# 学号：201310001

广西医科大学博士学位论文

NgR-RhoA-Rock1信号通路及睫状神经营养因子对糖尿病视网膜神经节细胞的作用研究

郭喜良

导 师姓名：刘学政专业名称：人体解剖与组织胚胎学申请学位类型：学术型

答辩委员会主席：柏树令

答辩委员会委员：罗国容 谢小薰 潘尚领

谭国鹤张蕴莉梅晰凡

二○一六年五月

原创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含获得广西医科大学或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：签字日期：年月日

-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规

定，即：在校期间论文的知识产权属广西医科大学。学校有权保存论文的电子和纸质文档，可以借阅或上网公布本论文的部分或全部内容，可以采用影印、复印或其它手段保存、汇编本论文，学校可以向国家有关机关或机构送交论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅。同意广西医科大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。保密论文在解密后遵守此规定。

学位论文作者签名：

导师签字：

签字日期：年月日签字日期：年月日

# 个人简历

基本情况

姓名：郭喜良性别：男

民族：汉出生年月：1975年8 月

籍贯：辽宁省朝阳市政治面貌：中共党员

学习工作经历（从本科学历起，注意时间连续性）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 起止时间 | 所在院校或单位 | 学历学位 | 职称 |
| 1995.08-2000.07 | 锦州医学院 | 本科医学学士 |  |
| 2000.07-2005.07 | 锦州医学院 |  | 研究实习员 |
| 2005.07-2006.12 | 锦州医学院 |  | 助理研究员 |
| 2004.09-2007.07 | 辽宁医学院 | 研究生医学硕士 |  |
| 2006.12-2016.03 | 辽宁医学院 |  | 助理研究员 |
| 2016.03-至今 | 锦州医科大学 |  | 助理研究员 |

研究生期间科研经历/临床工作经历（单列，用序号注明）

1、项目起止时间：2016.01-2019.12

项目名称：NgR信号通路在老年糖尿病视网膜神经节细胞损伤中的作用项目来源：国家自然科学基金项目（81571383）

本人承担任务：参与

2、项目起止时间：2012年1月-2013年12 月

项目名称：NgR信号通路与CNTF在糖尿病视网膜神经组织病变中的作用项目来源：国家自然科学基金主任基金（31140072）

本人承担任务：参与

目 录

[学号：201310001](#_Toc686346366) 1

[个人简历](#_Toc686346367) 2

[缩略词表](#_Toc686346368) 4

[摘 要](#_Toc686346369) 6

[Abstract](#_Toc686346370) 7

[前 言](#_Toc686346371) 8

[第一章 NgR干扰及CNTF预处理对高糖诱导的RGC-5凋亡的影响](#_Toc686346372) 9

[1. 材料与方法](#_Toc686346373) 10

[1.1 实验材料](#_Toc686346374) 10

[1.2 实验方法](#_Toc686346375) 13

[1.3 统计学分析](#_Toc686346376) 17

[2. 实验结果](#_Toc686346377) 17

[2.1 MTT实验检测细胞增殖](#_Toc686346378) 17

[2.2 流式细胞术检测细胞凋亡](#_Toc686346379) 18

[2.3 Real-time PCR检测NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达](#_Toc686346380) 19

[2.4 Western blot检测NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达](#_Toc686346381) 20

[2.5 免疫荧光分析Rbpms阳性细胞数目及突起长度](#_Toc686346382) 20

[3. 讨论](#_Toc686346383) 22

[4. 小结](#_Toc686346384) 23

[（1）证实了高糖诱导的视网膜神经节细胞损伤同NgR-RhoA-Rock1信号通路激活密切相关；](#_Toc686346385) 23

[（2）证实了NgR干扰及CNTF处理均可以显著抑制RGC-5细胞凋亡，促进细胞增殖；](#_Toc686346386) 23

[（3）证实了NgR干扰及CNTF处理存在协同作用，可以更好的保护视网膜神经节细胞，减轻高糖诱导造成的损伤。](#_Toc686346387) 23

[第二章 siNgR及CNTF对糖尿病大鼠RGCs凋亡及再Th的影响](#_Toc686346388) 23

[1. 材料与方法](#_Toc686346389) 23

[1.1 实验材料](#_Toc686346390) 23

[1.2 实验方法](#_Toc686346391) 27

[1.3 统计学分析](#_Toc686346392) 29

[2. 实验结果](#_Toc686346393) 29

[2.1 糖尿病大鼠模型的建立](#_Toc686346394) 29

[2.2 视网膜神经节细胞数目观察](#_Toc686346395) 30

[2.3 TUNEL法观察视网膜神经节细胞凋亡率](#_Toc686346396) 30

[2.4 Western blot检测Bcl-2、Bax、caspase-3蛋白的表达](#_Toc686346397) 31

[2.5 Real-time PCR检测F-actin、GAP-43 mRNA表达](#_Toc686346398) 32

[2.6 Western blot检测F-actin、GAP-43蛋白的表达](#_Toc686346399) 32

[2.7 免疫组化检测F-actin、GAP-43蛋白的表达](#_Toc686346400) 33

[3. 讨论](#_Toc686346401) 35

[4. 小结](#_Toc686346402) 35

[第三章 siNgR及CNTF影响糖尿病RGCs凋亡及再Th的分子机制](#_Toc686346403) 35

[1. 材料与方法](#_Toc686346404) 36

[1.1 实验材料](#_Toc686346405) 36

[1.2 实验方法](#_Toc686346406) 38

[1.3 统计学分析](#_Toc686346407) 38

[2. 实验结果](#_Toc686346408) 39

[2.1 Real-time PCR检测NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达](#_Toc686346409) 39

[2.2 Western blot检测NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达](#_Toc686346410) 40

[3. 讨论](#_Toc686346411) 41

[4. 小结](#_Toc686346412) 41

[（1）糖尿病视网膜病变激活NgR-RhoA-Rock1信号通路；](#_Toc686346413) 41

[（2）玻璃体内局部注射siNgR或神经营养因子CNTF显著抑制NgR- RhoA-Rock1信号通路活性；](#_Toc686346414) 41

[（3）siNgR和CNTF对NgR-RhoA-Rock1信号通路的抑制存在协同作用。](#_Toc686346415) 41

[参考文献](#_Toc686346416) 42

[文献综述](#_Toc686346417) 46

[参考文献](#_Toc686346418) 49

[攻读博士期间发表的学术论文](#_Toc686346419) 54

# 缩略词表

**英文缩写 英文全称 中文全称**

DM diabetes mellitus 糖尿病

DR diabetic retinopathy 糖尿病视网膜病变

RGCs retinal ganglion cells 视网膜神经节细胞

CNTF

Nogo

Ciliary neurotrophic factor neurite outgrowth inhibitor

睫状神经营养因子轴突生长抑制因子

NgR Nogo receptor Nogo 蛋白受体

PBS phosphate buffered solution 磷酸盐缓冲液

NC negative control 阴性对照

PVDF polyvinylidine difuoride 偏二氟乙烯印记膜

RhoA Ras homolog gene family, member A Ras 基因家族成员 A

Rock1 Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase1

Rho相关蛋白激酶 1

ddH2O double distilled H2O 双蒸水

PI propidium iodide 碘化丙啶

DAB diaminobenzidine 二氨基联苯胺

L, mL, μL liter, milliliter, microliter 升，毫升，微升 PAGE polyacrylamide gel electropheresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳 min, h, s minute, hour, second 分钟，小时，秒 Tris tris(hydroxymethyl) aminomethane 三羟甲氨基甲烷 BCA bicinchonininc acid 二喹啉甲酸

ECL enhanced chemiluminescene 化学发光自显影

RIPA RIPA Lysis Buffer RIPA 裂解液

TBST tris buffered saline/with Tween 20 Tris 缓冲盐溶液/吐温

20

1

PCR polymerase Chain Reaction 聚合酶链式反应

OD optical density 光密度

siRNA small interfering RNA 小干扰 RNA

CSPGs chondroitin sulfate proteoglycans 硫酸软骨素蛋白多糖 MTT methylthiazolyl tetrazolium bromide 四甲基偶氮唑蓝 DMSO dimethylsulfoxide 二甲基亚砜

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 FBS fetal bovine serum 胎牛血清

TEMED N, N, N, N-teramethyl ethylene diamine N, N, N, N-四甲基乙二胺

GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase

甘油醛-3-磷酸脱氢酶

PEDF pigment epithelium-derived factor色素上皮细胞衍生因子

GDNF glialcell line derived neurotrophic factor

TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay

胶质源性神经营养因子

dUTP缺口末端标记

STZ streptozotocin链脲霉素

GAP-43 growth associated protein-43生长相关蛋白-43 OMgp oligodendrocyte-myelinglycoprotein少突胶质细胞髓磷脂糖

蛋白

HE hematoxylin eosin苏木精伊红

bp base pair碱基对

cDNA complementary deoxyribonucleic acid互补脱氧核糖核酸

2

NgR-RhoA-Rock1信号通路及睫状神经营养因子对糖尿病视网膜神经节细胞的作用研究

摘 要

糖尿病（diabetes mellitus, DM）为临床上比较常见的内分泌代谢性疾病，是世界范围内发病率和死亡率较高的五大疾病之一。伴随当代经济快速发展以及生活水平的提高，DM的发生率正在呈快速上升趋势，预计2025年将增长至3.5亿人。糖尿病视网膜病变（Diabetic retinopathy, DR）是DM最常见的并发症之一，已经成为DM患者视力减弱乃至失明的重要原因，严重影响患者生活质量。因此深入探索DR的发病机制，为临床寻找新的方法治疗DR具有重大意义。

有文献报道，链脲佐菌素（STZ）诱导的糖尿病大鼠视网膜中出现大

量空泡样变，视网膜神经节细胞（retinal ganglion cells, RGCs）胞体肿胀，数目显著减少，并发生明显凋亡。同时越来越多的研究证实，在DM早期出现视网膜神经节细胞病变，并伴随RGCs损伤、凋亡、结构改变及功能状态减退。众所周知，RGCs是唯一的视觉输出细胞，且RGCs轴突是视

神经的重要组成部分，因此RGCs受损、凋亡及再生修复是DR发病及视力减退的重要机制之一。尽管国内外目前对糖尿病RGCs已经展开了大量研究，但RGCs损伤、凋亡、再生受抑的原因及具体分子机制并未完全明确，仍需进一步探索。

近年研究发现，轴突生长抑制因子蛋白受体（Nogo receptor, NgR）在视神经节细胞的损伤、修复及再生中发挥关键作用。将其干扰后能有效恢复大鼠RGCs细胞活力，促进细胞增殖，抑制细胞凋亡。本课题组前期工作表明，DR病理条件下，视网膜组织中NgR及Rock1蛋白表达明均显上调，提示NgR-RhoA-Rock1信号通路在DR状态下被激活。此外，

3

RhoA/Rock信号通路激活后作用于细胞骨架蛋白（F-actin），进而抑制轴突末端生长锥的延伸及神经节再生。而将该信号上游蛋白NgR抑制后可以恢复视网膜受损后的轴突再生功能，抑制RGCs凋亡。表明NgR-RhoA-

Rock1信号通路亦很可能参与调控糖尿病视网膜神经节细胞受损、凋亡及再生过程。

睫状神经营养因子（ciliary neurotrophic factor, CNTF）是一种多效神经营养因子，可以滋养神经节细胞并促进轴突生长。视网膜局部神经营养因子缺乏难以维持RGCs生存，是导致DR患者视力下降的又一重要因素。有研究证实CNTF对外伤性视神经损伤RGCs具有明显保护作用，而外源性给予CNTF可明显保护遗传性糖尿病小鼠及Ⅰ型糖尿病大鼠的视力。提示，CNTF在视神经修复、轴突再生及神经节细胞凋亡中扮演重要角色，但其对糖尿病视网膜神经节细胞的影响及调控机制目前国内外仍知之甚少。

综上，本课题拟通过体内、外实验研究siNgR及CNTF对糖尿病视网膜神经节细胞生存及再生的影响，并探讨两者是否存在协同作用以及相关分子调控机制。期望能为DR临床治疗提供可靠的实验依据以及新型治疗方案。

**第一部分NgR干扰及CNTF预处理对高糖诱导的RGC-5凋亡的影响**

目的：明确siNgR及CNTF对高糖诱导的大鼠RGC-5增殖、损伤及凋亡的影响。

方法：RGC-5转染siNgR或给予CNTF预处理，高糖诱导建立细胞损伤模型。实验设置对照组、高糖组、高糖+NC组、高糖+siNgR组、高糖

+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组。细胞培养48 h后，采用MTT实验检测细胞增殖变化，流式细胞术分析细胞凋亡情况，Real-time PCR及Western blot检测NgR及其下游RhoA、Rock1 mRNA和蛋白的表达，免疫荧光技术对RGCs特异性标志物及突起长度进行定量分析。

结果：MTT及流式细胞术检测结果显示，高糖导致RGC-5细胞增殖

4

能力显著降低，凋亡数量明显增加（*P*<0.01），而siNgR转染或CNTF预处理后RGC-5细胞的增殖能力显著提高，凋亡数量明显减少（*P*<0.01），且siNgR与CNTF存在协同作用；Real-time PCR及Western blot检测结果显示，NgR、RhoA及Rock1 mRNA及蛋白在细胞模型中的表达显著增加

（*P*<0.01），而siNgR转染或CNTF预处理后三者表达水平均显著下降

（*P*<0.01），且siNgR与CNTF存在协同作用；免疫荧光检测结果显示，经高糖诱导后RGCs细胞突起变短，标志物表达水平显著下降（*P*<0.01），而siNgR转染或CNTF可以提高标志物的表达，增加细胞突起长度，且

siNgR与CNTF存在协同作用。

结论：NgR干扰或外源性给予CNTF可以协同保护RGC-5，促进受损细胞存活，抑制细胞凋亡，且同NgR-RhoA-Rock1信号通路密切相关。**第二部分siNgR及CNTF对糖尿病大鼠RGCs凋亡及再生的影响**

目的：明确玻璃体内注射siNgR或CNTF对糖尿病大鼠RGCs凋亡及再生的影响。

方法：腹腔注射STZ建立糖尿病大鼠模型，成功诱导后玻璃体内局部注射siNgR或CNTF进行干预，实验设置对照组、糖尿病组、糖尿病+NC组、糖尿病+siNgR组、糖尿病+CNTF组，糖尿病+CNTF+siNgR组。12周后取各组大鼠视网膜组织，采用HE染色观察神经节细胞数量及形态，

TUNEL法分析RGCs凋亡率，Western blot检测细胞凋亡及轴突再生相关蛋白的表达，Real-time PCR及免疫组化技术进一步验证轴突再生标志物

mRNA及蛋白表达水平变化。

结果：HE染色及TUNEL检测结果显示，糖尿病大鼠RGCs层空泡化，数量明显减少，凋亡率显著上升（*P*<0.01），而玻璃体内注射siNgR 或

CNTF后RGCs数量明显增加，凋亡率显著下降（*P*<0.01），且siNgR与CNTF存在协同作用。Western blot检测结果显示，糖尿病大鼠视网膜组织中Bax、caspase-3的表达显著增加，Bcl-2及F-actin、GAP-43的表达明显

5

减少（*P*<0.01），而玻璃体内注射siNgR或CNTF可以明显逆转上述指标的表达，且siNgR与CNTF存在协同作用；Real-time PCR及免疫组化实验进一步证实了siNgR或CNTF可以显著增加轴突再生标志物F-

actin、GAP-43 mRNA及蛋白的表达。

结论：siNgR和CNTF可以协同促进糖尿病大鼠RGCs存活，诱导轴突再生，抑制细胞凋亡。

**第三部分siNgR及CNTF影响糖尿病RGCs凋亡及再生的分子机制**

目的：明确siNgR或CNTF对糖尿病大鼠RGCs的影响是否同NgR-

RhoA-Rock1信号通路有关。

方法：腹腔注射STZ建立糖尿病大鼠模型，药物治疗及实验分组同第二章。16周后收集各组大鼠视网膜组织，采用Real-time PCR及Western

blot技术检测NgR、RhoA、Rock1 mRNA及蛋白的表达。

结果：Real-time PCR及Western blot检测结果显示，糖尿病大鼠视网膜组织中NgR、RhoA、Rock1 mRNA及蛋白的表达显著增加（*P*<0.01），而玻璃体内注射siNgR或CNTF后三个指标的表达水平均显著下降

（*P*<0.01），且siNgR与CNTF存在协同作用。

结论：siNgR和CNTF可以协同抑制NgR-RhoA-Rock1信号通路激活，诱导RGCs再生，抑制细胞凋亡。

关键词 糖尿病视网膜病变； 视网膜神经节细胞； Nogo 蛋白受体； 睫状神经营养因子； 细胞凋亡； 轴突再生

6

A STUDY ON THE EFFECT OF THE NGR-RHOA-ROCK1 SIGNAL PATHWAY AND NEUROTROPHIC FACTORS ON THE RETINAL GANGLION CELLS OF DIABETIC

Abstract

As a common endocrine metabolic disease, Diabetes mellitus (DM) is one of the five major diseases of high morbidity and mortality around the world. Along with fast development of economy and improvement of living standards, the incidence of DM presents a rapid upward trend. As a result, it's predicted that up to 350 million people will be diagnosed with DM by 2025. As one of the most common complications of DM, Diabetic retinopathy (DR) has become an important reason for visually impaired DM patients and even blindness. Therefore, it's of great significance to explore the underlying mechanisms of DR and search for its clinical treatment.

Literature reports that there were swelling of body and a decreased number of RGCs in diabetic rat induced by streptozotocin (STZ). At the same time, more and more research confirmed that retinal ganglion cell lesions occurred in the early stage of DR accompanied with RGCs injury, apoptosis, structural changes and impaired functional status. It's well known that RGCs is the only visual output cell and RGCs axon is an important part of the optic nerve. Hence the injury, apoptosis and regenerative repair of RGCs is one of the important mechanisms of DR onset and vision loss. Currently, although extensive research

7

On diabetes RGCs had been carried out at home and abroad, the molecular mechanism of injury, apoptosis and regeneration of RGCs is not completely understood and still needs further exploration.

Recent research found that Nogo receptor (NgR) played a key role in the injury, repair and regeneration of RGC. After the interference, it could effectively restore cell vitality, promot cell proliferation and inhibit cell apoptosis of rat RGCs. Our preliminary work suggested that the protein expression of NgR and Rock1 was increased in DR, which implied that the NgR-RhoA-Rock1 signal pathway was activated. Furthermore, the RhoA/Rock signal pathway could regulate the expression of F-actin and inhibit the extension of terminal axon growth cones and ganglion regeneration. However, the inhibition of upstream signal protein NgR could restore retina axon regeneration and inhibit the apoptosis of RGCs. These studies indicated that NgR-RhoA- Rock1 signal pathway may be involved in regulation of apoptosis, injury and regeneration process of diabetic retinal ganglion cell.

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is of multiple effect, which can nourish the ganglion cells and promote axon growth. Lacking of neurotrophic factors is another important factor leading to impaired vision of DR patients through promoting RGCs apoptosis. Studies have proved that CNTF had obviously protective effect on RGCs in traumatic optic nerve injury, and exogenous CNTF

Could obviously protect the vision of hereditary diabetes mice and type Ⅰ

Diabetes rats. These data indicate that CNTF plays an important role in the process of optic nerve repair, axonal regeneration and ganglion cell apoptosis. But little is known about the effect and mechanism of CNTF on diabetic RGCs at home and abroad.

To sum up, our study intends to research the effect and molecular

8

Mechanisms of siNgR and CNTF on the survival and regeneration of diabetic retinal ganglion cells in vivo and vitro, and investigated whether there is a synergistic effect between them. It's expected that what we've done here will contribute to a better understanding of the mechanisms of DR, and also provide reliable experimental basis for clinical treatment of DR.

**Part1 Effect of NgR interference and CNTF pretreatment on apoptosis of RGCs induced by high glucose**

Objective: To clarify the effect of siNgR and CNTF on the proliferation, injury and apoptosis of RGC-5 induced by high glucose.

Method: RGC-5 was transfected with siNgR or given CNTF, and then induced cell injury by high glucose. The experiment was divided into six groups: control group, high glucose group, high glucose-NC group, high glucose-siNgR group, high glucose-CNTF group and high glucose-CNTF-siNgR group. After 48 h, cell proliferation was detected by MTT assay, cell apoptotic was tested by flow cytometry, the mRNA and protein expression was determined by Real-time PCR and Western blot, the neurite length and expression of specific markers of RGCs were detected by immunofluorescence.

Result: The results of MTT and flow cytometry showed that high glucose significantly inhibited cell proliferation and promoted cell apoptotic of RGC-5 (P<0.01). However, there was a substantial increase for the proliferative capacity and an obvious reduce for apoptotic rate after transfection with siNgR or pretreatment with CNTF (P<0.01), and the combination of them was synergistic. The Real-time PCR and Western blot indicated that the mRNA and protein expression of NgR, RhoA and Rock1 was increased in cell model (P<0.01), which was significantly reduced after siNgR transfection or CNTF pretreament (P<0.01) and the combination of them was synergistic.

9

Immunofluorescence tests showed that high glucose reduced the expression of specific markers and the neurite length of RGCs (P<0.01), which was obviously increased by siNgR or CNTF.

Conclusion: SiNgR and CNTF could collaborate to promote the survival of injury cells and inhibit apoptosis, and the protective effect of them on RGC-5 cells was closely associated with NgR-RhoA-Rock1 signal pathway.

Part 2 Effect of siNgR and CNTF on apoptosis and regeneration of RGCs in diabetic rats

Objective: To clarify the effect of intravitreal injection of siNgR and CNTF on apoptosis and regeneration of RGCs in diabetic rats.

Method: Diabetic rats model was established by intraperitoneal injection of STZ, and then was intervened by intravitreal injection of siNgR and CNTF. The experiment was divided into six groups: control group, diabetic group, diabetic- NC group, diabetic-siNgR group, diabetic-CNTF group and diabetic-CNTF- siNgR group. After 12 weeks, rat retina tissue was collected from each group. The number and form of ganglion cells was detected by HE staining. Apoptosis rate of RGCs was examined by TUNEL. The expression of apoptosis related proteins was determined by Western blot. The mRNA and protein expression of axon regeneration markers was detected by Real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry.

Result: The results of HE staining and TUNEL assay showed that the number of RGCs cells reduced significantly, RGCs layer cavitated and cell apoptosis rate increased substantially in diabetic rats (P<0.01). However, intravitreal injection siNgR or CNTF significantly decreased apoptotic rate and promoted cell survival (P<0.01), and the combination of them was synergistic. The results of Western blot indicated an evident increase for the expression of

10

Bax and caspase-3 and a sharp decrease for F-actin and GAP-43 in retinal tissue of diabetic rats (P<0.01). Besides, the combination of them was synergistic. The experiments of Real-time PCR and immunohistochemistry further confirmed that siNgR or CNTF could significantly increased the mRNA and protein level of axonal regeneration markers F-actin and GAP-43.

Conclusion: SiNgR and CNTF could cooperatively promote RGCs cell survival in diabetic rats, induce axonal regeneration and inhibit cell apoptosis.

Part 3 The molecular mechanism of NgR interference or CNTF treatment on apoptosis and regeneration of diabetes RGCs

Objective: To clarify whether the effect of siNgR or CNTF on RGCs in diabetic rats was associated with NgR-RhoA-Rock1 signal pathway

Method: Intraperitoneal injection of STZ induced diabetic rat model. Drug treatment and experimental groups were the same as part 2. Retinal tissue of rats were collected after 16 weeks. The mRNA and protein expression of NgR, RhoA and Rock1 were detected by Real-time PCR and Western blot technology. Result: The results of Real-time PCR and Western blot showed that the mRNA and protein expression of NgR, RhoA and Rock1 was remarkably increased in retinal tissue of diabetic rats, while the expression level of them was significantly reduced after intravitreal injection of siNgR or CNTF (P<0.01), and

The combination of them was synergistic.

Conclusion: SiNgR and CNTF could cooperate to inhibit NgR-RhoA- Rock1 signal pathway activity, then induced axonal regeneration and inhibited the apoptosis of RGCs.

