24 h 相比 $P < 0.05$, 但仍高于正常对照组 ($P < 0.01$); 72 h 其

表达下降至对照组水平。

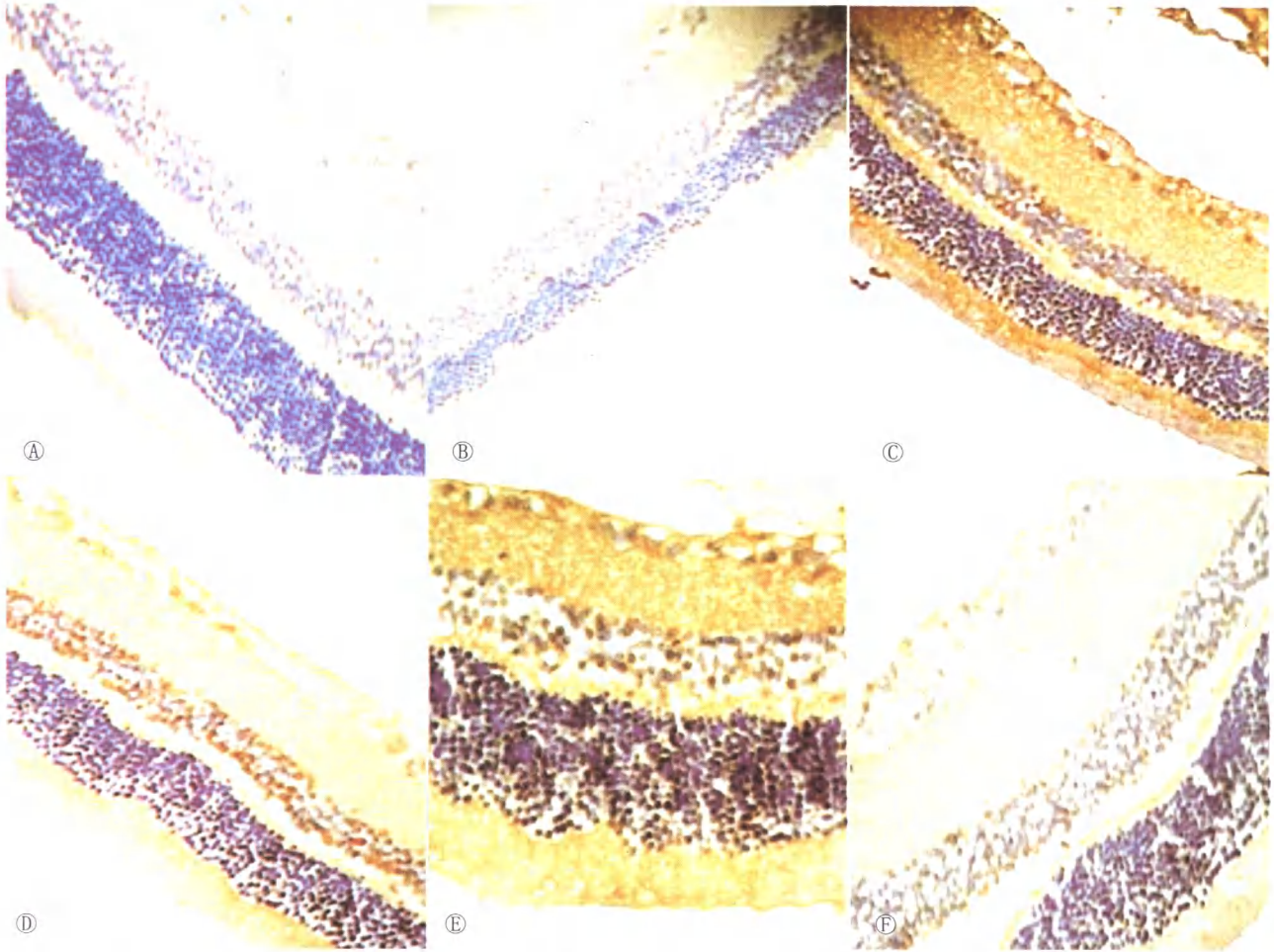


Figure 1 Expression of grp78 protein in retina (SP, $\times 400$). A: Control group; B ~ F: RIR-6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours groups 各
 组视网膜组织中 grp78 的表达情况 (SP, $\times 400$)。A: 对照组; B ~ F 分别表示缺血再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 组