**KEY WORDS:** diabetic retinopathy; Retinal ganglion cells; Nogo receptor; Ciliary neurotrophic factor; Cell apoptosis; Axonal regeneration

11

前 言

糖尿病视网膜病变（Diabetic retinopathy, DR）为临床糖尿病（diabetes mellitus, DM）最常见的眼部并发症，是一种由遗传、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神等多种综合因素引起的代谢性疾病。据统计，目前全世界DM患病人数约2.4亿人，预计2025年将增长至3.5亿人[[1](#_bookmark45)]。DR发病机制至今尚未完全明确，但大量研究证实，视网膜神经节细胞（retinal ganglion cells, RGCs）形态结构的改变及数目的减少在DR发生中发挥关键作用[[2](#_bookmark46), [3](#_bookmark47)]。RGCs是视网膜唯一的视觉输出细胞，损伤后修复极其困难，因此深入探索RGC凋亡损伤及再生的具体分子机制，对临床寻找新的方法治疗DR具有重大意义。

磷脂相关生长抑制蛋白受体（Nogo receptor, NgR）广泛分布于海马等多种神经元内，目前有关NgR的研究多数集中在脑功能和脊髓损伤等领域中。我们在前期工作中发现，NgR及Rock1在DR病变视网膜中的表达显著增加，但其对RGCs损伤的影响尚需进一步探索。既往研究表明，NgR不仅可以有效抑制肿瘤细胞生长和迁移[[4](#_bookmark48)]，也在视神经节细胞的损伤、修复和再生中发挥关键作用，能够促进神经元凋亡，抑制其再生[[5](#_bookmark49), [6](#_bookmark50)]；NgR过表达对RGCs的结构和功能均会产生负面影响，抑制细胞再生，导致患者视力下降[[7](#_bookmark51)]；此外，NgR大量表达于幼年或成年小鼠的视网膜神经节细胞层，而将其抑制后能够有效恢复RGCs活力[[8](#_bookmark52)]；更有研究证实，NgR- RhoA-Rock1信号通路激活可以抑制细胞骨架蛋白（F-actin）在轴突末端生长锥的合成聚集，阻碍轴突末端生长锥的延长，从而抑制神经再生，甚至诱发细胞凋亡[[9](#_bookmark53)]。提示，NgR-RhoA-Rock1信号通路很可能参与调控糖尿病视网膜神经节细胞损伤及凋亡过程，与DR视力减退密切相关。

神经营养因子在维持神经元生存及促进其再生中发挥重要作用，视网膜局部神经营养因子相对缺乏难以维持RGCs生存，是导致DR患者视力

12

下降的又一重要因素。睫状神经营养因子（ciliary neurotrophic factor，

CNTF）由于可以促进鸡胚睫状神经元存活而广为人知，具有支持滋养神经节细胞，促进轴突延伸及减轻体重等多重作用。有研究发现[[10](#_bookmark54)]，CNTF对外伤性视神经损伤中的RGCs具有明显保护作用；另有研究表明

[[11](#_bookmark55)], CNTF能够调节视杆细胞光传导，促进视锥细胞外节及RGCs再生，保护三种细胞并维持它们的功能；此外，CNTF能够有效促进RGC轴突再生[[12](#_bookmark56)]，外源性CNTF可明显保护遗传性糖尿病小鼠及Ⅰ型糖尿病大鼠的视力[[13](#_bookmark57)]。提示CNTF很可能参与调控糖尿病视网膜病变过程中RGC细胞的损伤、凋亡及再生过程。

神经生长相关蛋白-43（growth associated protein-43, GAP-43）于80年代初被首次发现，分布在神经胶质细胞、神经元细胞中，在生长和发育期的胚胎神经系统中大量表达。GAP-43 被认为是轴突生长所必须的，因此被作为轴突再生和神经元神经元生长的分子标记物[[14](#_bookmark58)]。有研究发现[[15](#_bookmark59)]，金鱼视神经受损后GAP-43的表达水平显著上升，直至金鱼视神经完全再生。亦有研究表明[[16](#_bookmark60)]，体外建立视网膜神经节细胞损伤模型后，可检测到

GAP-43的表达异常增加，并持续到28 d左右。此外，国内外大量研究证实[[17](#_bookmark61), [18](#_bookmark62)]，GAP-43不仅有利于神经元存活，而且可以促进轴突再生。以上研究证实，GAP-43表达同视神经损伤后的再生修复密切相关，说明GAP-

43可以作为视网膜神经节细胞再生的分子标志物。

RNA干扰（RNA interference, RNAi）是一种由双链RNA引发的序列特异性转录后的基因沉默，RNAi技术已经广泛应用于探讨基因功能的研究中[[19](#_bookmark63), [20](#_bookmark64)]。众所周知，在糖尿病视网膜病变过程中存在无数基因的异常表达（增加或减少），目前，人类基因组已经识别并测序鉴定了许多直接参与调控RGCs凋亡及再生的重要基因，因此，将这些基因作为分子靶点，研发以RNA干扰为基础的基因工程治疗从理论上讲是可行的。故RNAi技术有望长期/完全特异性抑制靶标分子的表达，抑制RGCs细胞凋亡，促

13

进轴突再生及细胞生存，从而达到有效修复视神经损伤的目的。

综上所述，本研究基于前期工作，旨在从细胞及动物水平探索siNgR或外源性给予CNTF对糖尿病视网膜神经节细胞凋亡及再生的影响，并分析两者是否存在协同作用以及相应的分子调控机制。

14

# 第一章 NgR干扰及CNTF预处理对高糖诱导的RGC-5凋亡的影响

糖尿病视网膜病变（Diabetic retinopathy, DR）是临床糖尿病（diabetes mellitus, DM）最严重的并发症之一，已经成为导致DM患者视力减弱乃至失明的重要原因，目前发病机制尚未完全明确。大量研究证实，视网膜神经节细胞（retinal ganglion cells, RGCs）在DR早期出现凋亡，其数目的减少和形态结构的改变在DR进展中发挥关键作用[[2](#_bookmark46), [21](#_bookmark65), [22](#_bookmark66)]。RGCs位于视网膜内侧神经节细胞层，是唯一的视觉输出细胞，在大量视网膜神经元细胞中，RGCs损伤后的修复极其困难。因此深入探索RGC凋亡损伤的具体分子机制，对临床寻找新的方法治疗DR具有重大意义。

Nogo蛋白受体（Nogo receptor, NgR）广泛分布于大脑皮质神经元、脑桥神经元、海马神经元以及小脑蒲肯野细胞的神经元内，目前有关NgR的研究多数集中在脑功能和脊髓损伤等领域中，近年研究发现，NgR不仅可以有效抑制肿瘤细胞生长和迁移，也在视神经节细胞的损伤、修复和再生中发挥关键作用[[23-25](#_bookmark67)]，而且能够促进神经元凋亡，抑制神经元再生[[26-28](#_bookmark68)]。本课题组在前期工作中发现，NgR及Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1（Rho associated coiled coil forming protein kinase1, Rock1）在DR病变视网膜中的表达明显增加。另有实验表明[[29](#_bookmark69)]，NgR大量表达于幼年或成年小鼠的视网膜神经节细胞层，而将其抑制后能够有效恢复RGC活力[[30](#_bookmark70)]。同样有研究证实[[29](#_bookmark69)]，干扰NgR受体能够有效抑制RGCs凋亡，促进细胞增殖，改善细胞支架紊乱。此外，RhoA-Rock信号通路在中枢神经系统中通过硫酸软骨素蛋白多糖（chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs）抑制神经元突触延伸和生长，在DR进展中占有重要地位[[31](#_bookmark71)]。提示NgR-RhoA-

Rock1 信号通路激活同视网膜神经节细胞损伤及轴突再生密切相关。在DR等慢性病发病过程中，视网膜局部神经营养因子诱导的RGC

15

凋亡是导致DR患者视力下降的重要原因之一[[30](#_bookmark70)]。睫状神经营养因子

（ciliary neurotrophic factor, CNTF）最初是从鸡胚睫状神经元中分离得到

[[32](#_bookmark72)]，已经被证明是一种多效神经营养因子，具有支持滋养神经节细胞，促

进轴突延伸及减轻体重等多重作用[[33](#_bookmark73)]。大量研究发现[[11](#_bookmark55), [34](#_bookmark74), [35](#_bookmark75)]，CNTF对视杆细胞、视锥细胞以及RGCs均具有保护作用，可以维持三种细胞功能。亦有研究证实[[36](#_bookmark76)]，CNTF缺陷小鼠中，LI的神经保护及促进轴突生长功能被显著抑制，而外源给予CNTF可以明显刺激成熟的RGCs轴突生长。提示CNTF很可能参与调控视网膜神经节细胞的损伤及再生过程。

鉴于NgR及CNTF在视网膜神经节细胞中的作用，本部分实验应用

RNAi干扰技术降低NgR的表达，旨在从细胞水平分析siNgR转染或外源给予CNTF对高糖诱导的大鼠视网膜神经节细胞RGC-5增殖、损伤、凋亡的影响，并探讨两者是否存在协同作用及对应的分子调控机制，从而为后续动物水平研究奠定扎实的基础。

## 1. 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞和干扰片段

名称厂家

RGC-5 细胞 美国 ATCC

siNgR及NC上海吉玛有限公司

#### 1.1.2 实验仪器

仪器名称 生产厂家

超纯水系统香港Heal Force

酶标仪 美国 BIOTEK

倒置相差显微镜厦门麦克奥迪

超速冷冻离心机长沙湖南湘仪

CO2 培养箱 上海力申

16

超净工作台苏州净化

流式细胞仪美国BD

荧光显微镜日本OLYMPUS

微量移液器中国苏州BIOHIT

真空干燥箱中国上海SYSBERY

紫外分光光度计美国Thermo

荧光定量PCR仪韩国BIONEER

水平摇床中国北京六一

电泳仪中国北京六一

双垂直蛋白电泳仪中国北京六一

电热恒温培养箱中国天津泰斯特

凝胶成像系统中国北京六一

转移槽中国北京六一

#### 1.1.3 实验试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 |  | 生产厂家 |
| DMEM 培养基 |  | 美国 Gibco |
| 多聚甲醛 |  | 中国国药 |
| 脂质体 2000  胎牛血清 |  | 美国 Invitrogen  美国 Hyclone |
| 胰酶 |  | 中国碧云天 |
| PBS CNTF  D-葡萄糖  MTT DMSO |  | 中国双螺旋  中国 SinoBiological  美国 Sigma 美国 Sigma 美国 Sigma |
| 细胞凋亡检测试剂盒 |  | 中国万类生物 |
|  | 17 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Rbpms antibody neurofilament-L antibody  Cy3 标记ft羊抗兔  Cy3 标记ft羊小鼠TritonX-100 ft羊血清  DAPI  抗荧光淬灭剂  Super M-MLV 反转录酶  SYBR Green  RNase 固相清除剂  2×Power Taq PCR MasterMix 高纯总 RNA 快速提取试剂盒50×TAE  Powder 琼脂糖 |  | 美国 Santa  美国 Santa 中国碧云天中国碧云天  美国 Amresco 中国 Solarbio 美国 biosharp 中国 Solarbio 中国 BioTeke 中国 Solarbio 中国天恩泽中国 BioTeke 中国 BioTeke 美国 Amresco  法国 Biowest |
| 全蛋白提取试剂盒 |  | 中国万类生物 |
| 一抗二抗去除液 |  | 中国万类生物 |
| Western 洗涤液  预染蛋白分子量标准  SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液  PVDF 膜  SDS-PAGE 电泳液（干粉）  BCA 蛋白浓度测定试剂盒  SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒  ECL 发光液 |  | 中国万类生物 加拿大 Fermentas 中国万类生物 美国 Millipore  中国万类生物中国万类生物中国万类生物  中国万类生物 |
| 脱脂奶粉 |  | 中国伊利 |
|  | 18 |  |

NgR antibody英国Abcam

RhoA antibody美国Santa

Rock1 antibody美国Santa

羊抗兔IgG-HRP中国万类生物

羊抗小鼠IgG-HRP中国万类生物

内参抗体GAPDH中国万类生物

#### 1.1.4 常用试剂配制

（1）DMEM培养基

取一干净烧杯，分别称取DMEM干粉试剂和2.0 g NaHCO3放入烧杯中，量筒量取200 mL蒸馏水倒入烧杯内，玻璃棒搅拌至药物充分溶解，最后用蒸馏水将溶液体积定容至1000 mL，0.22μm滤膜过滤后置于4℃冰箱内保存备用。

（2）0.25 %胰蛋白酶

取一干净烧杯，准确称取0.25 g胰蛋白酶放入烧杯内，量筒量取100

mL蒸馏水倒入烧杯，搅拌至药物溶解，0.22μm滤膜过滤后分装，置于- 20℃冰箱内保存备用。

（3）MTT溶液

取一干净烧杯，准确称取0.5 g MTT，量取100 mL PBS缓冲液，搅拌溶解，得到浓度为5 mg/mL的MTT溶液，0.22 mm滤膜过滤后置于4℃冰箱内避光保存。

（4）聚丙烯酰胺溶液

取一干净烧杯，准确称取0.8 g双丙烯酰胺及29.2 g丙烯酰胺依次放入烧杯内，随后量取80 mL蒸馏水倒入烧杯内，搅拌至药物溶解，加入蒸馏水将溶液定容至100 mL，过滤后置于4℃条件下避光保存备用。

（5）TBST缓冲液

取一干净烧杯，准确称取8.8 g NaCl放入烧杯内，分别量取800 mL

19

蒸馏水和10 mL浓度为1 M，pH为8.0的Tris-HCl倒入烧杯内，搅拌至药物溶解，最后加入1.78 mL 20 %的吐温20，混合均匀，加入蒸馏水将溶液

定容到1000 mL，室温条件下保存备用。

（6）Western洗涤液

取一干净烧杯，准确称取TBS粉剂放入烧杯内，量筒量取900 mL蒸馏水倒入烧杯内，搅拌至粉剂溶解，移液器吸取1.5 mL Tween-20加入烧杯中，混合均匀，加入蒸馏水将溶液定容至1000 mL。

（7）Western电泳液

取一干净烧杯，称取SDS-PAGE干粉放入烧杯内，量取1000 mL蒸馏水倒入，搅拌至干粉溶解，得到5×电泳液，加一定体积的蒸馏水继续稀释，获得1×电泳液，混匀待用。

（8）PBS缓冲液

取一干净烧杯，准确称取0.2 g的KCl、1.15 g的Na2HPO4和8.0 g 的

NaCl依次放入烧杯内，量筒量取600 mL蒸馏水倒入，搅拌至药物溶解，用蒸馏水将溶液定容至1000 mL，分装灭菌后置于4℃冰箱内保存备用。

（9）转膜液

取一干净烧杯，准确称取3.03 g的Tris和14.4 g的Gly依次放入烧杯内，量取200 mL无水甲醇倒入，搅拌至药物溶解，用蒸馏水将溶液体积定容至1000 mL。

（10）10 % SDS溶液

准备一干净烧杯，准确称取10 g SDS放入烧杯内，量筒量取80 mL

蒸馏水倒入，搅拌至SDS溶解，用蒸馏水将溶液体积定容至100 mL。

（11）5 %浓缩胶

5.7 mL ddH2O, 1.7 mL 30 %凝胶储备液，2.5 mL Gel buffer, 0.1 mL 10 % SDS，将上述溶液混合均匀，得到10 mL浓度为5 %的浓缩胶。

（12）8 %分离胶

20

4.7 mL ddH2O, 2.7 mL 30 %凝胶储备液，2.5 mL Gel buffer, 0.1 mL 10 % SDS，将上述溶液混合均匀，得到10 mL浓度为8 %的分离胶。

（13）10 %分离胶

4.1 mL ddH2O, 3.3 mL 30 %凝胶储备液，2.5 mL Gel buffer, 0.1 mL 10 % SDS，将上述溶液混合均匀，得到10 mL浓度为10 %的分离胶。

（14）13 %分离胶

3.1 mL ddH2O, 4.3 mL 30 %凝胶储备液，2.5 mL Gel buffer, 0.1 mL 10 % SDS，将上述溶液混合均匀，得到10 mL浓度为13 %的分离胶。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞转染与加药

（1）siRNA的设计与合成

NgR特异性siRNA交由上海吉玛制药有限合成，同时包括阴性对照序列，序列如表1-1。

表1-1 siRNA干扰序列

Table 1-1 siRNA interference sequence

名称干扰序列

siRNA NgR GGAGCAACUAGAUCUUAGUTT NC UUCUCCGAACGUGUCACGUTT

（2）细胞复苏及传代培养

①从液氮罐中取出RGC-5细胞，立即放入37℃温水中摇动使细胞解冻

（约40-60 s）；

②于超净工作台将解冻后的细胞转移到含有9 mL DMEM培养液的离心管内，800 rpm离心3 min，丢弃上清，加入培养液重新悬浮细胞，接种于培养板内，置于37℃，5 % CO2、饱和湿度培养箱内培养；

③24 h后观察细胞形态并对细胞进行首次换液，倒置显微镜下可见RGC- 5细胞单层生长，呈多边形，胞体比较饱满，大多数细胞质折光强，细胞突起较长且数目较多、相互连接；

21

④待细胞融合度达80 %左右，加入0.25 %的胰蛋白酶消化细胞，并按照1: 2进行传代，以后每2-3 d传代1次。

（3）细胞转染与加药

①待RGC-5细胞生长至对数期，PBS清洗1-2次，加入0.25 %的胰蛋白酶消化细胞，细胞形态变圆后终止消化反应；

②移液枪充分吹打悬浮细胞，收集细胞悬液至离心管内，800 rpm离心3 min；

③弃上清，加入一定体积的培养液重新悬浮细胞，对细胞计数后种于6孔板和铺有细胞爬片的12孔培养板中，6孔板每孔细胞量3×105个，12孔板每孔细胞量1×105个，置于37℃，5 % CO2培养箱内培养；

④24 h后转染siNgR和对应的NC片段。将培养液更换为不含FBS 的

DMEM，处理细胞1 h，此时准备转染相关工作；

⑤溶液1的制备（以6孔板中的1个孔为例）；

将100μL的优化液和8μL的脂质体2000混匀，室温下孵育5 min作为溶液A；将100μL优化液和100 pmol的siRNA片段混合，室温下孵育5 min作为溶液B；最后将溶液A和溶液B充分混匀，室温下孵育20 min，作为溶液1。

⑥溶液2的制备（以6孔板中的1个孔为例）；

将50μL的优化液同4μL的脂质体2000混匀，室温下孵育5 min作为溶液C；将50μL的优化液同50 pmol的NC片段混匀，室温下孵育5 min作为溶液D；最后将溶液B和溶液C充分混匀，室温下孵育20 min，作为溶液2。

⑦细胞饥饿处理1 h后，分别将上述配制的溶液1和溶液2逐滴加入培养孔内，轻轻摇动培养板，使转染试剂同细胞充分混匀，药物处理组加入80μg/L的CNTF；

⑧将细胞转移到37℃、5 % CO2培养箱内孵育4 h，弃去转染培养基上清，

22

更换为含10 % FBS的DMEM培养基继续培养；

⑨同时高糖组、高糖+si-NC对照组、高糖+siNgR组、高糖+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组转染后立即加入40 mM的D-葡萄糖进行诱导，对照组正常培养；

⑩将各组细胞置于CO2培养箱内继续培养48 h，随后收集各组细胞行基因和蛋白检测。

#### 1.2.2 MTT法检测细胞增殖

MTT可以被活细胞中的线粒体琥珀酸还原成水不溶性的结晶体甲瓒

（Formazan）并沉积在细胞内，而死细胞不具备此功能。二甲基亚砜

（DMSO）能溶解堆积在细胞内的Formazan，充分溶解后，采用酶标仪测定细胞在490 nm波长处的吸光值，能够间接反应活细胞数量的多少，在一定范围内，形成的结晶数量与活细胞量呈正比。因此可以依据酶标仪测得的吸光值绘制细胞生长曲线，评估细胞活性，OD值越大，细胞活性越强。

本部分实验采用MTT法检测NgR干扰及CNTF处理后高糖诱导下RGC-5细胞活力变化，进而分析NgR和CNTF对视网膜神经节细胞增殖的影响。具体实验过程如下：

（1）待对照组、高糖组、高糖+NC对照组、高糖+siNgR组、高糖

+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组细胞生长至指定时间，向培养板各孔内加入50μL浓度为5 mg/mL的MTT溶液；

（2）将细胞转移到37℃培养箱中孵育4 h，使MTT被充分还原成甲瓒；

（3）结束后轻轻移除细胞上清液，每孔加入200μL的DMSO，摇床缓慢振荡以溶解细胞内形成的紫色结晶；

（4）在酶标仪上测定其在490 nm处的OD值，每组重复5次，最后取平均值，绘制细胞生长曲线，分析实验结果。

1.2.3流式细胞术检测细胞凋亡

23

正常生理状态下，磷脂酰丝氨酸（PS）分别在脂质双层内侧，而在细胞发生凋亡的初始阶段，PS由膜内侧翻向膜外侧，从而被与PS具有高度亲和力的Annexin V探针所结合；而当细胞发生晚期凋亡或坏死时，细胞膜的完整性被破坏，而碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）恰好不具备透过完整细胞膜的能力，因此据染早期凋亡细胞，但对晚期凋亡或坏死细胞，PI则可以透过细胞膜将细胞核染色。因此将Annexin V同PI结合使用，可以区分不同时期的细胞凋亡数量。不仅可以定量分析，且操作简单，具有灵敏。快速等优点。

本部分实验采用Annexin V/PI双染流式细胞术检测NgR干扰及CNTF处理后高糖诱导下RGC-5细胞凋亡变化，进而分析NgR和CNTF对视网膜神经节细胞存活的影响。具体实验过程如下：

（1）待对照组、高糖组、高糖+NC对照组、高糖+siNgR组、高糖

+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组细胞生长至指定时间，收集各组细胞，转移到离心管内；

（2）1500 rpm离心5 min，弃上清，收集细胞沉淀，PBS清洗细胞，重复2次，相同条件下再次离心，残留约50μL左右的缓冲液；

（3）每管细胞样品中加入500μL Binding Buffer，移液器轻轻吹打悬浮细胞；

（4）向细胞内加入5μL的Annexin V-FITC，吹打混匀，室温条件下避光孵育30 min；

（5）向细胞内加入10μL的Propidium Iodide，轻轻吹打混匀，4℃条件下避光孵育3 min；

（6）向细胞内加入500μL的Binding Buffer，随即上样进行流式分析；

（7）结果判定：流式分析结果共包括四个象限，左下象限为Q4区，此区域的细胞为活细胞；右下象限为Q3区，此区域的细胞为早期凋亡细胞；右上限为Q2区，此区域的细胞为晚期凋亡细胞；左上限为Q1区，此区

24

域的细胞为坏死细胞。

#### 1.2.4 Real-time PCR检测mRNA的表达

实时荧光定量PCR（Quantitative Real-time PCR）技术是指在PCR反应体系中引入引入荧光探针或荧光化学物质，伴随PCR反应，PCR产物得到不断的累积，因此荧光信号强度也会得到累积，并且同PCR产物成比例增加，每完成一个循环则收集一个荧光强度信号，因此可以通过荧光强度变监测整个PCR反应过程，最后得到一条荧光扩增曲线图，通过标准曲线对目标模版进行定量分析。具有污染少、特异性强、准确率高、重复性好等多种优点。

本部分实验采用Real-time PCR技术分析不同处理因素对高糖诱导下RGC-5细胞中NgR、RhoA、Rock1 mRNA表达的影响，进而分析NgR- RhoA-Rock1信号通路对视网膜神经节细胞的影响。具体实验过程如下：

（1）总RNA提取

按照购买的商业化试剂盒说明书进行操作。

①收集各组细胞，加入相应体积的RZ裂解液，混匀，室温条件下孵育5 min；

②结束后取200μL氯仿，加入离心管内并混匀，室温下孵育5 min；

③12000 rpm离心12 min，结束后液体出现分层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，移液枪小心的吸取水相，转移到新管内，收集的水相体积约为RZ试剂体积的50 %；

④按照1: 2体积向离心管内加入对应体积的70 %乙醇，混匀后可看见细胞沉淀，将其转移到吸附柱RA中，4℃、10000 rpm离心60 s，丢弃RA管套内收集的废液；

⑤取400μL去蛋白液RE，加到吸附柱RA中央，4℃低温离心机内

12000 rpm离心30 s，弃除废液；

⑥取500μL漂洗液RW，加到吸附柱RA中央，室温下静置3 min，4 ℃

25

低温离心机内12000 rpm离心60 s，弃除管套内收集的废液；

⑦将RA转移到一个新的EP管内，4℃低温离心机内12000 rpm离心3 min，弃除残余液体；

⑧取30μL RNase-free ddH2O，加入吸附柱RA中央，室温静置3 min, 4 ℃

低温离心机内12000 rpm离心3 min，得到细胞总RNA。

（2）反转录成cDNA

①取一支提前预冷的离心管，依次加入相应体积的RNA、1.2μL RT Primer(1 μM)、0.75 μL dNTP(2.5 mM each)、4 μL 5×Buffer以及0.25μL Rnasin，用ddH2O将反应体积补足至19μL，最后加入0.2μL(200 U) M-MLV，移液器轻轻吹打混匀；

②设置PCR反应条件，25℃10 min, 42℃50 min, 80℃5 min后终止反应，得到20μL cDNA样本。

（3）实时荧光定量PCR

①根据NCBI Genkbank中大鼠NgR、RhoA、Rock1基因序列设计对应引物，交由上海生工合成，引物序列如表1-2所示；

表1-2 引物序列

Table 1-2 Primer sequence

基因名称引物序列

NgR F GTCCCTTCCAGACCAATCAGC

NgR R GCCATTGCCTGGTGGAGTGT

RhoA F TCGGAATGATGAGCACACAA

RhoA R GCTTCACAAGATGAGGCAC

Rock1 F GTGATGGCTATTATGGACG

Rock1 R AGGAAGGCACAAATGAGAT

GAPDH F CGGCAAGTTCAACGGCACAG

GAPDH R CGCCAGTAGACTCCACGACAT

②向PCR反应管内依次加入表1-3中的反应物，轻轻吹打混匀；

26

表1-3 PCR反应体系

Table 1-3 PCR amplification system

反应物体积（μL）

cDNA模板1

上下游引物（10μM）各0.5

SYBR GREEN mastermix 10

ddH2O 8.5

total 20

③将各组样本的PCR管置于PCR仪中央位置，设置PCR反应条件为：95℃10 min，95℃10 s，60℃20 s，72℃30 s，40个循环，4℃5 min后终止反应，得到扩增产物。

#### 1.2.5 Western blot检测蛋白的表达

Western blot技术是采用SDS-PAGE电泳分离样本蛋白，然后将其转移到固相载体PVDF膜上，其能够以非共价的方式吸附样本蛋白，同时保持样本蛋白类型及生物学活性稳定。从而以PVDF膜上的样本蛋白作为抗原，使之与对应的抗体结合，再与同位素标记的二抗进行反应，最后经放射自显影或底物显色分析目标基因表达的蛋白水平。具有灵敏度高，特异性好等优点。

本研究采用Western blot技术分析不同处理因素对高糖诱导下RGC-5细胞中NgR、RhoA、Rock1蛋白表达的影响，进而分析NgR-RhoA-Rock1信号通路对视网膜神经节细胞的影响。整个实验过程包括“蛋白质抽提、蛋白质定量、SDS-PAGE、转膜、封闭、抗体孵育、ECL发光、曝光洗片等”，具体操作方法如下：

（1）蛋白质抽提

①收集各组细胞，向细胞沉淀内加入对应体积的RIPA裂解液，冰浴15

min充分裂解细胞；

②4℃低温条件下10000 rpm离心25 min，收集上清，得到细胞总蛋白，留取部分上清用于测定蛋白浓度，剩余提取液置于-80℃条件下保存备用；

（2）蛋白质定量

27

①制备标准曲线：将0.5μg/μL的BSA蛋白标准液按照

0、1、2、4、8、12、16、20μL的体积滴加到酶标板各检测孔内，加PBS

缓冲液将体积定定容至20μL；

②制备BCA工作液：将溶液A和溶液B按照1: 50的比例混合，按照200μL/孔制备相应体积的BCA工作液；

③稀释蛋白样本：将收集到的各组细胞蛋白按照1: 19的比例加入PBS

缓冲液，吹打混匀；

④将蛋白样本同BCA工作液一起加入反应孔内，吹打混匀，避免产生气泡，37℃孵育30 min；

⑤将酶标板置于酶标仪载台上，以570 nm波长下进行读数，记录实验数据。

（3）SDS-PAGE

①组装电泳装置：用橡胶条封住两块玻璃板的中间和两侧，组成上方敞开的制胶模具，用楔子将其固定后垂直置于桌面上；

②制备聚丙烯酰胺凝胶：本实验采用5 %的浓缩胶和8 %、10 %、13 %的分离胶，从下至上进行灌胶；首先制备分离胶，加入APS和TEMED，混匀后开始灌胶；室温静置约30-40 min，待分离胶充分凝固湖灌注浓缩胶

（提前加入APS、TEMED）；插入塑料梳板，室温下静置30 min，待胶充分凝固后缓慢拔除塑料梳板，即可准备上样；

③蛋白上样液的制备：取PBS和5×Loading Buffer加入蛋白样本中混匀，100℃水浴煮沸7 min，得到上样蛋白，本次实验的上样体积为20μL，约含40μg蛋白；

④SDS-PAGE：将泳槽内注入电泳液，取蛋白上样液点样，同时点样 5

μL蛋白Marker作为标准对照；接通电源，恒压80 V条件下进行电泳。

（4）转膜、封闭

①电泳结束后关闭电源，取出凝胶，放入转移缓冲液中平衡15 min；铺

28

好提前用转印缓冲液浸湿的滤纸和海绵，将凝胶轻轻的平铺在滤纸上，在凝胶上面再再评铺相同大小的PVDF膜、滤纸和海绵，赶走气泡，形成

“海绵-滤纸-膜-胶-滤纸-海绵”的“三明治”结构；

②向转印注入缓冲液，固定好凝胶结构，放入转印槽，接通电极，打开电源，调整电压为80 V，恒压下转印1.5 h；

③取出PVDF膜，放入TTBS缓冲液中，水平摇床缓慢震荡5 min，去除缓冲液，将膜转移到脱脂奶粉封闭液中，置于摇床上室温下缓慢摇动1 h。

（5）抗体孵育

①分别按照1: 10000、1: 200、1: 200的比例用脱脂奶粉稀释NgR

antibody、RhoA antibody和Rock1 antibody，然后倒入杂交袋中，放入封闭好的PVDF膜，去除气泡，压膜机封口，4℃条件下过夜孵育一抗；

②取出PVDF膜，放入含有TTBS缓冲液的容器内进行漂洗，水平摇床慢慢摇动6 min，重复上述操作4次；按照1: 5000的比例用脱脂奶粉制备二抗IgG-HRP工作液，倒入杂交袋并放入PVDF膜，37℃条件下孵育45 min。

（6）ECL底物发光

①一抗和二抗孵育结束后，将PVDF膜转入TTBS缓冲液中，置于水平摇床上慢慢摇动6 min，重复清洗6次，将膜上残余的液体吸干，平铺在干净的保鲜膜上；

②从ECL化学发光试剂盒中取等体积的A试剂和B试剂，混合均匀；

③将上述制备的发光液均匀的喷洒在PVDF膜上，室温下静置6 min；

④取保鲜膜平铺在PVDF上，玻璃棒赶出多余的液体的液体，转移到暗盒中，于暗室内进行显影。

（7）曝光洗片

①于暗室内取出片子，裁剪成合适大小的体积，放在PVDF膜上，曝光

30 s，随后置于显影缓冲液中显影2-8 min，流动自来水冲洗，室温自然晾

29

干；

②用凝胶图象处理系统（Gel-Pro-Analyzer软件）对上述获得的所有条带进行灰度分析；

③以GAPDH作为内参，计算各组细胞中目标蛋白的相对表达量，分析实验数据。

#### 1.2.6 免疫荧光检测Rbpms及neurofilament-L

免疫荧光技术是指在不影响抗原或抗体免疫学特性的前提下，以化学方式结合荧光素，然后利用荧光素标记的抗原或抗体作为探针，检测细胞或组织中与之对应的特异性抗体或抗原，最后借助荧光显微镜观察实验结果，荧光素在激发光的照射下会产生黄绿色或橘红色的荧光，从而对目标抗体或抗原进行定量、定位及定性分析。目前已经被广泛应用于生物学以及医学等多种领域中。

本研究采用免疫荧光技术分析不同处理因素对高糖诱导下Rbpms阳性神经节细胞数目变化，并测量neurofilament-L阳性细胞突起长度，进而分析NgR干扰及CNTF处理对视网膜神经节细胞数量的影响。整个实验过程包括“制作细胞爬片、tritonX-100孵育、封闭、抗体孵育、DAPI复染、封片及镜检”，具体操作方法如下：

（1）免疫荧光染色

①待各组细胞生长到指定时间，取出细胞爬片，PSB清洗3次；

②将细胞爬片置于4 %多聚甲醛溶液中，室温下固定15 min；

③固定结束后去除固定液，PBS清洗爬片，5 min/次，清洗3次；

④向玻片上滴加0.1 %浓度的tritonX-100，至细胞被完全覆盖，室温下孵育30 min；

⑤去除tritonX-100, PBS清洗爬片，5 min/次，清洗3次。

（2）抗体孵育

①PBS清洗结束后向玻片上滴加ft羊血清，完全覆盖细胞，室温，条件

30

下孵育15 min；

②按照1: 50的比例采用PBS缓冲液稀释一抗Rbpms和neurofilament-L，然后滴加玻片上，至完全覆盖细胞，4℃条件下过夜孵育；

③孵育结束后清除一抗，PBS清洗玻片，5 min/次，清洗3次；

④按照1: 200的比例于避光条件下稀释荧光二抗Cy3标记ft羊抗兔和

Cy3标记ft羊抗小鼠，滴加在玻片上，至完全覆盖细胞，室温条件下孵育

1 h；

⑤孵育结束后去除二抗，PBS清洗玻片，5 min/次，清洗3次。

（3）DAPI复染

①PBS清洗结束后，向玻片上滴加DAPI，至细胞被完全覆盖，对细胞核进行复染，避光孵育5 min；

②孵育结束后去除DAPI, PBS清洗玻片，5 min/次，清洗3次。

（4）封片及镜检

①取一滴抗荧光淬灭剂滴加在玻片上，将爬片倒扣在滴有抗荧光淬灭剂的载玻片上封片；

②室温下自然晾干，然后转移到荧光显微镜下观察染色效果，200×镜下选取视野进行拍照，记录实验结果。

### 1.3 统计学分析

本研究采用SPASS17.0统计软件分析实验结果，两组间分析比较采用

*t*检验，多组间数据比较采用单因素方差分析，所有数据以均数±方差

（*x*±*s*）表示，*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 2. 实验结果

### 2.1 MTT实验检测细胞增殖

为了分析siNgR及CNTF对大鼠视网膜神经节细胞RGC-5增殖的影响，我们采用MTT实验检测各组细胞培养48 h后的增殖能力变化，酶标仪测定细胞在490 nm处的吸光值，实验重复5次，取平均值绘制细胞生

31

长曲线。实验设置：对照组、高糖组、高糖+NC组、高糖+siNgR组、高糖+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组，结果如图1-1所示。从图中可以看出，高糖诱导后RGC-5的增殖能力明显降低（*P*<0.01）；同高糖组比较，高糖+NC组细胞的增殖能力变化不大，无统计学意义（*P*> 0.05），而高糖

+siNgR组、高糖+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组中细胞的增殖能力显著增强，且具有显著性差异（*P*<0.01）；此外，同高糖+siNgR组及高糖

+CNTF组比较，高糖+CNTF+siNgR组中细胞的增殖能力更强，且差异具有显著性（*P*<0.01）。由此可见，NgR基因干扰或CNTF处理均可以显著提高视网膜神经节细胞的增殖能力，且两者存在协同作用。

表1-4 视网膜神经节细胞OD490 nm下吸光值（*x*±*s*, n=5）Table 1-4 Absorbance values of retinal ganglion at OD490 nm (*x*±*s*, n=5)

组别吸光值

对照组0.538±0.053

高糖组0.322±0.034a

高糖+NC组0.311±0.032

高糖+siNgR组0.428±0.048b

高糖+CNTF组0.431±0.053b

高糖+CNTF+siNgR组0.535±0.042bcd

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

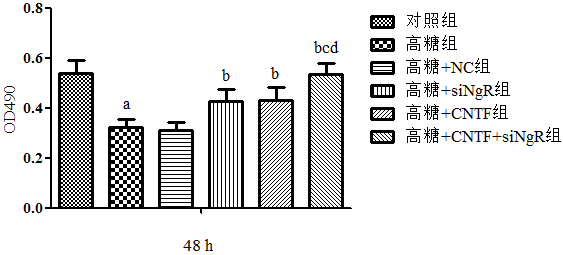


图1-1 MTT实验检测细胞增殖

32

Figure 1-1 Cell proliferation was determined by MTT assay

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

### 2.2 流式细胞术检测细胞凋亡

为了研究siNgR及CNT对大鼠视网膜神经节细胞RGC-5凋亡的影响，采用Annexin V/PI双染流式细胞术分析细胞凋亡，实验设置同前。于48 h时间点收集各组细胞，上流式细胞仪进行检测，得到四个象限

（UL、UR、LL和LR）内细胞百分比，计算UR和LR象限内细胞百分比和，每组重复3次，最后取平均值，得出细胞凋亡率。结果如图1-2所示。从图中可以看出，高糖诱导后RGC-5细胞的凋亡率（21.98±2.12 %）明显上升（*P*<0.01）；同高糖组比较，高糖+NC组细胞的凋亡率（20.28±2.29

%）变化不明显，无统计学意义（*P*> 0.05）；而高糖+siNgR组（13.05±1.92

%）、高糖+CNTF组（12.48±2.02 %）、高糖+CNTF+siNgR组（5.71±0.83

%）中细胞的凋亡率显著下降，具有显著性差异（*P*<0.01）；此外，同高糖

+siNgR组及高糖+CNTF组比较，高糖+CNTF+siNgR组中细胞凋亡率降低的更明显，具有显著性差异（*P*<0.01）。NgR基因干扰或CNTF处理均可以显著降低视网膜神经节细胞凋亡，且两者存在协同作用。

33

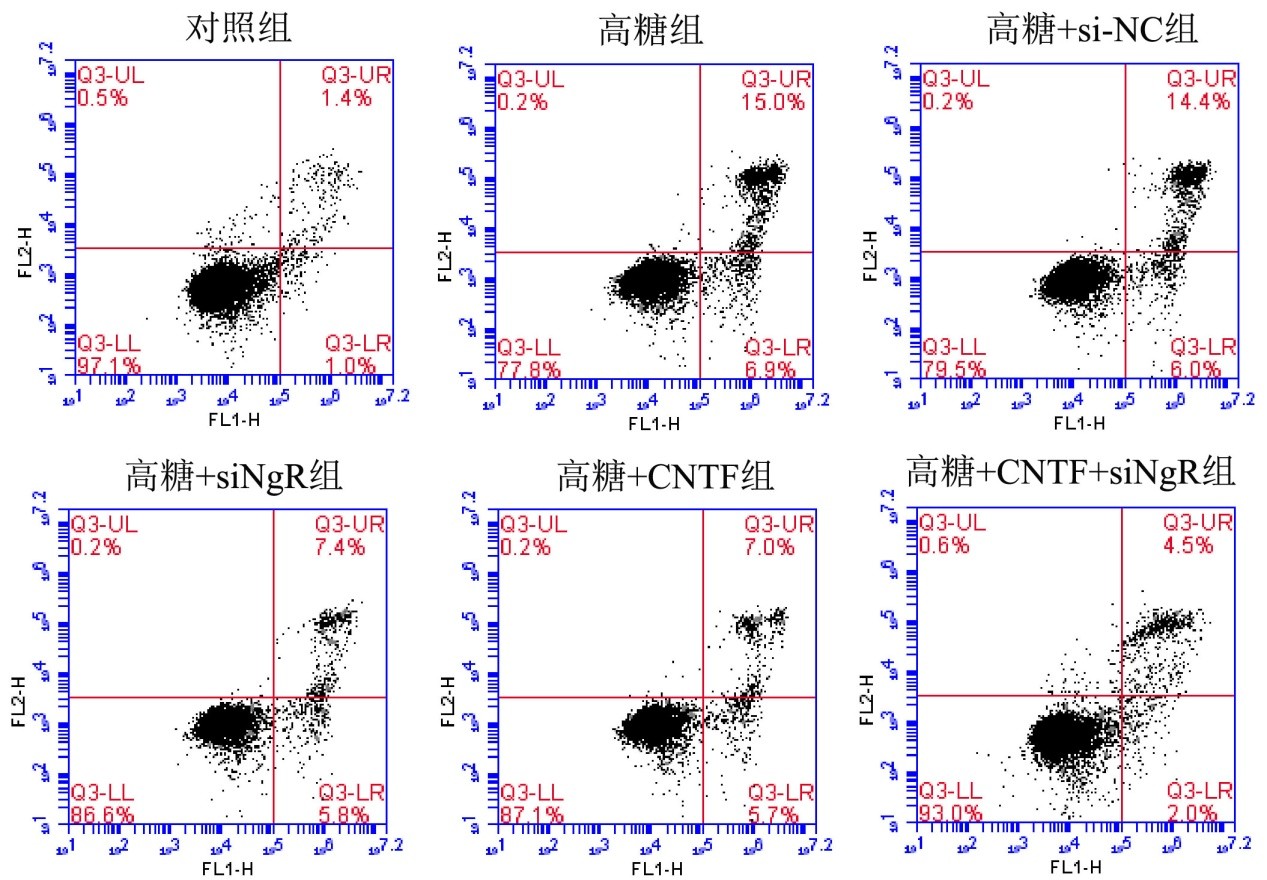




图1-2 流式细胞术检测细胞凋亡

Figure 1-2 Cell apoptosis was detected by flow cytometry

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

表1-5 视网膜神经节细胞凋亡率（*x*±*s*, n=3）Table 1-5 The apoptosis rate of retinal ganglion (*x*±*s*, n=3)

组别细胞凋亡率（%）

对照组2.91±0.41

34

高糖组21.98±2.12a

高糖+NC组20.28±2.29

高糖+siNgR组13.05±1.92b

高糖+CNTF组12.48±2.02b

高糖+CNTF+siNgR组5.71±0.83bcd

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

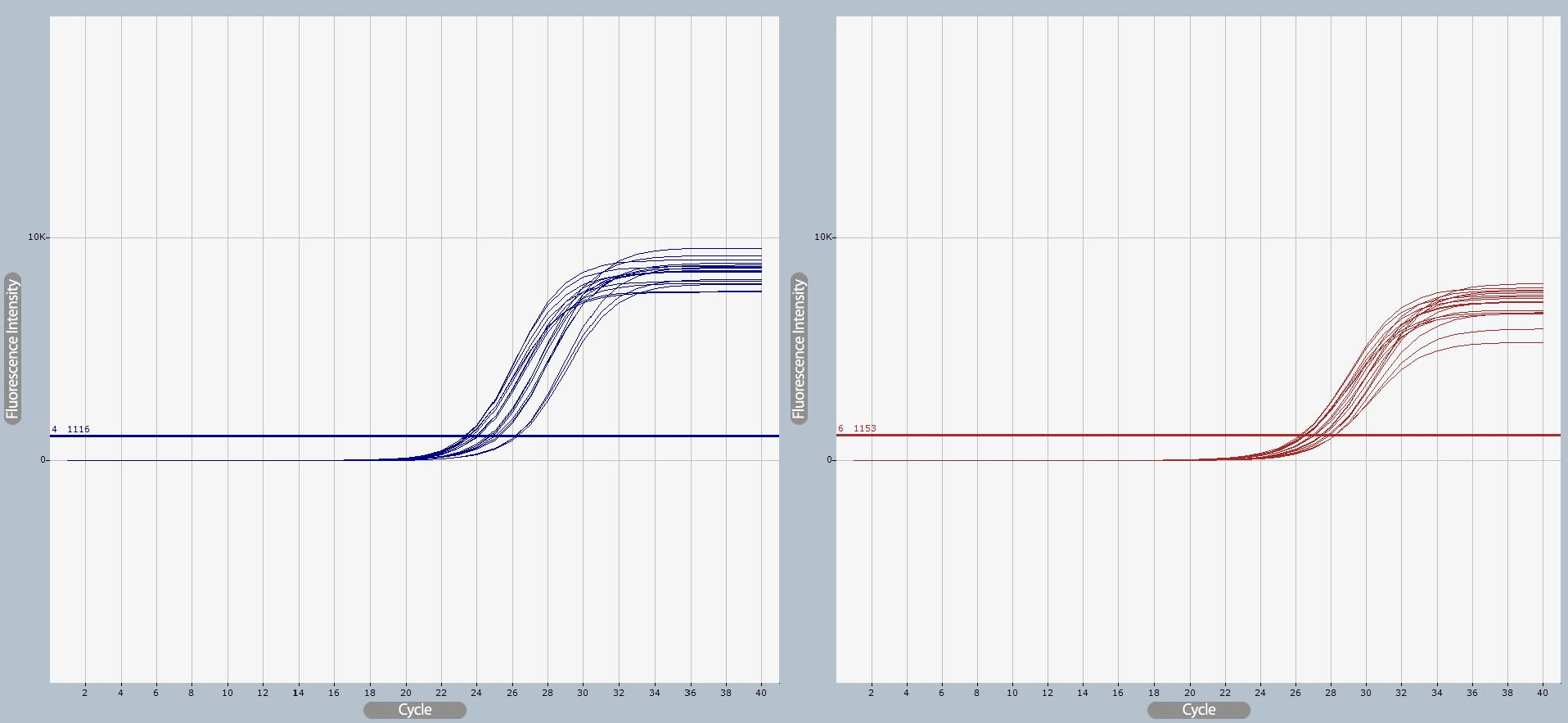
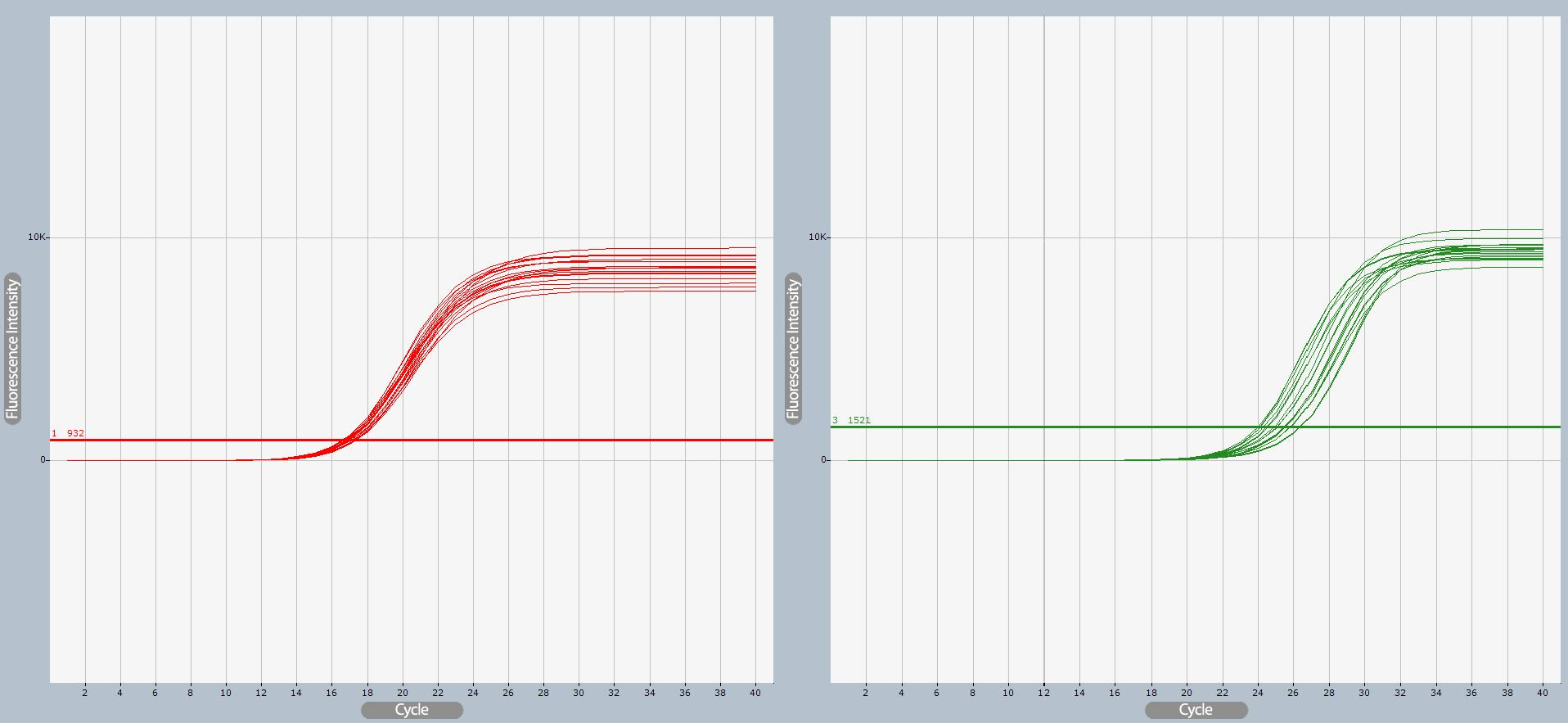
### 2.3 Real-time PCR检测NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达

为了检测NgR-RhoA-Rock1信号通路同视网膜神经节细胞RGC-5之间的关系，采用Real-time PCR技术分析各组细胞中信号通路相关基因

NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达变化，实验分组同前。ExicyclerTM 96荧光定量仪分析实验结果，采用2-△△Ct法将Ct值转换成相应数值，对目的基因进行量化分析，每组重复3次，最后取平均值，结果如图1-3所示。从图中可以看出，高糖诱导下，RGC-5细胞中NgR、RhoA、Rock1

mRNA表达均显著增加（*P*<0.01）；同高糖组比较，高糖+NC组中三种基因的表达水平未发生明显变化，无统计学意义（*P*> 0.01），而高糖+siNgR组、高糖+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组中NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达均显著减少，且具有显著性差异（*P*<0.01）；此外，同高糖+siNgR组及高糖+CNTF组比较，高糖+CNTF+siNgR组中三种基因表达减少的更明显，具有显著性差异（*P*<0.05）。由此可见，高糖诱导的视网膜神经节细胞中NgR-RhoA-Rock1信号通路得到激活，而NgR基因干扰或CNTF处理均可以显著减少NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达，抑制该信号通路活性，且两者协同作用下抑制效果更明显。