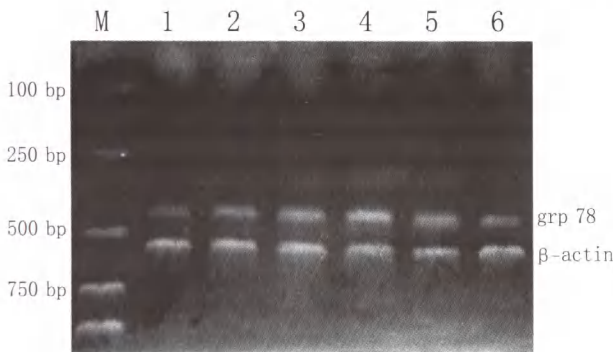


Figure 2 Expression of grp78 mRNA in retina. M: DNA marker; 1: Control group; 2-6: RIR-6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours groups 视网膜中 grp78 mRNA 的表达情况。M: 分子量标准; 1: 对照组; 2~6: 分别为缺血再灌注 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 组

蛋白。生理情况下, grp78 在基础水平表达, 主要功能作为分子伴侣参与新生多肽链的折叠、装配和转运^[1-2]; 缺血、缺氧、低糖、氧化应激、钙离子失衡等不利环境应激下, 大量多肽链在内质网内变性、积聚, 此时 grp78 的表达量显著增高, 一方面协助变性蛋白进行重新折叠、装配及跨膜转运, 缓解内质网压力, 另一方面将无法恢复的蛋白质转移给蛋白降解系统降解, 从而避免细胞进一步受到伤害, 此机制称为内质网应激反应^[3], 它提高了细胞在应激情况下的生存能力和促进应激后细胞康复。因此, grp78 被认为是内质网应激反应的标志性分子, 并且具有保护细胞、对抗细胞凋亡的作用。当这些机制不足以恢复内质网平衡时, 细胞将启动内质网相关的凋亡程序, 清除不健康或感染的细胞。grp78 的表达多少对决定应激细胞的结局 (如抵抗、适应、损伤或凋亡等) 有重要作用, 所以此方面的研究无论在科学理论还是在应用前景上都具有重大意义。

视网膜缺血性疾病是临床常见病, 其发病机制复杂, 有多种学说。在理论上, RIR 发病机制中的多

3 讨论

grp78, 又称免疫球蛋白重链结合蛋白, 与热休克蛋白 70 具有同源性, 是存在于内质网上最多的伴侣

种因素都与内质网应激关系密切^[4]；视网膜组织的缺血缺氧、再灌注时氧自由基在短期内爆发性增多，钙离子失衡，以及脂质过氧化反应等，都可以做为应激源激发内质网应激级联反应，引起 grp78 高表达^[5-6]。为了研究及证实内质网应激在视网膜缺血性疾病中的作用机制，本实验构建 RIR 模型，类似临床上的急性闭角型青光眼、视网膜动脉阻塞、高血压性视网膜病变等疾病，观察 RIR 后不同时段 grp78 的表达变化。结果显示，在正常视网膜组织中 grp78 少量表达，主要分布在 RGC 层和内核层，再灌注后 6 h grp78 mRNA 和蛋白表达均升高，24 h 表达升高达到高峰，48 h 后表达有所下降。此结果表明了 RIR 后 24 h 时内质网自稳系统的调节作用达到最佳水平，RIR 后 48 h grp78 的表达下降可能与缺血细胞的内质网稳态恢复有关，也可能是由于内质网自稳系统遭到了破坏，不能通过增加 grp78 的表达来结束内质网应激状态，细胞启动了凋亡通路^[7]。本实验结果表明 grp78 在视网膜中的表达部位和时间上的变化与 HE 染色观察到的视网膜损伤一致，即 RIR 后 24 h 视网膜水肿最重，组织损伤主要在 RGC 层和内核层，所以 grp78 的表达也在一定程度上反映了细胞的损伤程度；同时，由于 grp78 具有保护细胞、抵抗细胞凋亡的作用，此结果也提示了一种通过诱导内源性 grp78 生成来防御和治疗 RIR 性疾病的新思路^[8-9]。