35



GAPDH

NgR

RhoA

Rock1

图1-3 A基因的扩增曲线



GAPDH

NgR

Figure 1-3 A Amplification curve of genes

36



RhoA

Rock1

图1-3 B基因的溶解曲线

Figure 1-3 B Melting curve of genes

表1-6 Real-time PCR实验数据（*x*±*s*, n=3）Table 1-6 Experimental data of Real-time PCR (*x*±*s*, n=3)

组别 NgR RhoA Rock1

对照组 1.00±0.00 1.00±0.00 1.00±0.00

高糖组 3.40±0.38a 3.60±0.47a 3.08±0.34a 高糖+NC 组 3.60±0.54 3.57±0.42 3.10±0.31 高糖+siNgR 组 1.09±0.12b 1.71±0.27b 1.72±0.19b 高糖+CNTF 组 1.92±0.25b 2.15±0.26b 1.98±0.20b

高糖+CNTF+siNgR 组 0.66±0.14bcd 0.58±0.10bcd 1.31±0.16bcd a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.05 vs model+CNTF group



图1-3C Real-time PCR检测NgR、RhoA、Rock1 mRNA表达

Figure 1-3 A The mRNA expression of NgR, RhoA and Rock1 was detected by Real-time PCR

37

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.05 vs model+CNTF group

### 2.4 Western blot检测NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达

为了进一步分析NgR-RhoA-Rock1信号通路同大鼠视网膜神经节细胞RGC-5之间的关系，采用Western blot技术分析各组细胞中信号通路相关蛋白NgR、RhoA、Rock1的表达变化，实验分组同前，用凝胶图象处理系统（Gel-Pro-Analyzer软件）分析目标条带的光密度值，每组重复3次，最后取平均值。结果如图1-4所示。从图中可以看出，高糖诱导下，RGC- 5细胞中NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达均显著增加（*P*<0.01）；同高糖组比较，高糖+NC组中三种基因的表达水平未发生明显变化，无统计学意义（*P*> 0.05），而高糖+siNgR组、高糖+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组中NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达均显著减少，且具有显著性差异

（*P*<0.01）；此外，同高糖+siNgR组及高糖+CNTF组比较，高糖

+CNTF+siNgR组中三种基因表达减少的更明显，具有显著性差异

（*P*<0.05）。由此可见，高糖诱导的视网膜神经节细胞中NgR-RhoA-Rock1信号通路得到激活，而NgR基因干扰或CNTF处理均可以显著减少NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达，抑制该信号通路活性，且两者协同作用下抑制效果更明显。

表1-7 Western blot实验数据（*x*±*s*, n=3）Table 1-7 Experimental data of Western blot (*x*±*s*, n=3)

组别 NgR RhoA Rock1

对照组 1.00±0.00 1.00±0.00 1.00±0.00

高糖组 3.44±0.52a 4.32±0.46a 3.44±0.54a 高糖+NC 组 3.94±0.61 4.56±0.74 3.24±0.50 高糖+siNgR 组 1.14±0.11b 1.82±0.24b 2.15±0.29b 高糖+CNTF 组 2.30±0.32b 3.02±0.46b 1.99±0.26b

高糖+CNTF+siNgR 组 0.41±0.08bcd 0.72±0.08bcd 0.74±0.08bcd a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.05 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs

38

Model+CNTF group





图1-4 Western blot检测NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达

Figure 1-4 The protein expression of NgR, RhoA and Rock1 was detected by Western blot a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.05 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

### 2.5 免疫荧光分析Rbpms阳性细胞数目及突起长度

为了分析siNgR及CNTF是否具有神经保护作用，采用免疫荧光技术对RGCs特异性标志物及突起长度进行定量分析，并采用DAPI对细胞核进行复染，实验分组同前，随机选取视野运用Image-pro-plus图像分析软件（IPP）分析Rbpms阳性细胞率及细胞突起长度，阳性细胞率实验重复

6次，细胞突起长度实验重复15次，最后取平均值，结果如图1-5所示。从图中可以以看出，高糖诱导下Rbpms阳性细胞数目显著减少，细胞突起

39

长度明显变短，受到严重损伤（*P*<0.01）；同高糖组比较，高糖+NC组中

Rbpms阳性细胞数目及细胞突起长度均未发生明显变化，而高糖+siNgR组、高糖+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组中Rbpms阳性细胞数目明显增多，细胞突起变长（*P*<0.01）；此外，同高糖+siNgR组及高糖+CNTF组比

较，高糖+CNTF+siNgR组中Rbpms阳性细胞数目及细胞突起变化更明显。由此可见，NgR干扰或CNTF处理对视网膜神经节细胞均具有明显保护作用，且两者协同作用下保护效果更明显。

表1-8 免疫荧光实验数据（*x*±*s*）

Table 1-8 Experimental data of immunofluorescence (*x*±*s*)

Rbpms

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 阳性细胞数%(n=6) | 突起长度 μm(n=15) |
| 对照组 | 95.43±4.77 | 10.30±1.48 |
| 高糖组 | 50.84±7.87a | 4.50±1.37a |
| 高糖+NC 组 | 46.84±14.64 | 4.77±1.16 |
| 高糖+siNgR 组 | 70.94±10.13b | 6.36±1.44b |
| 高糖+CNTF 组 | 72.74±10.20b | 6.66±1.32b |
| 高糖+CNTF+siNgR 组 | 76.02±9.86b | 7.04±1.49bcd |

组别

neurofilament-L

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group



图1-5 A免疫荧光检测Rbpms的表达

Figure 1-5 A The expression of Rbpms was analyzed by immunofluorescence

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group

40



图1-5 B 免疫荧光分析细胞突起长度

Figure 1-5 B The neurite length of cells was analyzed by immunofluorescence

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group



neurofilament-L对照组



neurofilament-L高糖组



neurofilament-L高糖+NC 组

41





neurofilament-L高糖+siNgR 组

neurofilament-L高糖+CNTF 组



neurofilament-L高糖+CNTF+siNgR 组



Rbpms 对照组



Rbpms 高糖组

42



Rbpms 高糖+NC 组



Rbpms 高糖+siNgR 组



Rbpms 高糖+CNTF 组



Rbpms 高糖+CNTF+siNgR 组

图1-5C 免疫荧光分析Rbpms、neurofilament-L的表达（×200）

Figure 1-5 C The expression of Rbpms and neurofilament-L was analyzed by immunofluorescence(×200)

## 3. 讨论

DM是一种由遗传、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神等多种综合因素引起的代谢性疾病[[37](#_bookmark77)]。据统计，目前全世界DM患病人数约2.4亿人，预计2025年将增长至3.5亿人[[1](#_bookmark45)]。DR是DM最常见、也是最严重的眼部并发症，临床主要表现为视网膜渗血和血管堵塞，伴随病情恶化会导致新生血管反复出血，同时纤维血管膜异常牵引造成视

43

网膜脱离，致视力严重受损[[38](#_bookmark78)]。DM病程是影响DR的关键因素，临床统计发现，DM病程5年DR的发生率约为44.4 %, DM病程7年DR的发生率约为56 %，DM病程10年DR的发生率约为60 %，DM病程15 年

DR的发生率高达80 %左右，而DR病程超过30年的DR发生率可达100 % [[39-41](#_bookmark79)]. DR发病机制至今尚未完全明确，多年来人们一直认为高血糖是DR的关键始动因素，在DR的发病进展过程中具有重要调控作用。然而有研究表明[[42](#_bookmark80), [43](#_bookmark81)]，即使严格控制血糖也不能完全防治DR，患者仍有视力减退甚至失明的危险，其已经成为成年人致盲的重要因素，目前针对DR尚缺乏有效的治疗手段。

RGC是唯一的视觉输出细胞，其轴突是视神经的主要组成部分。大量研究发现，在DM早期伴随视网膜神经节细胞病变[[44](#_bookmark82)]，而Barber等[[45](#_bookmark83)]采用TUNEL染色首次证实在DM早期存在明显神经细胞凋亡。此外，RGC损伤、凋亡、结构改变及功能状态减退已经被证明是DR患者视力下降的重要因素[[46](#_bookmark84)]，提示视网膜神经节细胞在DR进展中发挥关键作用。由此可见，深入探索视网膜神经节细胞受损的具体分子机制，对减轻DR、恢复患者视力具有重大意义。

本课题组在前期相关实验研究中发现，NgR及Rock1在DR病变视网膜中的表达显著增加。另有研究表明[[29](#_bookmark69)]，NgR过表达对RGC的结构和功能均会产生负面影响，抑制细胞再生，导致患者视力下降。Cui等的研究发现[[5](#_bookmark49)]，干扰NgR会显著增加轴突再生信号，促进RGC轴突生长。此外，该信号通路激活可以抑制细胞骨架蛋白（F-actin）在轴突末端生长锥的合成聚集，抑制轴突末端生长锥的延长，从而抑制神经再生，甚至诱导细胞凋亡[[9](#_bookmark53)]，且该信号通路上游分子NgR主要表达于幼鼠及成年小鼠RGC[[8](#_bookmark52)]。提示NgR-RhoA-Rock1信号通路的激活主要发生于RGC，很可能参与调控

RGC的损伤及凋亡过程，与DR视力减退密切相关。

神经营养因子在维持神经元生存及促进其再生中发挥重要作用，在

44

DR等慢性病发病过程中，视网膜局部神经营养因子相对缺乏难以维持

RGC生存，是导致DR患者视力下降的重要因素[[30](#_bookmark70)]。如色素上皮细胞衍生因子（pigment epithelium-derived factor, PEDF）、胶质源性神经营养因子

（glialcell line derived neurotrophic factor, GDNF）及CNTF等表达异常均可导致RGCs受损。有研究发现[[10](#_bookmark54)]，CNTF对外伤性视神经损伤中的

RGCs具有明显保护作用。另有研究表明，联合抑制CASP2和CASP6通过CNTF介导的JAK/STAT信号通路抑制RGCs细胞凋亡，促进视神经轴突再生。此外，CNTF能够有效促进RGCs轴突再生，外源性CNTF可明显保护遗传性糖尿病小鼠及Ⅰ型糖尿病大鼠的视力[[13](#_bookmark57), [47](#_bookmark85)]。提示CNTF很可能参与调控视网膜病变过程中RGCs细胞的损伤、凋亡及再生过程。

综上本部分研究旨在从细胞水平分析NgR干扰及外源性CNTF处理对大鼠视网膜神经节细胞RGC-5凋亡的影响，并探讨二者是否产生协同作用以及相关分子调控机制。

我们采用siNgR转染或外源给予CNTF处理大鼠视网膜神经节细胞RGC-5，同时加入80μg/L的高糖诱导细胞损伤。细胞培养48 h后，MTT实验检测siNgR和CNTF对细胞增殖的影响。结果显示，高糖诱导下RGC-5的增殖能力明显减弱，而经siNgR转染或CNTF处理后细胞增殖能力显著增强（*P*<0.01），且siNgR和CNTF协同作用下RGC-5增殖效果更明显，表明siNgR干扰与CNTF能够协同促进视网膜神经节细胞增殖。

为了进一步分析siNgR和CNTF对视网膜神经节细胞凋亡的影响，RGC-5培养48 h后，采用Annexin V/PI双染流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。结果显示，高糖诱导下RGC-5的凋亡率（20.28±2.29 %）明显上升（*P*<0.01），而siNgR转染或CNTF处理可以分别将细胞凋亡率降低至

（13.05±1.92 %）和（12.48±2.02 %），差异具有显著性（*P*<0.01），且

siNgR和CNTF协同作用下对RGC-5凋亡的抑制效果更明显，凋亡率下降至（5.71±0.83 %）。表明siNgR与CNTF可以协同抑制视网膜神经节细胞

45

凋亡。

为了进一步论证NgR-RhoA-Rock1信号通路参与调控视网膜神经节细胞损伤及凋亡过程。RGC-5培养48 h后，分别采用Real-time PCR和Western blot技术检测信号通路相关基因及蛋白的表达变化。结果显示，高糖诱导下RGC-5中NgR、RhoA、Rock1 mRNA及蛋白的表达均明显增加

（*P*<0.01），而siNgR转染或外源性给予CNTF均可以显著降低三个指标的mRNA及蛋白蛋白水平，具有显著性差异（*P*<0.01），且siNgR和CNTF协同作用下表达水平下降的更明显。表明NgR干扰或CNTF处理能够有效抑制NgR-RhoA-Rock1信号通路激活，且两者存在协同作用。

为了进一步证实siNgR与CNTF对RGC-5具有神经保护作用，细胞培养48 h后，采用免疫荧光技术对RGC特异性标志物Rbpms及细胞突起长度进行定量分析。结果显示，高糖诱导下Rbpms阳性细胞明显减少，突起长度显著变短（*P*<0.01）；而siNgR转染或外源性给予CNTF均可以显著增加Rbpms阳性细胞数目及突起长度，且siNgR和CNTF协同作用下细胞突起长度增长更明显。表明NgR干扰或CNTF处理对视网膜神经节细胞具有明显保护作用，能够有效减轻高糖造成的损伤，促进细胞生存，且两者存在协同作用。

## 4. 小结

### （1）证实了高糖诱导的视网膜神经节细胞损伤同NgR-RhoA-Rock1信号通路激活密切相关；

### （2）证实了NgR干扰及CNTF处理均可以显著抑制RGC-5细胞凋亡，促进细胞增殖；

### （3）证实了NgR干扰及CNTF处理存在协同作用，可以更好的保护视网膜神经节细胞，减轻高糖诱导造成的损伤。

46

# 第二章 siNgR及CNTF对糖尿病大鼠RGCs凋亡及再Th的影响

目前临床上有关DR的治疗主要局限于及早发现和诊治视网膜血管病变，但是越来越多的研究证实[[48](#_bookmark86), [49](#_bookmark87)]，DR不仅伴随视网膜微血管病变，而且同时存在视网膜神经元功能受损。大量临床和体内外实验研究发现[[2](#_bookmark46), [50](#_bookmark88), [51](#_bookmark89)]，神经视网膜损伤及功能的改变均发生在视网膜微血管病变之前，因此

DM早期出现的神经元损害越来越受到人们的重视。RGCs为视网膜仅有的视觉信息传递元件，因此DM发生早期对RGCs的保护特别重要。Wang等研究发现[[52](#_bookmark90)]，在STZ诱导的糖尿病动物模型中，RGCs胞体肿胀，

并出现大量空泡样变。亦有研究证实[[53](#_bookmark91)]，STZ成功诱导糖尿病大鼠模型中，视网膜神经节细胞数量减少18.6 %，并证明RGCs发生明显凋亡。此外，在DM患者中，视网膜组织中的神经节细胞层明显变薄[[54](#_bookmark92), [55](#_bookmark93)]。表明在DR中RGCs损伤的保护已经引起了医学界大量研究者的关注。因此深入探索RGCs损伤、凋亡的具体分子机制，促进其修复再生对于临床DR的治疗

具有重大意义。

RGCs是神经元细胞，但是对损伤的神经元进行修复并抑制其凋亡是非常困难的。现有研究表明，神经修复受到抑制的原因主要包括“神经生长因子的匮乏、胶质瘢痕形成、蛋白的抑制以及神经元活力低下”等[[56-58](#_bookmark94)]。另有研究证实[[59](#_bookmark95)]，轴突损伤后，多种基因表达异常、神经营养因子较少以及大量氧化物的存在均是导致神经元最终死亡的重要原因。此外，更有研

究提示，神经元的再生失败并非必然，只要微环境适合中枢神经系统再生，则损伤后的神经元及轴突仍具备再生潜力，新形成的神经元可以正常生长并形成新的突触连接[[60](#_bookmark96)]。提示，神经元损伤修复及再生存在可能性，可以将异常表达的基因及神经营养因子作为突破口进行研究。

大量研究证实[[4](#_bookmark48), [61](#_bookmark97)]，NgR基因表达增加是多种细胞凋亡的重要标志。

47

且新近研究发现[[29](#_bookmark69), [30](#_bookmark70)]，NgR大量表达于幼鼠/成年小鼠的视网膜神经节层，NgR基因被干扰后，有助于RGCs存活，同时有效促进视神经损伤修复和重生。另有研究证实[[33](#_bookmark73)]，睫状神经营养因子CNTF具有支持滋养神经节细胞，促进轴突延伸及减轻体重等多重生理学功能。此外，CNTF能够调节视杆细胞光传导，促进视锥细胞外节及RGCs再生，保护三种细胞并维持其功能[[11](#_bookmark55), [34](#_bookmark74), [35](#_bookmark75)]。提示，NgR及CNTF很可能在糖尿病导致的视网膜神经节细胞凋亡及再生中发挥重要作用。

我们在第一部分实验中从细胞水平已经初步证实siNgR及CNTF对大鼠视网膜神经节细胞RGC-5具有明显保护作用，可有效抑制细胞凋亡，促进细胞增殖，且同NgR-RhoA-Rock1信号通路密切相关。但两者是否能在动物水平发挥同样的作用？两者是否可以促进神经元修复？这些问题仍需进一步探索。因此部分研究通过建立糖尿病大鼠模型，并给予玻璃体内局部注射siNgR或CNTF进行干预，结合HE染色、TUNEL、Real-time PCR、Western blot及免疫组化等多种病理及分子生物学技术，旨在从动物水平进一步验证siNgR及CNTF对大鼠视网膜神经节细胞凋亡及再生的影响，并探讨两者是否存在协同作用，期望能为DR的临床治疗提供一定的理论依据。

## 1. 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 动物及干扰片段

名称厂家

SD大鼠饲养于本实验室动物中心

siNgR及NC上海吉玛有限公司

#### 1.1.2 实验仪器

仪器名称生产厂家

超纯水系统中国香港Heal Force

48

石蜡切片机德国Leica

显微镜日本OLUMPUS

电热恒温培养箱中国天津泰斯特

电热恒温鼓风干燥箱中国上海精宏实验设备

超速冷冻离心机中国长沙湖南湘仪

紫外分光光度计美国Thermo

微量移液器中国苏州BIOHIT

微量进样器上海高鸽工贸有限公司

荧光定量PCR仪韩国BIONEER

真空干燥箱中国上海SYSBERY

水平摇床中国北京六一

酶标仪美国BIOTEK

电泳仪中国北京六一

凝胶成像系统中国北京六一

转移槽中国北京六一

双垂直蛋白电泳仪中国北京六一

#### 1.1.3 实验试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 |  | 生产厂家 |
| CNTF |  | 中国 SinoBiological |
| 柠檬酸 |  | 中国上海国药 |
| 柠檬酸钠 |  | 中国上海国药 |
| STZ |  | 中国北京 Solarbio |
| 二甲苯 |  | 中国国药 |
| 无水乙醇 |  | 中国国药 |
| 苏木精  曙红 Y，醇溶 |  | 中国 Solarbio  中国国药 |
|  | 49 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| In Situ Cell Death Detection Kit |  | 瑞士罗氏 |
| 过氧化氢 |  | 中国国药 |
| Triton X-100 DAB 显色液  Super M-MLV 反转录酶  Powder 琼脂糖  高纯总 RNA 快速提取试剂盒  2×Power Taq PCR MasterMix |  | 中国碧云天中国 Solarbio 中国 BioTeke 法国 Biowest 中国 BioTeke 中国 BioTeke |
| RNase 固相清除剂  50×TAE  SYBR Green |  | 中国天恩泽美国 Amresco  中国 Solarbio |
| 全蛋白提取试剂盒 |  | 中国万类生物 |
| 预染蛋白分子量标准  SDS-PAGE 电泳液（干粉） SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液BCA 蛋白浓度测定试剂盒Western 洗 涤 液 ECL 发光液 |  | 加拿大 Fermentas 中国万类生物 中国万类生物 中国万类生物 中国万类生物 中国万类生物  中国万类生物 |
| 脱脂奶粉 |  | 中国伊利 |
| PVDF 膜  Bcl-2 antibody |  | 美国 Millipore  中国 BOSTER |
| Bax antibody |  | 中国 BOSTER |
| Caspase-3 antibody |  | 英国 Abcam |
| F-actin antibody |  | 英国 Abcam |
|  | 50 |  |

GAP-43 antibody美国Santa

羊抗兔IgG-HRP中国万类生物

羊抗小鼠IgG-HRP中国万类生物

内参抗体GAPDH中国万类生物

辣根酶标记链酶亲合素中国碧云天

生物素化ft羊抗兔IgG中国碧云天

ft羊血清中国Solarbio

#### 1.1.4 常用试剂配制

（1）0.1 M柠檬酸溶液

取一干净烧杯，准确称取21.01 g柠檬酸放入烧杯内，量筒量取500

mL蒸馏水倒入，玻璃棒搅拌至药物溶解，加入蒸馏水将体积定容至1000 mL，得到浓度为0.1 M的柠檬酸溶液，置于4℃冰箱内保存备用。

（2）0.1 M柠檬酸钠溶液

取一干净烧杯，准确称取29.41 g柠檬酸钠放入烧杯内，量筒量取500

mL蒸馏水倒入，玻璃棒搅拌至药物溶解，加入蒸馏水将体积定容至1000 mL，得到浓度为0.1 M的柠檬酸钠溶液，置于4℃冰箱内保存备用。

（3）柠檬酸缓冲液

取一干净烧杯，量筒量取柠檬酸钠溶液15.4 mL，再量取24.6 mL柠檬酸溶液倒入，玻璃棒搅拌均匀，pH调至4.4，置于4℃冰箱内保存备用。

（4）STZ溶液

取一干净烧杯，准确称取1.625 g STZ放入烧杯内，量筒量取50 mL

柠檬酸缓冲液，玻璃棒搅拌至药物溶解，备用。

（5）CNTF溶液

取一干净EP管，准确称取100μg CNTF放入试管内，移液器吸取

500μL无菌生理盐水打入EP管内，反复吹打至药物溶解，备用。

51

（6）伊红染液

取一干净烧杯，准确称取3.5 g醇溶性伊红放入烧杯内，量筒量取

1000 mL 95 %酒精，玻璃棒搅拌至固体溶解，加几滴冰醋酸至半透明状，备用。

（7）1 %盐酸酒精

取一干净烧杯，量筒量取99 mL 70 %的酒精倒入烧杯内，取1 mL浓盐酸倒入烧杯内，玻璃棒搅拌混匀，备用。

（8）苏木素溶液

取一干净烧杯，准确称取0.4 g苏木精放入烧杯内，量筒量取50 mL

无水乙醇倒入，玻璃棒搅拌至固体溶解；另取一干净烧杯，准确称取2 g硫酸铝放入烧杯内，量筒量取150 mL蒸馏水，玻璃棒搅拌至固体溶解；将两种溶液混合，加热至沸腾，准确称取0.1 g碘酸钠和0.2 g柠檬酸放入溶液内，冷却至室温，保存备用。

（9）0.1 M PBS缓冲液

取一干净烧杯，准确称取29 g Na2HPO4、3 g NaH2PO4、85 g NaCl依次放入烧杯内，量筒量取500 mL蒸馏水倒入，玻璃棒搅拌至药物完全溶解，加入蒸馏水将体积定容至1000 mL，得到0.1 M PBS缓冲液，备用。

（10）0.01 M PBS缓冲液

取一干净烧杯，量筒量取100 mL 0.1 M PBS缓冲液倒入烧杯内，量取

900 mL的蒸馏水与其混匀，最后加入0.5 mL Tween-20，用NaOH调节

pH至7.2-7.4，备用。

（11）3 % H2O2溶液

取一干净烧杯，量筒分别量取1 mL 30 % H2O2与9 mL甲醇，倒入烧杯内混匀，备用。

(12) 0.1 % triton X-100

取一干净烧杯，量筒量取50 mL蒸馏水倒入烧杯内，移液器吸取50

52

μL 0.1 % triton X-100打入烧杯内，玻璃板搅拌均匀，备用。

（13）抗原修复液

取一干净烧杯，量筒依次量取9 mL柠檬酸缓冲液，41 mL柠檬酸钠缓冲液和450 mL蒸馏水倒入烧杯内，玻璃棒搅拌均匀，备用。

（14）聚丙烯酰胺溶液同1.1.4（4）。

（15）TBST缓冲液同1.1.4（5）。

（16）Western洗涤液同1.1.4（6）。

（17）Western电泳液同1.1.4（7）。

（18）转膜液同1.1.4（9）。

（19）5 %浓缩胶同1.1.4（11）。

（20）8 %分离胶同1.1.4（12）。

（21）10 %分离胶同1.1.4（13）。

（22）13 %分离胶同1.1.4（14）。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 动物模型的建立与分组给药

分组：选取SPF级健康雄性SD大鼠，体重约200-250 g，随机分为 6

组：对照组、糖尿病组、糖尿病+NC组、糖尿病+siNgR组、糖尿病

53

+CNTF组、糖尿病+siNgR+CNTF组。每组6只大鼠。

建模：各组大鼠在鼠笼内适应性喂养一周，实验前对大鼠进行全身及眼部常规检查，同时测量血糖值，以排除原发疾患。过夜禁食12 h后，除对照组大鼠，各组大鼠每只一次性腹腔注射STZ（65 mg/kg，溶于预冷的

0.01 M, pH=4.4的柠檬酸钠缓冲液中）诱导糖尿病动物模型，对照组每只大鼠腹腔注射等体积预冷的浓度为0.01 M、pH=4.4的柠檬酸钠缓冲液。诱导3 d后尾静脉采血检测各组大鼠血糖，浓度大于16.7 mM作为诱导糖尿病动物模型成功标准。

给药：模型成功后，糖尿病+siNgR组，糖尿病+siNgR+CNTF组大鼠玻璃体内局部注射5μL 3µM siNgR，糖尿病+NC组大鼠玻璃体内局部注射等量si-NC，6周后重复注射一次。糖尿病+CNTF组，糖尿病

+siNgR+CNTF组中的大鼠每周于玻璃体内注射神经营养因子CNTF 1μg，对照组和糖尿病组中的大鼠玻璃体内注射等体积的生理盐水。12周后，处死所有大鼠，取视网膜组织，部分固定4 %多聚甲醛溶液中，部分液氮速冻转至-70℃备用。

#### 1.2.2 HE染色观察视网膜神经节细胞变化

碱性燃料苏木精（hematoxylin, H）能够将细胞内核糖体或细胞核染成蓝紫色，被其染色的结构具有嗜碱性；酸性燃料伊红（eosin, E）能够将细胞质染成浅红色或红色，被其染色的结构具有嗜酸性。采用HE染色，可以区分组织细胞各部分结构的色彩差异，便于观察。

本部分实验采用HE染色观察玻璃体内内注射siNgR或CNTF后糖尿病视网膜神经节细胞形态及数量变化，进而分析NgR和CNTF对视网膜神经节细胞生存的影响。整个实验过程包括“包埋切片、将切片脱蜡至水、脱水、透明、封片及镜检”，具体方法如下：

（1）包埋切片

①脱水：将固定好的视网膜组织用自来水冲洗4 h，依次放入低浓度-高浓

54

度乙醇中对组织进行脱水处理，70 %(2 h)、80 %（过夜）、90 %(2 h)、100 % I(1 h)、100 % II（1 h），注：100 %乙醇有脆化作用，故组织放置时间不宜过长；

②透明：将脱水结束后的组织转移到二甲苯溶液中，至样本透明化；

③透蜡：将透明组织放入含有二甲苯的融化石蜡内，随后转移到60℃温箱处理2 h，至石蜡将标本组织完全浸透；

④包埋：向金属模具内注入融化的石蜡，然后将浸蜡组织放入中央，待其冷却凝固，得到蜡块；

⑤切片：将蜡块用切片机切成约5μm的薄片，放在温水中待其舒展；

⑥将展开的切片移到载玻片上，放入60℃烘箱烘干。

（2）切片脱蜡至水

取出切片 浸入二甲苯Ⅰ中，停留 15 min 浸入二甲苯Ⅱ中，停留15 min 浸入无水乙醇Ⅰ中，停留 5 m~~in~~ 浸入无水乙醇Ⅱ中，停留 5 min

浸入95 %、85 %、75 %梯度乙醇中，每个梯度停留2 min放入蒸馏水中，浸泡2 min。

（3）HE 染色

将切片浸入苏木精溶液中，停留5 min放入蒸馏水中，停留5 min

浸入1 %盐酸酒精溶液中，停留3 s置于自来水流水中冲洗20 min

浸入蒸馏水中，停留2 min浸入伊红染色液中，停留3 min。

（4）脱水、透明

将染色结束后的切片浸入 75 %、85 %、95 %梯度乙醇中，每个梯度停留 2 m~~in~~ 浸入无水乙醇Ⅰ中，停留 5 ~~mi~~n 浸入无水乙醇Ⅱ中，停留5 min

浸入二甲苯Ⅰ中，停留10 min浸入二甲苯Ⅱ中，停留10 min。

55

（5）封片、镜检

①取出切片，用滤纸吸干残余液体，滴加中性树胶封片；

②室温下待切片自然晾干，转移到显微镜下观察染色效果；

③400×镜下摄图，记录实验结果。

#### 1.2.3 TUNEL法检测细胞凋亡率

原位DNA末端标记TUNEL法是目前比较常用的一种分析细胞凋亡的方法。在细胞凋亡过程中，DNA断裂或损伤会暴露3'-OH末端，而经荧光素标记后的dUTP可以在TdT酶的作用下同3'-OH互补连接，形成异源多聚体，随后同连接HRP的抗体发生特异性结合，最后经DAB显色产生深棕色的颜色反应，从而可对发生凋亡的细胞进行着色，因此在光学显微镜下即可观察到凋亡细胞数量。而正常细胞或正处在增殖状态下的细胞一般不会发生DNA断裂，因此不能形成3'-OH，也不会被着色。

本部分实验采用TUNEL法观察玻璃体内内注射siNgR或CNTF后糖尿病视网膜神经节细胞凋亡率变化，进而分析NgR及CNTF对视网膜神经节细胞凋亡的影响。具体实验过程如下：

（1）对大鼠视网膜组织切片进行常规脱水、透蜡和包埋；

（2）向脱蜡至水后的切片上滴加50μL 0.1 %浓度的triton X-100，置于室温条件下静置10 min；

（3）PBS缓冲液清洗细胞，5 min/次，清洗3次；

（4）于冰上配制TUNEL反应液，然后擦干切片上残余液体，滴加50

μL提前配制的TUNEL反应液对样本细胞进行标记，置于37℃条件下避光孵育60 min；

（5）PBS缓冲液清洗细胞，5 min/次，清洗3次；

（6）用滤纸擦干切片周围残余的液体，向切片上滴加50μL Converter-

POD同被标记的复合物进行结合，转移至37℃条件下孵育30 min；

（7）PBS缓冲液清洗细胞，5 min/次，清洗3次；

56

（8）取出切片，用滤纸吸干周围残余液体，向切片上滴加50μL DAB显色液，发现颜色变身则立即浸入水中终止显色反应；

（9）PBS缓冲液清洗细胞，5 min/次，清洗3次；

（10）将显色后的切片放入苏木精染色液中，停留2 min，转移到流动的自来水中（水流需缓慢），倾斜冲洗2 min；

（11）拭干切片残余液体，浸入盐酸酒精中分化2 s，结束后立即置于自来水中反蓝15 min；

（12）将切片放入梯度乙醇（75 %、85 %、95 %）中进行脱水，每个梯度浸泡2 min；

（13）拭干切片残余液体，分别放入无水乙醇Ⅰ、无水乙醇Ⅱ溶液中，每个停留10 min；

（14）拭干切片残余液体，分别放入二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ溶液中，每个停留10 min；

（15）拭干切片周围残余液体，滴加中性树胶进行封片，室温下自然晾干；

（16）转移到显微镜下观察，400×镜下摄图，记录实验结果。

1.2.4 Real-time PCR检测mRNA的表达方法同第一章1.2.4.

1.2.5 Western blot检测蛋白的表达方法同第一章1.2.5.

1.2.6免疫组化检测蛋白的表达

免疫组化，亦被称为免疫细胞，是以经同位素、酶、金属及荧光等特殊标记的抗体作为媒介，根据抗体和抗原能够特异性结合的原理，定性和定量分析各种细胞或亚细胞中的抗原物质，如酶、蛋白质、多肽、受体及几激素等，借助普通显微镜、荧光或电子显微镜均可观察实验结果。不仅特异性强，而且定位准确、灵敏度高，形态与功能相结合。

57

本部分实验采用免疫组化技术检测玻璃体内内注射siNgR或CNTF后糖尿病大鼠视网膜组织中F-actin、GAP-43的表达变化，进而分析NgR及CNTF对视网膜神经节突触再生的影响。整个实验过程包括“包埋切片、将切片脱蜡至水、抗原修复、过氧化氢孵育及封闭、抗体孵育、辣根酶标记、DAB显色及苏木精、镜检”等，具体实验方法如下：

（1）包埋切片

①脱水：将固定好的视网膜组织用自来水冲洗4 h，依次放入低浓度-高浓度乙醇中对组织进行脱水处理，70 %(2 h)、80 %（过夜）、90 %(2 h)、100 % I(1 h)、100 % II（1 h），注：100 %乙醇有脆化作用，故组织放置时间不宜过长；

②透明：将脱水结束后的组织转移到二甲苯溶液中，至样本透明化；

③透蜡：将透明组织放入含有二甲苯的融化石蜡内，随后转移到60℃温箱处理2 h，至石蜡将标本组织完全浸透；

④包埋：向金属模具内注入融化的石蜡，然后将浸蜡组织放入中央，待其冷却凝固，得到蜡块；

⑤切片：将蜡块用切片机切成约5μm的薄片，放在温水中待其舒展；

⑥将展开的切片移到载玻片上，放入60℃烘箱烘干。

（2）切片脱蜡至水

取出切片 浸入二甲苯Ⅰ中，停留15 min 浸入二甲苯Ⅱ中，停留15 min 浸入无水乙醇Ⅰ中，停留5 m~~in~~ 浸入无水乙醇Ⅱ中，停留5 min

浸入95 %、85 %、75 %梯度乙醇中，每个梯度停留2 min放入蒸馏水中，浸泡2 min。

（3）抗原修复、过氧化氢孵育

①将切片放入盛有沸腾抗原修复液的容器内，小伙加热10 min进行抗原修复；

58

②修复结束后将切片放在室温下待其冷却，然后用PBS缓冲液清洗切片，

5 min/次，清洗3次；

③用滤纸拭干切片周围残余液体，并采用免疫组化笔在组织周围进行标记，然后滴加过氧化氢溶液，静置15 min，从而抑制内源性H2O2酶活性；

④PBS缓冲液清洗切片，5 min/次，清洗3次。

（4）ft羊血清封闭、抗体孵育

①向切片上滴加与二抗同种属的ft上血清进行封闭，室温下静置20 min

后去除血清；

②将PBS稀释后的一抗F-actin或GAP-43滴加在切片上，至覆盖组织样本，转移到4℃冰箱内过夜；

③孵育结束后PBS缓冲液清洗切片，5 min/次，清洗3次；

④将PBS稀释后的二抗生物素化ft羊抗兔IgG滴加在切片上，至覆盖组织样本，转移到37℃条件下孵育30 min；

⑤孵育结束后PBS缓冲液清洗切片，5 min/次，清洗3次。

（5）辣根酶标记及DAB显色

①二抗孵育结束后用滤纸拭干切片周围残余液体，滴加HRP标记亲和素到切片上，转移到37℃条件下，静置30 min；

②孵育结束后用PBS缓冲液清洗切片，5 min/次，清洗3次；

③用滤纸拭干切片周围残余液体，滴加100μL DAB显色液到玻片上，发现颜色变深则立即浸入水中终止显色反应。

（6）苏木素复染

①DAB显色结束后将切片放入苏木精染色液红对切片进行复染，3 min

后用自来水冲洗切片，避免直接冲洗切片表面；

②用滤纸拭干切片参与液体，放入1 %盐酸乙醇中分化3 s，随后放入自

来水中返蓝25 min。

（7）脱水透明、封片及镜检

59

①返蓝结束后将切片置于梯度乙醇氨溶液中脱水（75 %、85 %、95 %），每个梯度停留2 min；

②用滤纸拭干切片残余液体，依次放入无水乙醇和二甲苯溶液中，分别停留5 min和10 min；

③滤纸拭干残余液体，滴加中性树胶到玻片上，盖上盖玻片；

④切片晾干后转移到显微镜下进行观察，400×镜下摄图，记录实验结果。

### 1.3 统计学分析

本研究采用SPASS17.0统计软件分析实验结果，两组间分析比较采用

*t*检验，多组间数据比较采用单因素方差分析，所有数据以均数±方差

（*x*±*s*）表示，*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 2. 实验结果

### 2.1 糖尿病大鼠模型的建立

为了证明糖尿病大鼠模型的建立，我们在大鼠腹腔注射STZ 3d后尾静脉采血，测量每只大鼠的血糖浓度，最后取平均值。实验结果如表2-1和图2-1所示。从图中可以看出，通过对照组比较，糖尿病组（21.78±1.58

mmol/L）、糖尿病+NC组（22.03±1.68 mmol/L）、糖尿病+siNgR 组

（21.12±1.54 mmol/L）、糖尿病+CNTF组（21.05±3.05 mmol/L）以及糖尿病+CNTF+siNgR组（22.63±2.46 mmol/L）大鼠的血糖浓度均显著升高，具有显著性差异（*P*<0.01），且血糖值均大于16.7 mmol/L，表明糖尿病大鼠模型诱导成功。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 |  | 血糖浓度（mmol/L） |
| 对照组 |  | 4.62±0.35 |
| 糖尿病组 |  | 21.78±1.58\*\* |
| 糖尿病+NC 组 |  | 22.03±1.68\*\* |
| 糖尿病+siNgR 组 |  | 21.12±1.54\*\* |
| 糖尿病+CNTF 组 |  | 21.05±3.05\*\* |
| 糖尿病+CNTF+siNgR 组 |  | 21.12±1.54\*\* |
|  | 60 |  |

表2-1 大鼠血糖浓度（*x*±*s*, n=6）Table 2-1 The blood glucose of rats (*x*±*s*, n=6)

\*\**P*<0.01 vs control group



图2-1 各组大鼠血糖变化

Figure 2-1 The change of blood glucose of rats in each group

\*\**P*<0.01 vs control group

### 2.2 视网膜神经节细胞数目观察

为了分析siNgR及CNTF对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的影响，我们采用HE染色观察大鼠视网膜组织，显微镜下随机选取视野统计神经节层中RGCs数量，每组重复6次，最后取平均值。实验设置：对照组、高糖组、高糖+NC组、高糖+siNgR组、高糖+CNTF组、高糖+CNTF+siNgR组，结果如表2-2和图2-1所示。从表格和图片可以看出，正常视网膜组织结构清晰完整，层次分明，RGCs呈单层排列，形态完整，且数目较多。糖尿病组RGCs层空泡化，且出现核固缩，细胞数量明显减少

（11.83±1.94），具有显著性差异（*P*<0.01）；同糖尿病组比较，糖尿病

+NC组RGCs数量变化不明显，无统计学意义（*P*> 0.05）；而糖尿病

+siNgR组（15.83±1.72）、糖尿病+CNTF组（16.17±1.17）及糖尿病

+CNTF+siNgR组（18.00±2.61）中RGCs的数量均显著增加，具有显著性差异（*P*<0.01），且CNTF与siNgR协同作用下RGCs数目增加的更明显。由此可见，玻璃体内内注射CNTF或siNgR均可以显著增加大鼠视网膜神经节细胞数量，且两者存在协同作用。

61

表2-2 视网膜神经节细胞数目（*x*±*s*, n=6）Table 2-2 The numbers of retinal ganglion (*x*±*s*, n=6)

组别细胞数目（个）

对照组22.17±2.86

糖尿病组11.83±1.94\*\*

糖尿病+NC组11.67±2.16

糖尿病+siNgR组15.83±1.72##

糖尿病+CNTF组16.17±1.17##

糖尿病+CNTF+siNgR组18.00±2.61##

\*\**P*<0.01 vs control group, ##*P*<0.01 vs model group



图2-2 HE染色观察视网膜神经节数目（×400）

Figure 2-2 The number of retinal ganglion was observed by HE staining(×400)

### 2.3 TUNEL法观察视网膜神经节细胞凋亡率

为了分析siNgR及CNTF对大鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响，我们采用TUNEL染色检测RGCs的凋亡率，实验设置同前，显微镜下随机选取视野统计棕黄色细胞数量，每组重复6次，最后取平均值。结果如表2-

3和图2-2所示。从表格和图片可以看出，糖尿病组大鼠中TUNEL阳性细胞率（59.94±12.31 %）明显升高，具有显著性差异（*P*<0.01）；同糖尿病

62

组比较，糖尿病+NC组中TUNEL阳性细胞率并未发生明显变化，无统计学意义（*P*> 0.05），而糖尿病+siNgR组（39.35±9.64 %）、糖尿病+CNTF 组

（37.41±14.6 %）及糖尿病+CNTF+siNgR组（30.76±10.09 %）中TUNEL

阳性细胞率显著降低，具有显著性差异（*P*<0.05或*P*<0.01），且糖尿病

+CNTF+siNgR组中细胞凋亡率下降的更多。由此可见，玻璃体内内注射

CNTF或siNgR均可以显著减低大鼠视网膜神经节细胞凋亡率，且两者存在协同作用。

表2-3 视网膜神经节细胞凋亡率（*x*±*s*, n=6）Table 2-3 The apoptosis rate of retinal ganglion (*x*±*s*, n=6)

组别TUNEL阳性细胞率（%）

对照组2.78±3.33

糖尿病组59.94±12.31\*\*

糖尿病+NC组62.33±11.19

糖尿病+siNgR组39.35±9.64##

糖尿病+CNTF组37.41±14.6#

糖尿病+CNTF+siNgR组30.76±10.09##

\*\**P*<0.01 vs control group; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs model group



图2-3 TUNEL检测视网膜神经节细胞凋亡（×400）

Figure 2-3 Apoptosis of retinal ganglion cells was detected by tunel staining(×400)

### 2.4 Western blot检测Bcl-2、Bax、caspase-3蛋白的表达

63

为了进一步分析siNgR和CNTF降低糖尿病视网膜神经节细胞凋亡的分子机制，我们采用Western blot技术分析两者对细胞凋亡相关蛋白Bcl-

2、Bax、caspase-3表达的影响，实验设置同前，用凝胶图象处理系统

（Gel-Pro-Analyzer软件）分析目标条带的光密度值，每组重复5次，最后取平均值。结果如图2-4所示。从图中可以看出，糖尿病组大鼠视网膜组织中促凋亡蛋白Bax和caspase-3的表达明显增加，抗凋亡蛋白Bcl-2的表达显著减少，具有显著性差异（*P*<0.01）；同糖尿病组比较，糖尿病+NC组各指标的表达未发生明显变化，无统计学意义（*P*> 0.05），而糖尿病

+siNgR组、糖尿病+CNTF组及糖尿病+CNTF+siNgR组中促凋亡蛋白Bax和caspase-3的表达均显著减少，而抗凋亡蛋白Bcl-2的表达均显著增加，均具有显著性差异（*P*<0.01）；且CNTF和siNgR协同作用下，各蛋白的表达变化更明显。由此可见，玻璃体内内注射siNgR或CNTF均可以显著减少促凋亡蛋白的表达，增加抗凋亡蛋白的表达，且两者存在协同作用。

表2-4 Western blot实验数据（*x*±*s*, n=5）Table 2-4 Experimental data of Western blot (*x*±*s*, n=5)

组别 Bcl-2 Bax Caspase-3

对照组 1.00±0.00 1.00±0.00 1.00±0.00

糖尿病组 0.16±0.04a 3.98±1.00a 4.19±1.06a 糖尿病+NC 组 0.17±0.05 3.62±0.89 4.09±1.03 糖尿病+siNgR 组 0.42±0.08b 2.19±0.47b 2.23±0.51b 糖尿病+CNTF 组 0.53±0.10b 1.87±0.38b 1.97±0.44b

糖尿病+CNTF+siNgR 组 0.91±0.20bcd 1.72±0.35b 1.15±0.24bcd

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.05 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

64





图2-4 Western blot检测Bcl-2、Bax、caspase-3蛋白的表达

Figure 2-4 The protein expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 was detected by Western blot a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.05 vs model group, c*P*<0.01 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

### 2.5 Real-time PCR检测F-actin、GAP-43 mRNA表达

为了分析siNgR或CNTF对视网膜神经再生的影响，我们采用Real- time PCR技术检测轴突再生标志物F-actin、GAP-43 mRNA表达变化，实验设置同前。ExicyclerTM 96荧光定量仪分析实验结果，采用2-△△Ct法将Ct值转换成相应数值，对目的基因进行量化分析，每组重复5次，最后取平均值，结果如图2-5所示。从图中可以看出，糖尿病大鼠视网膜组织中F-actin及GAP-43 mRNA的表达显著减少，具有显著性差异

（*P*<0.01）；同糖尿病组比较，糖尿病+NC组中两者mRNA的表达并未发

65

生明显变化，无统计学意义（*P*> 0.05）；而糖尿病+siNgR组、糖尿病

+CNTF组及糖尿病+CNTF+siNgR组中轴突再生标志物F-actin、GAP-43

mRNA的表达明显增加，差异具有显著性（*P*<0.01），且糖尿病

+CNTF+siNgR组中两指标变化更明显。由此可见，玻璃体内内注射siNgR或CNTF均可以增加轴突再生标志物F-actin、GAP-43 mRNA的表达，促进视网膜神经再生，且两者存在协同作用。



GAPDH

F-actin

GARP-43

图2-5 A基因的扩增曲线

Figure 2-5 A Amplification curve of genes

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | F-actin | GAP43 |
| 对照组 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 糖尿病组 | 0.32±0.09a | 0.43±0.09a |
| 糖尿病+NC 组 | 0.38±0.08 | 0.53±0.11 |
| 糖尿病+siNgR 组 | 0.57±0.19b | 0.71±0.15b |

表2-5 Real-time PCR实验数据（*x*±*s*, n=5）Table 2-5 Experimental data of Real-time PCR (*x*±*s*, n=5)

66

糖尿病+CNTF组0.75±0.15b 0.74±0.16b

糖尿病+siNgR+CNTF组0.88±0.17bc 0.81±0.17b

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.05 vs model group, c*P*<0.05 vs model+siNgR group



图2-5B Real-time PCR检测F-actin、GAP-43 mRNA表达

Figure 2-5 B The mRNA expression of F-actin and GAP-43 was detected by Real-time PCR

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.05 vs model group, c*P*<0.05 vs model+siNgR group

### 2.6 Western blot检测F-actin、GAP-43蛋白的表达

为了进一步验证siNgR或CNTF对视网膜神经再生的影响，我们采用Western blot技术从蛋白水平检测轴突再生标志物F-actin、GAP-43的表达变化，实验设置同前，用凝胶图象处理系统（Gel-Pro-Analyzer软件）分析目标条带的光密度值，每组重复5次，最后取平均值。结果如图2-6所示。从图中可以看出，糖尿病组大鼠视网膜组织中F-actin及GAP-43蛋白表达水平显著降低，具有显著性差异（*P*<0.01）；同糖尿病组比较，糖尿病+NC组中两指标的表达并未发生明显变化，无统计学意义（*P*> 0.05）；而糖尿病+siNgR组、糖尿病+CNTF组及糖尿病+CNTF+siNgR组中轴突再生标志物F-actin、GAP-43的蛋白表达水平明显升高，差异具有显著性

（*P*<0.01），且糖尿病+CNTF+siNgR组中两指标的蛋白水平变化更明显。由此可见，玻璃体内内注射siNgR或CNTF亦可以明显增加轴突再生标志物F-actin、GAP-43蛋白的表达，促进视网膜神经再生，且两者存在协同作用。

67

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | F-actin | GAP-43 |
| 对照组 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 糖尿病组 | 0.34±0.08a | 0.27±0.06a |
| 糖尿病+NC 组 | 0.39±0.09 | 0.30±0.07 |
| 糖尿病+siNgR 组 | 0.71±0.14b | 0.59±0.07b |
| 糖尿病+CNTF 组 | 0.75±0.15b | 0.52±0.06b |
| 糖尿病+CNTF+siNgR 组 | 0.78±0.16b | 0.88±0.17bcd |

表2-6 Western blot实验数据（*x*±*s*, n=3）Table 2-6 Experimental data of Western blot (*x*±*s*, n=3)

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.05 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group





68

图2-6 Western blot检测F-actin、GAP-43蛋白表达

Figure 2-6 The protein expression of F-actin and GAP-43 was detected by Western blot a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.05 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

### 2.7 免疫组化检测F-actin、GAP-43蛋白的表达

为了进一步对轴突再生标志物进行定位和定量分析，我们采用免疫组化技术观察大鼠玻璃体内注射siNgR及CNTF后视网膜组织神经节层中F- actin、GAP-43的表达变化，实验设置同前，于显微镜下随机选取视野统计棕黄色颗粒，每组重复6次，最后取平均值。结果如图2-7所示。从图中可以看出，糖尿病大鼠视网膜神经节层中棕色颗粒（即F-actin和GAP- 43）明显减少（*P<0.01*）；同糖尿病组比较，糖尿病+NC组中两指标在神经节层的表达未发生明显变化，而糖尿病+siNgR组、糖尿病+CNTF组及糖尿病+CNTF+siNgR组神经节层中轴突再生标志物F-actin、GAP-43的表达显著升高（*P<0.01*），且糖尿病+CNTF+siNgR组中两指标变化更明显。由此可见，玻璃体内内注射siNgR或CNTF可以明显增加神经节层中F- actin、GAP-43蛋白的表达，促进视神经再生，且两者存在协同作用，同Western blot分析结果一致。

表2-7 免疫组化实验数据（*x*±*s*, n=6）

Table 2-7 Experimental data of immunohistochemistry (*x*±*s*, n=6)

平均光密度

| Group | F-actin | GAP-43 |
| --- | --- | --- |
| 对照组 | 6.77E-04±5.05E-05 | 4.17E-03±8.29E-04 |
| 糖尿病组 | 2.50E-04±7.53E-05a | 8.31E-04±2.11E-04a |
| 糖尿病+NC 组 | 2.29E-04±5.44E-05 | 8.60E-04±3.16E-04 |
| 糖尿病+siNgR 组 | 4.04E-04±6.62E-05b | 2.21E-03±2.51E-04 b |
| 糖尿病+CNTF 组 | 4.27E-04±7.29E-05b | 2.02E-03±4.62E-04b |
| 糖尿病+CNTF+siNgR 组 | 4.90E-04±1.04E-04b | 2.56E-03±7.02E-04 b |