(上接第 28 页)

浸润，炎性细胞具有产生 VEGF、促进血管形成的作用。在这些细胞中可见 VEGF 表达，因此，炎性细胞可能是 VEGF 的主要来源。此外，VEGF 的产生受缺氧、炎症介质和细胞因子等调节^[11]。本实验对照组中大量炎性细胞浸润，细胞密度增高造成局部微环境缺氧，缺氧导致 VEGF 上游的一些调控子如缺氧诱导因子 1 α 过量表达，从而使 VEGF 表达上调，促进血管形成以改善循环，调节缺氧组织的氧合作用。有研究表明，RAPA 的靶蛋白 mTOR (哺乳动物 RAPA 靶蛋白) 在缺氧触发的内皮细胞的增生中起关键作用^[3]，RAPA 治疗后 mTOR 的基因表达降低，同时角膜中的缺氧诱导因为 1 α 和 VEGFR-1 (flt-1) 基因表达下调，血清中的 VEGF 的含量降低。

综上所述，RAPA 能够抑制 VEGF 的产生，该机制可能是其抑制大鼠角膜移植排斥和血管形成的重要原因，提示该药在防治高危角膜移植排斥方面，具有重要的临床应用价值。

参考文献

- 董莹,黄一飞,王丽强,陈兵.雷帕霉素抑制大鼠角膜移植免疫排斥反应的实验研究[J].中华眼科杂志 2005;41(10):930-935.
- Kahan BD, Camardo JS. Rapamycin: clinical results and

总之,RIR 的发病机制是多因素的,若能在损伤早期内质网应激环节上加以干预,可为临床干预和治疗提供一定的理论依据。

参考文献

- Lee AS. The glucose-regulated proteins; stress induction and clinical applications [J]. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(8):504-511.
- 张莹,孙黎光. Grp78 的研究进展 [J]. 国外医学生理病理科学与临床分册 2005;25(3):251-253.
- Zhao LH, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease [J]. *Cur Opin Cell Bio* 2006;18:444-452.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies [J]. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(1):91-147.
- 祝筱梅,刘秀华. 内质网应激与缺血再灌注损伤及其保护 [J]. 国际病理科学与临床杂志 2006;26(2):177-181.
- 周跃华,李志辉,孙葆忱. 缺血性视网膜损伤机制的研究 [J]. 国外医学眼科学分册 1999;23(2):106-109.
- Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Smyth CA, Jenkins S, Thompson JA, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis [J]. *Surgery* 2005;138:342-351.
- Shintani-Ishida K, Nakajima M, Uemura K, Yoshida K. Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78 [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(4):1600-1605.
- Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis [J]. *Exp Neurol* 1999;155(2):302-314.
- future opportunities [J]. *Transplantation* 2001;72(7):1181-1193.
- Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD. Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation [J]. *Br J Pharmacol* 2006;149(2):137-144.
- Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(2):454-460.
- 董莹,黄一飞. CD40-CD154 共刺激信号及其在角膜移植排斥中的研究进展 [J]. 眼科新进展 *Yanke Xinzhan* 2005;25(3):289-291.
- Bertelmann E, Jaroszewski J, Pleyer UWE. Corneal allograft rejection: current understanding. 2. Clinical implications [J]. *Ophthalmologica* 2002;216(1):2-12.
- Dana MR, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(12):2485-2494.
- Breiteneder-Geleff S, Alitalo K, Jackson D. Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(7):2127-2135.
- Huber S, Bruns CJ, Schmid G, Hermann PC, Conrad C, Niess H. Inhibition of the mammalian target of rapamycin impedes lymphangiogenesis [J]. *Kidney Int* 2007;71(8):771-777.
- Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor [J]. *Nat Med* 2002;8(2):128-135.
- Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battagay EJ. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling [J]. *FASEB J* 2002;16(8):771-780.