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group

69



A



B

图2-7 A免疫组化观察F-actin、GAP-43蛋白表达

Figure 2-7 A The protein expression of F-actin and GAP-43 was observed by immunohistochemistry

A*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group

70



图2-7B 免疫组化观察F-actin、GAP-43蛋白表达（×400）

Figure 2-7 B The protein expression of F-actin and GAP-43 was observed by immunohistochemistry(×400)

## 3. 讨论

RGCs细胞凋亡是多因素、多系统共同参与的复杂过程。大量研究证实，视网膜神经节的存活及轴突再生均依赖于神经营养因子，其对中枢神经系统的调控作用包含两个方面，一是保护神经元细胞，促进细胞存活，

71

提高神经元细胞数量；二是使神经节轴突再生，并促进神经节细胞生长。此外，Brubaker等的研究发现[[62](#_bookmark98)]，神经营养因子能够抑制DM大鼠中出现在血管病变之前的RGCs发生凋亡，有效抑制DR进展及恶化，并猜测DR的发生可能是由于RGCs所依赖的神经营养因子显著减少导致。

睫状神经营养因子CNTF是一种酸性蛋白，分子量约为22kDa，大量分布在中枢神经系统，能够诱导神经元细胞分化，抑制其凋亡并促进其再生。既往研究发现[[63](#_bookmark99)]，外源性给予CNTF有助于提高鸡视网膜神经节细胞存活，并促进轴突再生。新近研究表明[[11](#_bookmark55), [34](#_bookmark74), [35](#_bookmark75)]，CNTF能够调节视杆细胞光传导，促进视锥细胞外节及RGCs再生，保护三种细胞并维持其功能。此外，Cui等的研究同样证实[[64](#_bookmark100)]，CNTF是大量神经营养因子中唯一一个能够促进RGCs再生的有效因子。提示，CNTF参与调控视网膜神经节细胞凋亡、损伤及再生过程。

生长相关蛋白-43（GAP-43）是神经细胞膜上的一种膜结合蛋白，广泛达于中枢神经系统，且在神经元的损伤及修复中均被发现异常高表达。国内外研究证实，GAP-43有利于神经元存活，且促进轴突再生，可以作为神经细胞生长发育的重要标志[[65](#_bookmark101), [66](#_bookmark102)]。此外，在视觉神经损伤及修复过程中，轴突生长同GAP-43的表达密切相关，进一步明确了GAP-43能够促进轴突再生[[67](#_bookmark103)]。

我们在前期工作中已经证实NgR及Rock1在DR病变视网膜中的表达显著增加。有研究表明，NgR-Rock信号通路被激活后会作用于F-actin系统，诱导神经椎塌陷，进而抑制神经节再生[[9](#_bookmark53)]。NgR基因表达增加是多种细胞凋亡的重要标志，而NgR-Rock信号通路活化已经被证明直接诱导RGCs损伤，抑制RGCs修复并诱导细胞凋亡。此外，在脑梗死大鼠中干扰NgR的表达可以促进病灶区域轴突生长，进而改善该区域的中枢神经功能[[68](#_bookmark104)]。提示，NgR参与调控视网膜神经节细胞凋亡、损伤及再生过程，且同F-actin密切相关。

72

综上，本部分研究旨在从动物水平分析大鼠玻璃体内局部注射siNgR或CNTF对糖尿病视网膜神经节细胞增凋亡及再生的影响，并探讨两者是否产生协同作用以及相关分子调控机制。

我们采用腹腔注射STZ建立糖尿病大鼠模型，3 d后尾静脉抽血，挑选血糖大于16.7 mmol/L的大鼠进行玻璃体内注射siNgR或CNTF进行干扰，6周后重复1次，12周处死大鼠，取视网膜组织，HE染色观察视网膜视网膜神经节层形态及细胞数量变化。结果显示，糖尿病大鼠RGCs层空泡化，且细胞数量明显减少（*P*<0.01）；而玻璃体腔内注射siNgR 或

CNTF后，RGCs的数量显著增加（*P*<0.01），且CNTF与siNgR协同作用下效果更明显。表明siNgR或CNTF能有效促进糖尿病RGCs增殖，且两者存在协同作用。

为了进一步分析siNgR或CNTF对糖尿病视网膜神经节细胞的影响，采用TUNEL法分析各组大鼠视网膜节层中RGCs凋亡情况，Western blot技术分析细胞凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2及caspase-3表达变化。结果显示，糖尿病大鼠视网膜中RGCs凋亡率显著升高，促凋亡蛋白Bax、caspase-3表达明显增加，抗凋亡蛋白Bcl-2表达明显减少（*P*<0.01）；而玻璃体腔内注射siNgR或CNTF可以分别将RGCs凋亡率降至（39.35±9.64 %）和

（37.41±14.6 %），并提高抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平，降低促凋亡蛋白Bax、caspase-3的表达水平，且两者协同作用下对RGCs凋亡及促凋亡蛋白表达的调控效果更明显。表明siNgR或CNTF能有效抑制糖尿病视网膜神经节细胞凋亡，促进抗凋亡蛋白表达，抑制促凋亡蛋白表达，且两者存在协同作用。

为了进一步分析siNgR或CNTF对糖尿病视网膜神经节再生的影响，分别采用Real-time PCR及Western blot技术检测轴突再生标志物F- actin、GAP-43 mRNA及蛋白的表达变化。结果显示，糖尿病大鼠视网膜组织中F-actin、GAP-43 mRNA及蛋白的表达均显著减少（*P*<0.01）；而玻

73

璃体内注射siNgR或CNTF可以显著提高F-actin及GAP-43的mRNA及蛋白表达水平（*P*<0.01），促进轴突再生，且两者协同作用下两指标表达水平上升的更明显。表明siNgR或CNTF能明显增加轴突再生标志物F- actin、GAP-43的表达，促进神经节细胞生长，且两者存在协同作用。

为了进一步验证siNgR或CNTF对视网膜神经节细胞轴突再生的影响，以及更直观的观察轴突再生标志物F-actin、GAP-43在视网膜神经节层的表达变化。采用免疫组化技术分析各组大鼠视网膜组织中F-actin、GAP- 43表达变化。结果显示，糖尿病大鼠视网膜神经节层中棕色颗粒（即F- actin、GAP-43）明显减少（*P*<0.01），而玻璃体内注射siNgR或CNTF可以显著增加网膜神经节层中的棕色颗粒数量（*P*<0.01），且两者协同作用

下两指标变化更明显。因此进一步验证了siNgR或CNTF能明显增加轴突再生标志物F-actin、GAP-43的表达，促进糖尿病视网膜神经节细胞生长，且两者存在协同作用。

## 4. 小结

（1）siNgR或CNTF可以显著增加糖尿病大鼠视网膜神经节层中的细胞数量；

（2）siNgR或CNTF可以显著抑制糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的凋亡；

（3）siNgR或CNTF通过促进抗凋亡蛋白Bcl-2表达，抑制促凋亡蛋白

Bax、caspase-3表达发挥抗视网膜神经节细胞凋亡作用；

（4）siNgR或CNTF可以通过增加轴突再生标志物F-actin和GAP-43的表达，促进视网膜神经节细胞再生；

（5）siNgR或CNTF对糖尿病视网膜神经节细胞的保护存在协同作用。

74

# 第三章 siNgR及CNTF影响糖尿病RGCs凋亡及再Th的分子机制

视网膜遭受损害后，各细胞层可以在神经营养因子的保护下减轻凋亡损伤，并发生细胞增生。也可以在NgR-RhoA-Rock信号通路激活状态下，经过一系列的胞内信号传递、转导和表达，引起细胞形态异常、结构紊乱甚至功能丧失，最终导致神经轴突固缩并引起神经节细胞损伤凋亡。有研究发现[[31](#_bookmark71)]，RhoA可以通过激活其下游主要效应蛋白Rho激酶降低Rac1

的表达，抑制神经突触的形成。另有研究证实[[29](#_bookmark69)]，NgR过表达抑制轴突延伸，阻止视网膜神经节细胞再生。此外，Rho激酶抑制剂法舒地尔可以通过调控Rho-Rock信号通路促进神经元轴突再生，保护生长锥并促进神经纤维生长，有效恢复神经功能[[69](#_bookmark105)]。而在脑梗死模型研究中发现[[70](#_bookmark106)]，法舒地尔不仅抑制脑组织炎性细胞浸润，而且可以有效促进神经再生，减轻神经细胞损伤造成的继发性损害。提示，NgR-RhoA-Rock信号通路很可能调控糖尿病视网膜神经节细胞的凋亡。损伤、修复和再生过程。

CNTF由Barbin等从鸡胚状神经元中提取，定位于人类染色体11q12，广泛表达于中枢神经系统中，且在视神经和嗅神经中的浓度相对较高。CNTF已经被证明可以促进神经元细胞存活，并抑制感光细胞在视网膜移植过程中发生凋亡[[71](#_bookmark107)]。CNTF被认为是唯一一种具有促神经节存活及轴突再生双重功能的神经营养因子，在神经系统发育、分化及凋亡损伤中发挥重要调控作用[[72](#_bookmark108)]。研究表明[[73](#_bookmark109)]，CNTF对视神经损伤后的神经节细胞生存具有促进作用。Cui等的研究证实[[47](#_bookmark85)]，CNTF是唯一肯定能有效促进成年仓鼠RGCs再生的神经营养因子。而在糖尿病早期，CNTF在一定程度上不仅可以抑制视网膜组织中内网状层细胞凋亡，而且可以减轻视神经结构受损造成的神经节细胞坏死，有效保护视网膜神经节细胞，促进其修复及再生[[13](#_bookmark57), [74](#_bookmark110)]。所以CNTF在病理条件下对视神经功能均具有非常重要的保护

75

作用。此外，更有研究报道[[75](#_bookmark111)]，RhoA激活后能抑制CNTF发挥的神经元分化功能。提示，CNTF参与调控糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡、损伤及再生过程很可能同NgR-RhoA-Rock信号通路密切相关。

我们在第二部分体内实验中已经证实siNgR及CNTF均可以增加糖尿病大鼠视网膜神经节细胞数量，抑制细胞凋亡，并促进轴突再生，且存在协同作用。但两者对RGCs的保护作用是否同NgR-RhoA-Rock信号通路有关尚不明确，仍需进一步探索。因此部分研究通过建立糖尿病大鼠模型，并给予玻璃体内局部注射siNgR或CNTF进行干预，结合Real-time PCR和Western blot技术分析NgR-RhoA-Rock信号通路相关蛋白的表达。旨在从动物水平验证siNgR及CNTF对糖尿病大鼠RGCs凋亡及再生的调控作用同NgR-RhoA-Rock信号通路活性有关。期望能为DR的临床治疗提供

新型分子靶点和可靠的实验依据。

## 1. 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 动物和干扰片段

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称  SD 大鼠  siNgR 及 NC |  | 厂家  饲养于本实验室动物中心上海吉玛有限公司 |
| 1.1.2 实验仪器 |  |  |
| 仪器名称 |  | 生产厂家 |
| 超纯水系统  紫外分光光度计微量移液器 |  | 中国香港 Heal  美国 Thermo  中国苏州 BIOHIT |
| 微量进样器 |  | 上海高鸽工贸有限公司 |
| 荧光定量 PCR 仪 |  | 韩国 BIONEER |
| 超速冷冻离心机 |  | 中国长沙湖南湘仪 |
|  | 76 |  |

真空干燥箱中国上海SYSBERY

电热恒温培养箱中国天津泰斯特

水平摇床中国北京六一

超速冷冻离心机中国长沙湖南湘仪

酶标仪美国BIOTEK

凝胶成像系统中国北京六一

转移槽中国北京六一

电泳仪中国北京六一

双垂直蛋白电泳仪中国北京六一

1.1.3实验试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 |  | 生产厂家 |
| SYBR Green  RNase 固相清除剂  Super M-MLV 反转录酶2×Power Taq PCR MasterMix 高纯总 RNA 快速提取试剂盒50×TAE  Powder 琼脂糖  NgR antibody |  | 中国 Solarbio 中国天恩泽中国 BioTeke 中国 BioTeke 中国 BioTeke 中国 BioTeke 法国 Biowest 英国 Abcam |
| RhoA antibody |  | 美国 Santa |
| Rock1 antibody |  | 美国 Santa |
| 羊抗兔 IgG-HRP |  | 中国万类生物 |
| 羊抗小鼠 IgG-HRP |  | 中国万类生物 |
| 内参抗体 GAPDH |  | 中国万类生物 |
| SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 |  | 中国万类生物 |
|  | 77 |  |

SDS-PAGE蛋白上样缓冲液中国万类生物

SDS-PAGE电泳液（干粉）中国万类生物

BCA蛋白浓度测定试剂盒中国万类生物

Western洗涤液中国万类生物

一抗二抗去除液中国万类生物

全蛋白提取试剂盒中国万类生物

PVDF膜美国Millipore

ECL发光液中国万类生物

预染蛋白分子量标准加拿大Fermentas

脱脂奶粉中国伊利

1.1.4常用试剂配制

（1）TBST缓冲液

方法同第一章1.1.4（5）。

（2）Western洗涤液

方法同第一章1.1.4（6）。

（3）Western电泳液

方法同第一章1.1.4（7）。

（4）PBS缓冲液

方法同第一章1.1.4（8）。

（5）转膜液

方法同第一章1.1.4（9）。

（6）10 % SDS溶液

方法同第一章1.1.4（10）。

（7）5 %浓缩胶

方法同第一章1.1.4（11）。

（8）8 %分离胶

78

方法同第一章1.1.4（12）。

（9）10 %分离胶

方法同第一章1.1.4（13）。

（10）13 %分离胶

方法同第一章1.1.4（14）。

### 1.2 实验方法

1.2.1动物模型的建立与分组给药方法同第二章1.2.1。

1.2.2 Real-time PCR检测mRNA的表达方法同第一章1.2.4.

1.2.3 Western blot检测蛋白的表达方法同第一章1.2.5.

### 1.3 统计学分析

本研究采用SPASS17.0统计软件分析实验结果，两组间分析比较采用

*t*检验，多组间数据比较采用单因素方差分析，所有数据以均数±方差

（*x*±*s*）表示，*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 2. 实验结果

### 2.1 Real-time PCR检测NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达

为了分析siNgR或CNTF保护视网膜神经节细胞受损，抑制细胞凋亡的具体分子机制。糖尿病大鼠玻璃体内注射siNgR或CNTF12周后，采用Real-time PCR检测NgR-RhoA-Rock1信号通路相关基因的表达，实验设置：糖尿病组、糖尿病+NC组、糖尿病+siNgR组、糖尿病+CNTF组、糖尿病

+CNTF+siNgR组，ExicyclerTM 96荧光定量仪分析实验结果，采用2-△

△Ct法将Ct值转换成相应数值，对目的基因进行量化分析，每组重复5次，最后取平均值，结果如图3-1所示。从图中可以看出，糖尿病大鼠视网膜组织中NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达均显著增加（*P*<0.01）；同

79

糖尿病组比较，糖尿病+NC组中三个指标的表达均未发生显著变化，无统计学意义（*P*> 0.05），而糖尿病+siNgR组、糖尿病+CNTF组及糖尿病

+CNTF+siNgR组中NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达水平均显著下降，具有显著性差异（*P*<0.01），且同糖尿病+siNgR组、糖尿病+CNTF组比较，糖尿病+CNTF+siNgR组中各指标表达水平下降的更明显，差异具有显著

性（*P*<0.01或*P*<0.05）。由此可见，糖尿病大鼠视网膜组织中NgR-RhoA-

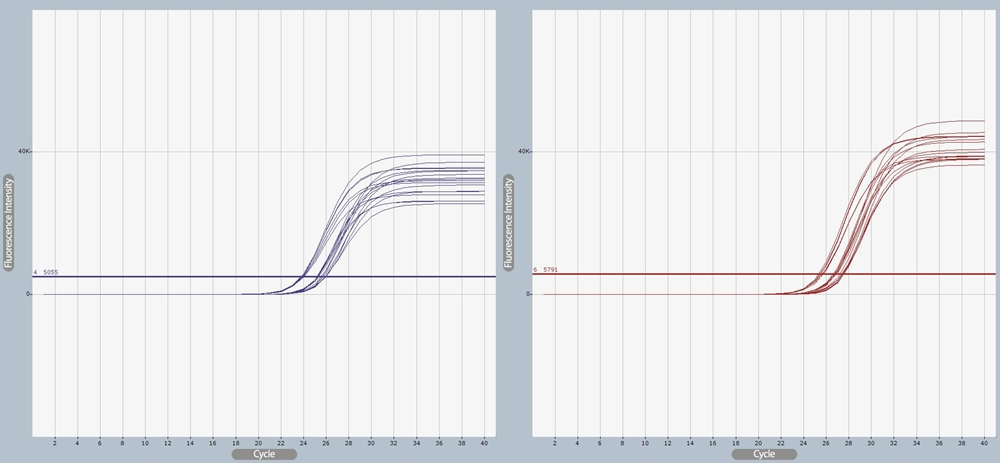
Rock1信号通路得到激活，而siNgR或CNTF可以显著信号通路相关基因



GAPDH

NgR

NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达，且两者存在协同作用。



RhoA

Rock1

图3-1 A基因的扩增曲线

Figure 3-1 A Amplification curve of genes

80

表3-1 Real-time PCR实验数据（*x*±*s*, n=5）Table 3-1 Experimental data of Real-time PCR (*x*±*s*, n=5)

组别（NgR）NgR RhoA Rock1

对照组1.00±0.00 1.00±0.00 1.00±0.00

糖尿病组4.10±0.89a 3.42±0.74a 4.07±0.91a糖尿病+NC组4.34±0.92 3.65±0.86 3.91±0.82糖尿病+siNgR组0.95±0.19b 1.73±0.36b 1.63±0.36b糖尿病+CNTF组1.72±0.40b 1.97±0.43b 2.05±0.41b

糖尿病+siNgR+CNTF组0.51±0.12bcd 0.74±0.23bcd 1.18±0.26bcd a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.05 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group



图3-1B Real-time PCR检测NgR、RhoA、Rock1 mRNA表达

Figure 3-1B The mRNA expression of NgR, RhoA and Rock1 was detected by Real-time PCR a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.05 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

### 2.2 Western blot检测NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达

为了进一步证明siNgR及CNTF对糖尿病视网膜神经节细胞的保护作用同NgR-RhoA-Rock1信号通路有关，我们采用Western blot技术检测各组细胞中NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达变化，实验设置同前。用凝胶图

81

象处理系统（Gel-Pro-Analyzer软件）分析目标条带的光密度值，每组重复5次，最后取平均值。结果如图3-2所示。从图中可以看出，糖尿病大鼠视网膜组织中NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达均显著增加（*P*<0.01）；同糖尿病组比较，糖尿病+NC组中三个指标的表达均未发生显著变化，无统计学意义（*P*> 0.05），而糖尿病+siNgR组、糖尿病+CNTF组及糖尿病

+CNTF+siNgR组中NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达水平均显著下降，具有显著性差异（*P*<0.01），且同糖尿病+siNgR组及糖尿病+CNTF组比较，糖尿病+CNTF+siNgR组中各指标表达水平下降的更明显，差异具有显著性（*P*<0.01或*P*<0.05）。由此可见，糖尿病大鼠视网膜组织中NgR-RhoA-

Rock1信号通路得到激活，而siNgR或CNTF可以显著抑制信号通路相关蛋白NgR、RhoA、Rock1的表达，且两者存在协同作用。

表3-2 Western blot实验数据（*x*±*s*, n=3）

Table 3-2 Experimental data of Western blot (*x*±*s*, n=3)

组别NgR RhoA Rock1

对照组1.00±0.00 1.00±0.00 1.00±0.00

糖尿病组3.17±0.76a 4.79±0.98a 5.13±1.18a糖尿病+NC组3.15±0.75 5.16±1.08 4.48±0.94糖尿病+siNgR组1.10±0.25b 2.19±0.46b 2.42±0.47b糖尿病+CNTF组1.59±0.33b 2.65±0.53b 2.97±0.28b

糖尿病+CNTF+siNgR组0.51±0.10bcd 0.65±0.13bcd 1.62±0.35bcd a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.05 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

82





图3-2 Western blot检测NgR、RhoA、Rock1蛋白表达

Figure 3-2 The protein expression of NgR, RhoA and Rock1 was detected by Western blot a*P*<0.01 vs control group, b*P*<0.01 vs model group, c*P*<0.05 vs model+siNgR group, d*P*<0.01 vs model+CNTF group

## 3. 讨论

经典理论认为哺乳动物视神经损伤后神经节层细胞不能有效再生，只有鱼类及两栖类动物的视神经离断后可以再生。近年研究发现[[17](#_bookmark61), [76](#_bookmark112)]，哺乳动物视神经具备再生潜能，能够在一定因素刺激下发生轴突出芽和突触重建；向受损神经部位移植周围正常神经或改变受损神经周围微环境，均可有效促进视神经轴突再生。如Aguayo等人于1985年首次将大鼠坐骨神经移植到受损视神经，培养4 d后观察到大鼠视网膜节细胞轴突发生再生

83

[[77](#_bookmark113)]. Su等人于1987年将周围神经去除鞘膜后移植入地鼠的视网膜内，使周围神经搭桥在受损的RGCs轴突上，成功促进神经节细胞生长[[78](#_bookmark114)]。以上研究提示视网膜神经节细胞损伤后具有再生潜能，适当改变受损视神经微环境可以促进RGCs存活并诱导轴突再生。

本课题组在前期工作研究中发现，NgR及Rock1在DR病变视网膜中的表达显著增加，提示NgR/Rock信号通路参与调控视网膜病变过程。有研究发现[[79-81](#_bookmark115)]，某些蛋白对DR视神经损伤后神经节细胞轴突再生和延长的抑制作用，是由易动蛋白（Nogo）和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白

（OMgp）等通过与其受体NgR结合，经过一系列胞内信号转导和传递，最终激活RhoA及其下游关键靶分子Rock介导的。另有研究证明

[[82](#_bookmark116)], Rock被激活后会抑制神经轴突再生，促进轴突细胞回缩。Wang等的研究发现[[83](#_bookmark117)]，NgR参与调控青光眼诱导的视力丧失过程，将其干扰后能有效促进神经挤压损伤后的RGCs发生再生。此外，玻璃体内注射siNgR或外源性营养因子酵母多糖，可以促进视神经轴突再生，且两者协同作用下轴突延伸的更长[[84](#_bookmark118)]。提示，NgR-RhoA-Rock1信号通路参与轴突再生及视神经修复工程。我们在第二部分实验中证实，糖尿病大鼠玻璃体内注射

siNgR能显著增加视网膜神经节层RGCs数量、抑制其凋亡并促进轴突再生，但其对NgR-RhoA-Rock1信号通路活性的影响尚未明确。

CNTF主要分布在中枢神经系统的嗅球、大脑皮质及小脑皮质下区，为非靶源性神经营养因子。有研究发现[[85](#_bookmark119)]，动物体内周围神经受损会刺激血旺细胞分泌更多CNTF，抑制神经元损伤，促进其存活。外源性给予

CNTF 可以抑制运动神经元损伤凋亡，促进轴突再生[[86](#_bookmark120)]。此外，睫状神经营养因子CNTF能够影响神经分化，促进轴突再生并抑制神经细胞凋亡[[87](#_bookmark121)]。另有研究证实，CNTF 是唯一能有效促进视网膜神经节细胞再生的神经营养因子[[47](#_bookmark85)]。Mathews等的研究表明[[10](#_bookmark54)]，CNTF对外伤性视神经损伤中的

RGC具有明显保护作用。亦有研究证实[[88](#_bookmark122)]，大鼠玻璃体内注射Rho GTP

84

酶抑制剂BA-210或CNTF可以增加视网膜神经节细胞存活，并促进轴突再生。更有研究显示[[75](#_bookmark111)]，RhoA激活后能抑制CNTF发挥的神经元分化功能。提示CNTF参与调控视网膜神经节细胞凋亡及再生过程，且很可能同NgR-RhoA-Rock1信号通路密切相关。

综上，本部分研究旨在以第二章研究结果为基础，继续从动物水平深入研究大鼠玻璃体内局部注射siNgR或CNTF调节糖尿病视网膜神经节细胞凋亡及再生的具体分子机制，并探讨两者是否存在协同作用。

我们采用腹腔注射STZ建立糖尿病大鼠模型，3 d后尾静脉抽血，挑选血糖大于16.7 mmol//的大鼠进行玻璃体内注射siNgR或CNTF进行干扰，6周后重复1次，12周处死大鼠，取视网膜组织。采用Real-time PCR技术分析各组大鼠视网膜组织中NgR-RhoA-Rock1信号通路相关基因

NgR、RhoA、Rock1 mRNA表达变化。结果显示，糖尿病大鼠视网膜组织中NgR、RhoA、Rock1 mRNA的表达均显著增加（*P*<0.01）；而玻璃体内注射siNgR或CNTF后三种基因的表达水平明显降低（*P*<0.01），且两者协同作用下三种基因的表达变化更明显。表明siNgR或CNTF能够有效抑制糖尿病大鼠视网膜组织中NgR-RhoA-Rock1信号通路激活，且两者存在协同作用。

为了进一步论证siNgR及CNTF在糖尿病大鼠视视网膜神经节细胞凋亡及再生过程中对NgR-RhoA-Rock1信号通路的调控作用，我们采用Western blot技术检测各组大鼠视网膜组织中NgR、RhoA、Rock1蛋白表达变化。结果显示，糖尿病大鼠视网膜组织中NgR、RhoA、Rock1蛋白的表达均显著增加（*P*<0.01）；而玻璃体内注射siNgR或CNTF后三种蛋白的表达水平明显降低（*P*<0.01），且两者协同作用下三种蛋白的表达变化更明显。进一步证明了siNgR或CNTF能够有效抑制糖尿病大鼠视网膜组织中NgR-RhoA-Rock1信号通路激活，且两者存在协同作用。

## 4. 小结

85

### （1）糖尿病视网膜病变激活NgR-RhoA-Rock1信号通路；

### （2）玻璃体内局部注射siNgR或神经营养因子CNTF显著抑制NgR- RhoA-Rock1信号通路活性；

### （3）siNgR和CNTF对NgR-RhoA-Rock1信号通路的抑制存在协同作用。

86

参考文献

[1] Morley JE. Diabetes and aging: epidemiologic overview [J]. Clin Geriatr Med. 2008, 24(3): 395-405, v.

[2] Ng DS, Chiang PP, Tan G, Cheung CM, Cheng CY, Cheung CY, et al. Retinal Ganglion Cell Neuronal Damage in Diabetes and Diabetic Retinopathy [J]. Clin Experiment Ophthalmol. 2016.

[3] Lin WJ, Kuang HY. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells [J]. Autophagy. 2014, 10(10): 1692-701.

[4] Tong S, Xiong N, Shen J. RNA interference suppression of Nogo-66 receptor prevents Nogo-66-mediated inhibition of invasion and adhesion and simultaneously increases cell apoptosis in C6 cells [J]. Oncol Rep. 2013, 30(5): 2171-8.

[5] Cui Z, Kang J, Hu D, Zhou J, Wang Y. Oncomodulin/truncated protamine- mediated Nogo-66 receptor small interference RNA delivery promotes axon regeneration in retinal ganglion cells [J]. Mol Cells. 2014, 37(8): 613-9.

[6] Nakaya N, Sultana A, Lee HS, Tomarev SI. Olfactomedin 1 interacts with the Nogo A receptor complex to regulate axon growth [J]. J Biol Chem. 2012, 287(44): 37171-84.

[7] Fu QL, Liao XX, Li X, Chen D, Shi J, Wen W, et al. Soluble Nogo-66 receptor prevents synaptic dysfunction and rescues retinal ganglion cell loss in chronic glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011, 52(11): 8374-80.

[8] Yin X, Chen C, Yuan R, Ye J. An immunofluorescence-histochemistry study of the Nogo receptor in the rat retina during postnatal development [J]. Ann Ophthalmol (Skokie). 2007, 39(2): 140-4.87

[9] Kopp MA, Liebscher T, Niedeggen A, Laufer S, Brommer B, Jungehulsing GJ, et al. Small-molecule-induced Rho-inhibition: NSAIDs after spinal cord injury [J]. Cell Tissue Res. 2012, 349(1): 119-32.

[10] Mathews MK, Guo Y, Langenberg P, Bernstein SL. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) -mediated ganglion cell survival in a rodent model of non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy (NAION) [J]. Br J Ophthalmol. 2015, 99(1): 133-7.

[11] Wen R, Tao W, Li Y, Sieving PA. CNTF and retina [J]. Prog Retin Eye Res. 2012, 31(2): 136-51.

[12] Hellstrom M, Harvey AR. Cyclic AMP and the regeneration of retinal ganglion cell axons [J]. Int J Biochem Cell Biol. 2014, 56: 66-73.

[13] Aizu Y, Katayama H, Takahama S, Hu J, Nakagawa H, Oyanagi K. Topical instillation of ciliary neurotrophic factor inhibits retinal degeneration in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Neuroreport. 2003, 14(16): 2067-71.

[14] Gomez M, Hernandez ML, Pazos MR, Tolon RM, Romero J, Fernandez- Ruiz J. Colocalization of CB1 receptors with L1 and GAP-43 in forebrain white matter regions during fetal rat brain development: evidence for a role of these receptors in axonal growth and guidance [J]. Neuroscience. 2008, 153(3): 687-99.

[15] Bormann P, Zumsteg VM, Roth LW, Reinhard E. Target contact regulates GAP-43 and alpha-tubulin mRNA levels in regenerating retinal ganglion cells [J]. J Neurosci Res. 1998, 52(4): 405-19.

[16] Meyer RL, Miotke JA, Benowitz LI. Injury induced expression of growth- associated protein-43 in adult mouse retinal ganglion cells in vitro [J]. Neuroscience. 1994, 63(2): 591-602.

[17] Williams RR, Venkatesh I, Pearse DD, Udvadia AJ, Bunge MB. MASH1/Ascl1a leads to GAP-43 expression and axon regeneration in the adult

88

CNS [J]. PLoS One. 2015,10(3):e0118918.

[18] Grasselli G, Strata P. Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein GAP-43 [J]. Front Neural Circuits. 2013, 7: 25.

[19] Mehrotra N, Tripathi RM. Short interfering RNA therapeutics: nanocarriers, prospects and limitations [J]. IET Nanobiotechnol. 2015, 9(6): 386- 95.

[20] Ku SH, Jo SD, Lee YK, Kim K, Kim SH. Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics [J]. Adv Drug Deliv Rev. 2015.

[21] Zhao H, Zhang J, Yu J. HMGB-1 as a Potential Target for the Treatment of Diabetic Retinopathy [J]. Med Sci Monit. 2015, 21: 3062-7.

[22] Kim SJ, Yoo WS, Choi M, Chung I, Yoo JM, Choi WS. Increased O- GlcNAcylation of NF-kappaB Enhances Retinal Ganglion Cell Death in Streptozotocin-induced Diabetic Retinopathy [J]. Curr Eye Res. 2016, 41(2): 249- 57.

[23] Wang J, Chan CK, Taylor JS, Chan SO. The growth-inhibitory protein Nogo is involved in midline routing of axons in the mouse optic chiasm [J]. J Neurosci Res. 2008, 86(12): 2581-90.

[24] Nie QZ, Liu ZL, Sha Q, Gao DW. Expression of Nogo-A on the retina in rat model with chronic ocular hypertension [J]. Int J Ophthalmol. 2010, 3(2): 112- 3.

[25] Liu X, Zuo Z, Liu W, Wang Z, Hou Y, Fu Y, et al. Upregulation of Nogo receptor expression induces apoptosis of retinal ganglion cells in diabetic rats [J]. Neural Regen Res. 2014, 9(8): 815-20.

[26] Pula B, Werynska B, Olbromski M, Muszczynska-Bernhard B, Chabowski M, Janczak D, et al. Expression of Nogo isoforms and Nogo-B receptor (NgBR) in non-small cell lung carcinomas [J]. Anticancer Res. 2014, 34(8): 4059-68.89

[27] Pula B, Olbromski M, Owczarek T, Ambicka A, Witkiewicz W, Ugorski M, et al. Nogo-B receptor expression correlates negatively with malignancy grade and ki-67 antigen expression in invasive ductal breast carcinoma [J]. Anticancer Res. 2014, 34(9): 4819-28.

[28] Chi C, Liu N, Yue L, Qi WW, Xu LL, Qiu WS. RTN4/Nogo is an independent prognostic marker for gastric cancer: preliminary results [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015, 19(2): 241-6.

[29] Fischer D, He Z, Benowitz LI. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state [J]. J Neurosci. 2004, 24(7): 1646-51.

[30] Harvey AR, Hu Y, Leaver SG, Mellough CB, Park K, Verhaagen J, et al. Gene therapy and transplantation in CNS repair: the visual system [J]. Prog Retin Eye Res. 2006, 25(5): 449-89.

[31] Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S, Mueller BK. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar [J]. Mol Cell Neurosci. 2003, 22(3): 319-30.

[32] Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons [J]. Science. 1979, 204(4400): 1434-6.

[33] Matthews VB, Febbraio MA. CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease[J]. JMolMed(Berl). 2008, 86(4): 353-61.

[34] Li R, Wen R, Banzon T, Maminishkis A, Miller SS. CNTF mediates neurotrophic factor secretion and fluid absorption in human retinal pigment epithelium [J]. PLoS One. 2011, 6(9): e23148.

[35] Li Y, Tao W, Luo L, Huang D, Kauper K, Stabila P, et al. CNTF induces

90

Regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration [J]. PLoS One. 2010,5(3):e9495.

[36] Leibinger M, Muller A, Andreadaki A, Hauk TG, Kirsch M, Fischer D. Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor [J]. J Neurosci. 2009, 29(45): 14334-41.

[37] Crandall JP, Knowler WC, Kahn SE, Marrero D, Florez JC, Bray GA, et al. The prevention of type 2 diabetes [J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2008, 4(7): 382-93.

[38] Di Rosa M, Distefano G, Gagliano C, Rusciano D, Malaguarnera L. Autophagy in Diabetic Retinopathy [J]. Curr Neuropharmacol. 2016.

[39] Malone JI, Morrison AD, Pavan PR, Cuthbertson DD. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial [J]. Diabetes Care. 2001, 24(3): 522-6.

[40] Nakajima M, Cooney MJ, Tu AH, Chang KY, Cao J, Ando A, et al. Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001, 42(9): 2110-4.

[41] Jingi AM, Noubiap JJ, Ellong A, Bigna JJ, Mvogo CE. Epidemiology and treatment outcomes of diabetic retinopathy in a diabetic population from Cameroon [J]. BMC Ophthalmol. 2014, 14: 19.

[42] Ferris FL, 3rd, Davis MD, Aiello LM. Treatment of diabetic retinopathy [J]. N Engl J Med. 1999, 341(9): 667-78.

[43] Silva PS, Cavallerano JD, Sun JK, Aiello LM, Aiello LP. Effect of systemic medications on onset and progression of diabetic retinopathy [J]. Nat Rev

91

Endocrinol. 2010,6(9):494-508.

[44] Kizawa J, Machida S, Kobayashi T, Gotoh Y, Kurosaka D. Changes of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with early diabetic retinopathy [J]. Jpn J Ophthalmol. 2006, 50(4): 367-73.

[45] Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin [J]. J Clin Invest. 1998, 102(4): 783-91.

[46] Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA. Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes [J]. Clin Experiment Ophthalmol. 2000, 28(1): 3-8.

[47] Cui Q, Lu Q, So KF, Yip HK. CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999, 40(3): 760-6.

[48] Yu XH, Zhang H, Wang YH, Liu LJ, Teng Y, Liu P. Time-dependent reduction of glutamine synthetase in retina of diabetic rats [J]. Exp Eye Res. 2009, 89(6): 967-71.

[49] Villarroel M, Ciudin A, Hernandez C, Simo R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy [J]. World J Diabetes. 2010, 1(2): 57-64.

[50] Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, Alhomida AS. Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy [J]. Int J Mol Sci. 2013, 14(2): 2559-72.

[51] Verma A, Raman R, Vaitheeswaran K, Pal SS, Laxmi G, Gupta M, et al. Does neuronal damage precede vascular damage in subjects with type 2 diabetes mellitus and having no clinical diabetic retinopathy[J]. OphthalmicRes. 2012, 47(4): 202-7.

[52] Wang H, Zheng Z, Gong Y, Zhu B, Xu X. U83836E inhibits retinal neurodegeneration in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Ophthalmic Res. 2011, 46(1): 19-24.92

[53] Li P, Xu X, Zheng Z, Zhu B, Shi Y, Liu K. Protective effects of rosiglitazone on retinal neuronal damage in diabetic rats [J]. Curr Eye Res. 2011, 36(7): 673-9.

[54] Zhu T, Ma J, Li Y, Zhang Z. Association between retinal neuronal degeneration and visual function impairment in type 2 diabetic patients without diabetic retinopathy [J]. Sci China Life Sci. 2015, 58(6): 550-5.

[55] Bonnin S, Tadayoni R, Erginay A, Massin P, Dupas B. Correlation between ganglion cell layer thinning and poor visual function after resolution of diabetic macular edema [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015, 56(2): 978-82.

[56] Yuan J, Zou M, Xiang X, Zhu H, Chu W, Liu W, et al. Curcumin improves neural function after spinal cord injury by the joint inhibition of the intracellular and extracellular components of glial scar [J]. J Surg Res. 2015, 195(1): 235-45.

[57] Mohamed R, El-Remessy AB. Imbalance of the Nerve Growth Factor and Its Precursor: Implication in Diabetic Retinopathy [J]. J Clin Exp Ophthalmol. 2015, 6(5).

[58] Schmeer CW, Wohl SG, Isenmann S. Cell-replacement therapy and neural repair in the retina [J]. Cell Tissue Res. 2012, 349(1): 363-74.

[59] Robinson GA. Changes in the expression of transcription factors ATF-2 and Fra-2 after axotomy and during regeneration in rat retinal ganglion cells [J]. Brain Res Mol Brain Res. 1996, 41(1-2): 57-64.

[60] Weidner N, Grill RJ, Tuszynski MH. Elimination of basal lamina and the collagen" scar" after spinal cord injury fails to augment corticospinal tract regeneration [J]. Exp Neurol. 1999, 160(1): 40-50.

[61] Liu F, Li M, Liu C, Liu Y, Liang Y, Wang F, et al. Tumor-specific delivery and therapy by double-targeted DTX-CMCS-PEG-NGR conjugates [J]. Pharm Res. 2014, 31(2): 475-88.93

[62] Brubaker RF. Delayed functional loss in glaucoma. LII Edward Jackson Memorial Lecture [J]. Am J Ophthalmol. 1996, 121(5): 473-83.

[63] Li WH, Sadler LA. Low nucleotide diversity in man [J]. Genetics. 1991, 129(2): 513-23.

[64] Cui Q, Cho KS, So KF, Yip HK. Synergistic effect of Nogo-neutralizing antibody IN-1 and ciliary neurotrophic factor on axonal regeneration in adult rodent visual systems [J]. J Neurotrauma. 2004, 21(5): 617-25.

[65] Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity [J]. Trends Neurosci. 1997, 20(2): 84-91.

[66] Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes [J]. Science. 2001, 293(5529): 489-93.

[67] Aigner L, Caroni P. Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43-depleted growth cones [J]. J Cell Biol. 1995, 128(4): 647-60.

[68] Lopes de Faria JM, Russ H, Costa VP. Retinal nerve fibre layer loss in patients with type 1 diabetes mellitus without retinopathy [J]. Br J Ophthalmol. 2002, 86(7): 725-8.

[69] Baba H, Tanoue Y, Maeda T, Kobayashi M, Oda S, Tominaga R. Protective effects of cold spinoplegia with fasudil against ischemic spinal cord injury in rabbits [J]. J Vasc Surg. 2010, 51(2): 445-52.

[70] Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Nakashima S, et al. Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons [J]. Brain Res. 2007, 1154: 215-24.

[71] Caffe AR, Soderpalm AK, Holmqvist I, van Veen T. A combination of CNTF and BDNF rescues rd photoreceptors but changes rod differentiation in

94

The presence of RPE in retinal explants [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001,42(1):275-82.

[72] Muller A, Hauk TG, Fischer D. Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation [J]. Brain. 2007, 130(Pt 12): 3308-20.

[73] Cui Q, Pollett MA, Symons NA, Plant GW, Harvey AR. A new approach to CNS repair using chimeric peripheral nerve grafts [J]. J Neurotrauma. 2003, 20(1): 17-31.

[74] Duff E, Li CL, Hartzell DL, Choi YH, Della-Fera MA, Baile CA. Ciliary neurotrophic factor injected icv induces adipose tissue apoptosis in rats [J]. Apoptosis. 2004, 9(5): 629-34.

[75] Kjoller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases [J]. Exp Cell Res. 1999, 253(1): 166-79.

[76] Leibinger M, Muller A, Gobrecht P, Diekmann H, Andreadaki A, FischerD. Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation [J]. Cell Death Dis. 2013, 4: e609.

[77] So KF, Aguayo AJ. Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats [J]. Brain Res. 1985, 328(2): 349-54.

[78] You SW, So KF, Yip HK. Axonal regeneration of retinal ganglion cells depending on the distance of axotomy in adult hamsters [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000, 41(10): 3165-70.

[79] Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp [J]. Nature. 2002, 420(6911): 74-8.

[80] Borisoff JF, Chan CC, Hiebert GW, Oschipok L, Robertson GS, Zamboni

95

R, et al. Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates [J]. Mol Cell Neurosci. 2003,22(3):405-16.

[81] Wang J, Liu X, Zhong Y. Rho/Rho-associated kinase pathway in glaucoma (Review) [J]. Int J Oncol. 2013, 43(5): 1357-67.

[82] Katoh H, Aoki J, Ichikawa A, Negishi M. p160 RhoA-binding kinase ROKalpha induces neurite retraction [J]. J Biol Chem. 1998, 273(5): 2489-92.

[83] Wang X, Lin J, Arzeno A, Choi JY, Boccio J, Frieden E, et al. Intravitreal delivery of human NgR-Fc decoy protein regenerates axons after optic nerve crush and protects ganglion cells in glaucoma models [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015, 56(2): 1357-66.

[84] Chen C, Chen X, Yin X, Yuan R, Wang B, Ye J. NgR RNA interference, combined with zymosan intravitreal injection, enhances optic nerve regeneration [J]. J Neurochem. 2009, 110(5): 1628-34.

[85] Weise J, Isenmann S, Klocker N, Kugler S, Hirsch S, Gravel C, et al. Adenovirus-mediated expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) rescues axotomized rat retinal ganglion cells but does not support axonal regeneration in vivo [J]. Neurobiol Dis. 2000, 7(3): 212-23.

[86] Sahenk Z, Seharaseyon J, Mendell JR. CNTF potentiates peripheral nerve regeneration [J]. Brain Res. 1994, 655(1-2): 246-50.

[87] Pernet V, Joly S, Jordi N, Dalkara D, Guzik-Kornacka A, Flannery JG, et al. Misguidance and modulation of axonal regeneration by Stat3 and Rho/ROCK signaling in the transparent optic nerve [J]. Cell Death Dis. 2013, 4: e734.

[88] Drummond ES, Rodger J, Penrose M, Robertson D, Hu Y, Harvey AR. Effects of intravitreal injection of a Rho-GTPase inhibitor (BA-210), or CNTF combined with an analogue of cAMP, on the dendritic morphology of regenerating retinal ganglion cells [J]. Restor Neurol Neurosci. 2014, 32(3): 391-

96

402.

97

# 文献综述

1. DR的流行病学研究

糖尿病（diabetes mellitus, DM）为临床上比较常见的内分泌代谢性疾病，是世界范围内发病率和死亡率较高的五大疾病之一[[1](#_bookmark125), [2](#_bookmark126)]，包括Ⅰ型糖尿病、Ⅱ型糖尿病以及其它特殊种类的糖尿病等。致病因素有遗传、免疫功能障碍、微生物感染以及精神因素等[[3](#_bookmark127)]，可诱导机体胰岛素功能衰退并产生胰岛素抵抗。以高血糖为主要临床病理特点，典型患者会出现“三多一少”症状，即多食、多饮多尿且身体消瘦[[4](#_bookmark128)]。伴随当代生活方式的改变以及生活水平的提高，我国DM的发病率呈现逐年上升趋势，目前全世界DM患病人数约2.4亿人，预计2025年将增长至3.5亿人[[5](#_bookmark129)]，因此DM已经成为乃至世界范围内重大公共卫生问题之一。

2. DR的病理学改变及诱导因素[[6](#_bookmark130)]

DM可以诱导视神经病变、青光眼、白内障等多种眼部疾病[[7-9](#_bookmark131)]，其中糖尿病视网膜病变（Diabetic Retinopathy, DR）是DM患者最常见的慢性并发症之一，也最为严重，可致DM患者视力严重受损甚至丧失，是成年人失明的重要因素[[10-12](#_bookmark132)]，严重影响患者生活质量。

DR是一种多因素参与，继而向多层次进展的严重眼部并发症，主要病理表现为毛细血管周边细胞缺失、微血管成瘤、毛细血管基底膜增厚引起的血-视网膜屏障损伤、毛细血管堵塞、小动或静脉闭锁、新生血管异常增多等，继而诱导视网膜发生水肿、渗出甚至出血、肿胀，最终坏死

[[13](#_bookmark133)]. 多年来伴随对DR不断深入探索，发现GR发病及进展涉及细胞生长因子、NO含量[[14](#_bookmark134)]、自由基以及醇糖代谢通路异常[[15](#_bookmark135), [16](#_bookmark136)]、蛋白质非酶糖化

[[17](#_bookmark137)]、脂质过氧化[[18](#_bookmark138)]以及细胞凋亡[[19](#_bookmark139)]等多种因素。此外，黏蛋白以及蛋白

激酶C可以损伤微血管内皮细胞，改变血管通透性，进而引起各种基因、蛋白、细胞因子以及激酶等的表达平衡遭到破坏，最终引起血管功能障碍

98

并加重血管病变，损伤视网膜神经节层细胞导致视力下降。

经典理论认为DR是DM视网膜微血管病变及其并发症，目前临床比较常用的治疗方法即为早期发现并有效治疗视网膜微血管病变。但是伴随现代医学的快速进步，越来越多的研究发现[[20](#_bookmark140), [21](#_bookmark141)]，DR发病过程不仅单单存在视网膜微血管病变，而且神经胶质细胞以及视觉神经元等也受到了严重损害。亦有研究报道[[22](#_bookmark142), [23](#_bookmark143)]，糖尿病患者只有在多年后才会出现明显的眼底血管变化，而视网膜电流图在眼底未发生改变时已经表现异常，波振幅下降且潜伏期延长。此外，在临床实践以及实验研究中亦有人发现[[24](#_bookmark144)]，在视网膜微血管病变发生之前，视网膜神经节细胞（retinalganglion cells, RGCs）已经遭受损伤并出现功能异常。

3. DM早期RGCs细胞损伤

RGCs位于视网膜内侧神经节细胞层，是唯一的视觉输出细胞，因此探索其在DM早期的凋亡及保护尤为重要，目前国内外已经有大量学者对其进行探索。有研究发现[[25](#_bookmark145)]，在链脲菌素诱导的糖尿病动物模型中，视网膜RGCs出现大量空泡样变，并伴随线粒体肿胀，同时视网膜监测电流图中波幅和振荡电位均发生显著下降。Martin等的研究证实[[26](#_bookmark146)]，在DM患者未发生DR之前，视网膜中神经纤维层显著变薄，节细胞层厚度降低，表明RGCs数目明显减少。另有研究表明[[27](#_bookmark147)]，链脲菌素诱导的大鼠视网膜组织中，18.6 %的RGCs缺失，并证实这部分细胞已经发生凋亡。

90年代有研究者采用TUNEL法证实[[28](#_bookmark148), [29](#_bookmark149)]，在DM患者以及DM大鼠视网膜组织中，存在大量凋亡细胞。另有研究发现[[30](#_bookmark150)]，促凋亡蛋白caspase-3/-9以及Bax在DM患者视神经节层中的表达显著增多。Barber等的研究表明[[31](#_bookmark151)]，大鼠患DM一个月后，同正常对照组比较，模型组大鼠视网膜组织中RGCs的凋亡率增加10 %，且这种变化一直持续一年以后。此外，在DM小鼠模型中，视网膜组织中神经节细胞严重缺失，同时伴随视网膜内丛状层变薄[[32](#_bookmark152)]。更有研究证实[[33](#_bookmark153)]，RGCs在DM大鼠视网膜组织

99

中明显减少，且发生机制同caspase家族异常表达密切相关。以上研究均说明在DM患者早期已经发生RGCs损伤、结构改变及细胞凋亡。

4. DR中RGCs细胞受损机制[[34](#_bookmark154)]

4.1神经营养因子的减少

神经营养因子（neurotrophins, TNs）属于分泌型蛋白，影响神经元分化、增殖、轴突生长、突触再生及可塑性等，具有较强的神经营养作用，提高神经元细胞活力，并促进突触有效传递信息[[35](#_bookmark155), [36](#_bookmark156)]。总之，其对中枢神经系统的作用包括两个方面：一是保护神经节细胞生存，并促进其增殖，二是促进神经节轴突生长，提高神经元再生能力。越来越多的研究证实[[37-](#_bookmark157)

[39](#_bookmark157)], RGCs细胞增殖及轴突生长需要周围神经营养因子的滋养。另有研究表明[[40](#_bookmark158), [41](#_bookmark159)]，TNs能够抑制DM大鼠早期出现的视网膜神经节层细胞凋亡，在一定程度上阻止DR发病及进展，并推测RGCs生长所需的TNs的缺失很可能是直接导致细胞凋亡及DR发生的重要原因。

4.2谷氨酸产Th的毒性

谷氨酸（glutamic acid, GLU）是存在于中枢神经系统的重要神经递质，介导突触间兴奋性传递。但是过量的GLU会诱导神经元损伤甚至发生凋亡，这种现象被称作“谷氨酸兴奋性毒性”。GLU浓度过高引起的神经元坏死参与调控众多神经系统疾病，并在病理进展中扮演重要角色。如高眼压病理状态下GLU的大量引起的兴奋性毒素是导致RGCs细胞凋亡的重要原因[[42](#_bookmark160)]。多项研究报道[[43](#_bookmark161), [44](#_bookmark162)]，DM患者视网膜组织内GLU浓度异常升高。另有研究证实[[44](#_bookmark162)]，DM患者视网膜组织内谷氨酸转氨酶及谷氨酰胺转氨酶的活性明显下降，导致GLU大量堆积，并引起视神经谷氨酸毒性。此外，DM患者视网膜中的，Muller细胞发挥的“清道夫”功能下降，对GLU的摄

取转化显著减少，造成其大量堆积并引起神经毒性，最终损伤患者视力[[45](#_bookmark163)]。

4.3凋亡基因对RGCs的调控

与细胞凋亡相关的基因主要包括两大类，促凋亡基因和抗凋亡基因，

100

两类基因的表达水平决定细胞存亡。目前参与调控RGCs损伤及凋亡的基因和蛋白很多，促凋亡基因包括野生型 p53、c-myc、ced-3、c- fos、Bax、Bcl-x、Bak等，抗凋亡基因包括Bcl-2、Bcl-xl以及突变型p53等[[46-48](#_bookmark164)]。这些基因编码的相应蛋白编织呈复杂的通路网络，最终作为调控开关决定细胞存亡[[49](#_bookmark165)]。

Bcl-2家族[[50](#_bookmark166)]是最具代表性的、也是目前比较公认的重要抗凋亡基因，通过抑制凋亡信号传递的最后通路促进细胞生存。有动物实验研究表明[[51](#_bookmark167)]，Bcl-2及crmtA表达增加后可以抑制神经营养因子缺乏引起的细胞凋亡。越来越多的研究证实[[46](#_bookmark164), [52](#_bookmark168)]，Bcl-2基因可以阻断外界因素诱导的视网膜RGCs细胞程序性死亡。此外，Bcl-2可以同自己家族成员形成蛋白二聚体，继而通过调节氧自由基产生及线粒体通透性等多种途径发挥对细胞凋亡的调控作用。更有研究显示[[53](#_bookmark169)]，促凋亡基因在糖尿病患者视网膜组织中的表达显著升高，诱导细胞凋亡率增加。以上研究均证实了凋亡相关基因在糖尿病视网膜神经节细胞损伤及凋亡中发挥重要作用。

4.4糖代谢异常对RGCs的影响

糖代谢异常引起的多元醇途径一直被认为是DM早期出现视网膜神经节损伤的重要机制之一。有研究报道[[54](#_bookmark170)]，ft梨糖醇在DM大鼠视网膜组织中的表达显著增加，且醛糖还原酶主要表达在视网膜RGCs和Muller细胞中。Asnaghi等的研究发现[[55](#_bookmark171)]，在STZ诱导的糖尿病大鼠模型中，视网膜组织中凋亡的RGCs过量表达醛糖还原酶，而醛糖还原酶抑制剂Sorbinil可以有效降低RGCs细胞凋亡率。此外，Zhang等在研究DM大鼠轴突形态和功能时亦表明[[56](#_bookmark172)]，醛糖还原酶抑制剂可以显著改善RGCs细胞的突触的形态和结构，促进细胞生存。

5. DR中RGCs凋亡的保护[[34](#_bookmark154)]

5.1抑制GLU的神经毒性

由于DM早期产生的RGCs凋亡主要是由GLU同NMDA受体结合引

101

起的一系列反应及损伤，因此NMDA受体抑制剂已经被广泛用于治疗

DM早期视网膜病变。Smith等的研究发现[[57](#_bookmark173), [58](#_bookmark174)]，SigmaR1抑制剂通过调控NMDA受体发挥对DM早期视网膜RGCs细胞的保护作用。美金刚作为NMDA受体抑制剂主要被应用于临床老年痴呆的治疗，效果较好。亦有实验证实[[55](#_bookmark171)]，该药物可以抑制DM发病引起的玻璃体内GLU浓度过高，抑制神经毒性，并认为其可以作为DR药物研究的一项选择。但是由于NMDA受体在人体内参与调控多种正常生理过程，因此其拮抗剂的应用会对人体产生诸多副作用，限制了其临床应用。

5.2基因治疗

基因治疗是指利用分子生物学技术将外源基因倒入靶细胞，使其在胞内正常表达并发挥生物学效应，从而达到治疗目的。应用转基因技术抑制促凋亡蛋白的过度表达，从而调控细胞损伤过程，有效抑制细胞凋亡。如以感染力高和安全性强的慢病毒作为媒介，将抗凋亡基因Bcl-2转入活体细胞内可以达到抑制细胞凋亡的目的，但具有表达不持久的缺陷。而Cherizi等的研究同样证实[[59](#_bookmark175)]，向视神经损伤的动物体内转入Bcl-2基因，可以促进视网膜RGCs存活，抑制视神经损伤诱导的细胞凋亡，对RGCs具有明显保护作用。

5.3抑制氧化反应

业已证实[[60-62](#_bookmark176)]，在DR早期视网膜组织中生成大量氧自由基，显著降低视网膜抗氧化功能，进而诱导视网膜RGCs损伤甚至发生凋亡。采用自由基拮抗剂如超氧化物歧化酶（SOD）或醛糖还原酶抑制剂可以抑制自由基堆积诱导的氧化应激状态，进而解除视网膜的抗氧化障碍，从而达到减轻神经节细胞损伤，抑制细胞凋亡和保护视神经的目的[[63](#_bookmark177), [64](#_bookmark178)]。此外，在Ⅱ型糖尿病小鼠模型中，虾青素（Astaxanthin）通过降低氧自由基、丙二醛

（MDA）、8-羟基脱氧鸟苷（8-OHdG等的表达）减轻视网膜氧化应激反应，进而抑制RGCs凋亡，恢复小鼠视力[[65](#_bookmark179)]。

102

5.4外源性给予神经营养因子

在DR等慢性病发病过程中，视网膜局部神经营养因子相对缺乏难以维持RGC生存，是导致DR患者视力下降的重要原因[[66](#_bookmark180)]。玻璃体内局部注射脑源性或睫状神经营养因子、神经营养蛋白或生长因子等对视神经细胞都具有保护作用，可以有效抑制细胞凋亡[[67](#_bookmark181), [68](#_bookmark182)]。如在睫状神经营养因子CNTF缺陷小鼠中，神经元轴突生长被显著抑制，而给予外源性神经营养因子可以明显刺激轴突再生，促进RGCs轴突生长[[69](#_bookmark183)]。亦有研究证实

[[70](#_bookmark184)], CNTF对外伤性视神经损伤中的RGC具有明显保护作用。此外，CNTF能够有效促进RGC轴突再生，明显保护遗传性糖尿病小鼠及Ⅰ型糖尿病大鼠的视力[[71](#_bookmark185), [72](#_bookmark186)]。

6. CNTF在RGCs中的作用

CNTF是酸性蛋白质，分子量约为22 kD，分子内无分泌信号，也无二硫键，可以耐受强烈的化学处理，属于IL-6家族。具有大量α-螺旋结构，包括A、B、C、D四个类型，其中B和C两种螺旋结构可以形成蛋白的

疏水区域[[73](#_bookmark187)]。CNTF基因定位于人类染色体11q12，编码区长600 bp，包含两个外显子和一个内含子，距离起始密码子上游5 bp处为转录起始位点。广泛表达于中枢神经系统，以小脑中的表达最高，其次为后脑、中脑、丘脑以及纹状体等。周围神经系统的交感以及副交感神经中均表达CNTFR，而CNTF其在眼组织视网膜以及睫状肌中的表达最为丰富。

6.1 CNTF对RGCs的保护

多效神经营养因子CNTF由于可以促进鸡胚睫状神经元存活而广为人知，有支持滋养神经节细胞，促进轴突延伸及减轻体重等多重作用。在眼部的生物活性极高，可以营养并支持RGCs，促进细胞存活，抑制细胞凋亡[[74](#_bookmark188)]。有研究发现[[75](#_bookmark189)]，截断性视神经损伤会诱导视网膜组织内CNTF大量表达，从而应答视网膜神经节细胞轴突损伤，促进细胞存活。中枢神经系统中的髓施旺细胞能够分泌生成CNTF，诱导神经节细胞轴突再生，促进

103

神经元存活[[76](#_bookmark190), [77](#_bookmark191)]。而视网膜病变引起的神经细胞损伤刺激CNTF向细胞外释放，从而保护视网膜细胞，减轻病变损伤[[78](#_bookmark192)]。亦有研究证实[[79](#_bookmark193)]，成熟视网膜受损诱导CNTF转录活性增强，蛋白表达增加，进而短暂发挥对视神经的保护作用。此外，外源性给予CNTF可以减轻缺血诱导的RGCs损伤及凋亡，表明CNTF存在治疗视神经损伤的潜力[[80](#_bookmark194)]。由于视网膜损伤刺激形成的CNTF有限，因此研究者设法将外源性CNTF用于视网膜损伤治疗，并且已经取得理想的实验成果。

6.2 CNTF促进RGCs Th存的机制

CNTF促进RGCs增殖及再生的机制错综复杂，至今尚未完全明确。

Holm等的研究发现[[81](#_bookmark195)]，外源性CNTF通过抑制Ca2+内流保护胎鼠脑皮CPT-cAMP可质神经元，减轻神经元损伤。另有研究证实[[82](#_bookmark196)]，玻璃体内注射CPT-cAMP可诱导PKA依赖的CNTFRα表达显著增加，并认为CNTF介导的轴突再生和RGCs生存涉及众多信号途径。Peterson等的研究表明[[83](#_bookmark197)]，眼内注入Axokine（CNTF相似物）会诱导MAPK及STAT3发生磷酸化，且视网膜内两种蛋白的表达显著增加，p-MAPK及p-STAT3集中表

达在视网膜星形细胞及神经节细胞，机械拉伤或强光照射均会激活STAT3。提示外源性CNTF能够激活ras-MAPK和激Jak-STA信号通路串话，继而影响神经元细胞存活。

6.3 CNTF治疗RGCs的给药方式[[84](#_bookmark198)]

（1）玻璃体内注射

用注射器向玻璃体局部注射一定体积的高纯度CNTF，是眼内给药的一种方式，此种注射方式不仅保证了药物的高度有效性，而且副作用少，安全系数高。

有研究发现[[85](#_bookmark199)]，向大鼠玻璃体内单词注射高浓度CNTF后，其对视杆细胞的保护时间短于3 d。另有研究显示[[86](#_bookmark200)]，青光眼大鼠玻璃体内注射2μg CNTF后，其对视神经的保护时间长达4 w。此外，玻璃体内注射方式

104

常用于视网膜损伤动物模型[[87](#_bookmark201)]。基于CNTF半衰期短，因此只有通过多次注射才能在长时间内保持其有效浓度，临床应用存在一定风险。

（2）全身给药

早期研究中采用皮下或静脉注射CNTF，从而将CNTF带入人体血液循环发挥药物疗效。但是有研究发现[[88](#_bookmark202)]，大鼠尾静脉注射CNTF10 min后，

75 %的CNTF已经从血液循环中消失。另有研究证实[[89](#_bookmark203)]，CNTF用于皮下注射治疗肌萎缩侧索硬化症期间，临床患者不仅体温升高，而且出现急性期反应。此外，CNTF作为一种多效神经营养因子，对中枢神经系统的多种细胞均产生影响，因此全身给药的副作用还包括体重减轻、咳嗽及厌食等[[78](#_bookmark192)]。综上表明，CNTF全身给药不适合用于治疗视网膜病变。

（3）转基因

即将外源致病或治病基因以载体为媒介转入细胞内，对靶基因进行有效表达或沉默，最终达到减轻或治疗疾病的目的。为了降低药物玻璃体内的注射次数以及延长其药效时间，病毒载体被用于靶基因以及蛋白的眼内表达，其可以整合在宿主DNA上，持续翻译表达CNTF[[90](#_bookmark204)]。

Cayouett等的研究表明[[91](#_bookmark205)]，向视网膜病变小鼠玻璃体内注射重组CNTF腺病毒载体，其对视杆细胞的保护作用持续至52 d。亦有研究证明[[92](#_bookmark206)]，用重组CNTF慢病毒载体对大鼠视神经损伤的治疗效果较外源性给予CNTF显著增强。此外，腺相关病毒载体介导的CNTF也已经被应用于RGCs损伤保护[[93](#_bookmark207), [94](#_bookmark208)]。

7. NgR-RhoA-Rock1通路与DR[[95](#_bookmark209)]

在DR的发生以及进展过程中一直伴随视网膜神经节以及微血管病变，众所周知，所有致病因素都需要从细胞外强行进入细胞内，这一过程受重要分子调控开关“NgR”调控。NgR是由473个氨基酸组成，且富含亮氨酸的糖蛋白，可以凭借C端的GPI结构攀附在神经元细胞表面，其属于糖基醇磷脂结合蛋白，需要同相应配体结合才能得到激活[[96](#_bookmark210), [97](#_bookmark211)]。广泛分布于中

105

枢神经系统海马神经元、大脑皮质神经元、脑桥神经元及小脑蒲肯野细胞的神经元内[[98](#_bookmark212), [99](#_bookmark213)]。同配体蛋白Nogo、MAG、OMgp形成复合体后向细胞内传递抑制信号，进而激活下游RhoA及Rock等信号蛋白，介导信号转导[[100](#_bookmark214), [101](#_bookmark215)]。有研究发现[[102](#_bookmark216)]，NgR大量表达于幼年或成年小鼠的视网膜神经节细胞层，而将其抑制后能够有效恢复RGCs活力。另有研究证实[[102](#_bookmark216)]，干

扰NgR受体能够有效抑制RGCs凋亡，促进细胞增殖，改善细胞支架紊乱。此外，本课题组前期工作中证实，NgR及其下游蛋白Rhok1在DR病变视网膜中的表达显著增多，提示NgR及其下游效应分子很可能参与调控DR

发病及进展过程。

7.1 RhoA-Rock通路

该信号通路由RhoA、Rock以及肌球蛋白磷酸酶（MP）三个重要成分共同组成[[103](#_bookmark217)]。Rho家族共包含RhoA、RhoB和RhoC三个家族成员，其中RhoA广泛表达在动物及人体内，参与胞内运输、骨架重构及及转录调控等多种重要生理活动。Rock是目前国内外研究比较透彻的RhoA下游关键效应分子，其被激活后可诱导神经轴突细胞收缩，抑制轴突再生，促进神经元凋亡[[104-106](#_bookmark218)]。另有研究证实[[107](#_bookmark219)]，RhoA-Rock信号通路激活后参与调控血管平滑肌细胞增生及黏附等生物学行为，继而调控血管功能，促进DR患者发生血管病变。此外，该信号通路激活还可以抑制细胞骨架蛋白

（F-actin）在轴突末端生长锥的合成聚集，抑制轴突末端生长锥的延长，从而抑制神经再生，甚至诱发凋亡[[108](#_bookmark220)]。

7.2 RhoA-Rock通路抑制对DR病变的影响

正常生理状态下，体内富含的CNTF对神经节细胞具有滋养、促生存及抗凋亡等作用。而且可以在特殊受体介导下有效抑制NgR同各种配体相结合，从而促进突触再生修复，抑制神经细胞凋亡[[109](#_bookmark221)]。有研究证实[[110](#_bookmark222)]，糖尿病大鼠模型中，抑制NgR能够有效抑制视网膜神经节细胞凋亡，促进细胞生存。Bertrand等的研究发现[[111](#_bookmark223)]，于视神经损伤大鼠玻璃体内局部注

106

射Rhoa抑制剂C，RhoA-Rock信号通路活性得到有效抑制，同时观察到视网膜神经轴突被诱导延长，神经节细胞凋亡率显著下降。此外，将 RhoA抑制后可以有效解除其对CNTF促神经元分化及增殖的抑制作用[[112](#_bookmark224)]。

7.3 NgR-RhoA-Rock通路研究前景[[95](#_bookmark209)]

早在上世纪70年代已经有研究证实，视网膜神经节细胞损伤发生在糖尿病微血管病变之前[[113](#_bookmark225)]。后续亦有研究陆续发现[[102](#_bookmark216)]，DM发病早期视

网膜微血管未发生病变之前已经形成视功能损伤，如视网膜节细胞层变薄、RGCs细胞数量减少等，并认为RGCs凋亡在视网膜病变过程中发挥重要作用。由于在完全控制血糖的情况下也不能避免DR的发生，且RGCs凋亡已经被证实参与调控发病过程，因此研究者认为改变细胞生长微环境很可能是有效控制病情的重要方法之一。

目前国内外关于NgR-Rhoa-Rock信号通路的研究仅是以指定单一蛋白作为切入点，并没有将造成神经节细胞损伤或促进其生存的其它因素同时进行研究。如该信号通路激活过程中涉及的Nogo、p75等结合方式、结合位点等是否受其它分子调控？以及是否伴有其它通路串话参与信号传递过程？其次，当NgR向细胞传入致病信号后，在细胞内到底通过了哪些信号通道？RhoA-Rock信号通路到底发挥了多少效能？而且，能否通过调控细胞内外离子平衡来影响分子开关的开启或关闭，最终达到有效抑制信号传递的目的呢？此外，难道负责传递NgR信号的只有RhoA蛋白吗？是否存在其它蛋白酶或基因可以调节病理进展中的RhoA表达？既然睫状神经营养因子CNTF是RGCs细胞生长所必须的，那么外源性的CNTF能够通过调控NgR-RhoA-Rock信号通路影响RGCs的损伤及凋亡过程？如果CNTF对该信号通路存在调节作用，那么CNTF及siNgR在参与调控DR病变中是否存在协同作用呢？

8. 小结与展望

综上，本研究以NgR和CNTF为切入点，通过体内外实验研究了两

107

者对RGCs细胞损伤、凋亡及再生的影响，并探讨了NgR及CNTF是否存在协同作用和对应的分子调控机制。得出以下结论：

（1）NgR干扰或外源性给予CNTF可以协同保护高糖诱导的大鼠RGC-5，促进受损细胞存活，抑制细胞凋亡；

（2）玻璃体内注射siNgR和CNTF可以协同促进糖尿病大鼠RGCs细胞存活，诱导轴突再生，促进细胞增殖，抑制细胞凋亡；

（3）siNgR及CNTF对RGCs的影响同NgR-RhoA-Rock1信号通路密切相关。

以上研究结果只是初步探讨了CNTF及NgR-RhoA-Rock1信号通路对视网膜神经节细胞损伤、凋亡及恢复的影响，进一步阐明了DR发生及发展的具体分子机制，并为DR的临床治疗提供了一定的实验基础。但是DR发病的详细分子机制及有效治疗手段仍需深入探索和研究。因此我们后续会以本次研究结果作为前期基础，从细胞、动物及分子三等多个层次深入分析CNTF及NgR对糖尿病RGCs损伤及再生修复的影响，并选择当今研究比较火热的miRNA、自噬或线粒体功能障碍等作为切入点，探讨

CNTF及NgR参与调控糖尿病视网膜病变的具体分子机制。期望能为DR

的临床治疗提供新型分子靶点，并为DR新药的研发提供充分的实验依据。

108

参考文献

[1] Hussain MA, Al Mamun A, Peters SA, Woodward M, Huxley RR. The Burden of Cardiovascular Disease Attributable to Major Modifiable Risk Factors in Indonesia [J]. J Epidemiol. 2016.

[2] Perez-Losada FL, Jane-Salas E, Sabater-Recolons MM, Estrugo-Devesa A, Segura-Egea JJ, Lopez-Lopez J. Correlation between periodontal disease management and metabolic control of type 2 diabetes mellitus. A systematic literature review [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2016: 0.

[3] Spichler A, Hurwitz BL, Armstrong DG, Lipsky BA. Microbiology of diabetic foot infections: from Louis Pasteur to 'crime scene investigation' [J]. BMC Med. 2015, 13: 2.

[4] Mata AR, Alvares J, Diniz LM, Ruberson Ribeiro da Silva M, Alvernaz Dos Santos BR, Guerra Junior AA, et al. Quality of life of patients with Diabetes Mellitus Types 1 and 2 from a referal health centre in Minas Gerais, Brazil [J]. Expert Rev Clin Pharmacol. 2016, 9(5): 739-46.

[5] Morley JE. Diabetes and aging: epidemiologic overview [J]. Clin Geriatr Med. 2008, 24(3): 395-405, v.

[6] 曲巍. NgR/NR2B信号通路对糖尿病视网膜RGC的影响: 广西医科大学; 2015.

[7] Boudry C, Denion E, Mortemousque B, Mouriaux F. Trends and topics in eye disease research in PubMed from 2010 to 2014 [J]. PeerJ. 2016, 4: e1557.

[8] Onakpoya OH, Kolawole BA, Adeoye AO, Adegbehingbe BO, Laoye O. Visual impairment and blindness in type 2 diabetics: Ife-Ijesa diabetic retinopathy study [J]. Int Ophthalmol. 2015.

[9] Stem MS, Dunbar GE, Jackson GR, Farsiu S, Pop-Busui R, Gardner TW.

109

Glucose variability and inner retinal sensory neuropathy in persons with type 1 diabetes mellitus [J]. Eye (Lond). 2016.

[10] Mohamed QA, Fletcher EC, Buckle M. Diabetic retinopathy: intravitreal vascular endothelial growth factor inhibitors for diabetic macular oedema [J]. BMJ Clin Evid. 2016, 2016.

[11] Lin S, Ramulu P, Lamoureux EL, Sabanayagam C. Addressing risk factors, screening, and preventative treatment for diabetic retinopathy in developing countries: a review [J]. Clin Experiment Ophthalmol. 2016.

[12] Nabavi SF, Barber AJ, Spagnuolo C, Russo GL, Daglia M, Nabavi SM, et al. Nrf2 as molecular target for polyphenols: A novel therapeutic strategy in diabetic retinopathy [J]. Crit Rev Clin Lab Sci. 2016: 1-20.

[13] Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Diabetic retinopathy [J]. Diabetes Care. 2003, 26(1): 226-9.

[14] Jo DH, Bae J, Chae S, Kim JH, Han JH, Hwang D, et al. Quantitative proteomics reveals beta2 integrin-mediated cytoskeletal rearrangement in VEGF-induced retinal vascular hyperpermeability [J]. Mol Cell Proteomics. 2016.

[15] Crabbe MJ, Goode D. Aldose reductase: a window to the treatment of diabetic complications[J]. ProgRetinEyeRes. 1998, 17(3): 313-83.

[16] Sanchez-Chavez G, Hernandez-Ramirez E, Osorio-Paz I, Hernandez- Espinosa C, Salceda R. Potential Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Pathogenesis of Diabetic Retinopathy [J]. Neurochem Res. 2015.

[17] Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy [J]. Curr Diab Rep. 2011, 11(4): 244-52.

[18] Anwar MM, Meki AR. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr

110

Physiol. 2003,135(4):539-47.

[19] Cooke DW, Plotnick L. Type 1 diabetes mellitus in pediatrics [J]. Pediatr Rev. 2008, 29(11): 374-84; quiz 85.

[20] Yu XH, Zhang H, Wang YH, Liu LJ, Teng Y, Liu P. Time-dependent reduction of glutamine synthetase in retina of diabetic rats [J]. Exp Eye Res. 2009, 89(6): 967-71.

[21] Villarroel M, Ciudin A, Hernandez C, Simo R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy [J]. World J Diabetes. 2010, 1(2): 57-64.

[22] Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema [J]. Ophthalmology. 1995, 102(1): 7-16.

[23] Ola MS, Berkich DA, Xu Y, King MT, Gardner TW, Simpson I, et al. Analysis of glucose metabolism in diabetic rat retinas [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006, 290(6): E1057-67.

[24] Grauslund J, Green A, Kawasaki R, Hodgson L, Sjolie AK, Wong TY. Retinal vascular fractals and microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes [J]. Ophthalmology. 2010, 117(7): 1400-5.

[25] Wang H, Zheng Z, Gong Y, Zhu B, Xu X. U83836E inhibits retinal neurodegeneration in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Ophthalmic Res. 2011, 46(1): 19-24.

[26] Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004, 45(9): 3330-6.

[27] Li P, Xu X, Zheng Z, Zhu B, Shi Y, Liu K. Protective effects of rosiglitazone on retinal neuronal damage in diabetic rats [J]. Curr Eye Res. 2011, 36(7): 673-9.111

[28] Hammes HP, Federoff HJ, Brownlee M. Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes [J]. Mol Med. 1995, 1(5): 527-34.

[29] Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME. TUNEL- positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma [J]. Arch Ophthalmol. 1997, 115(8): 1031-5.

[30] Oshitari T, Yamamoto S, Hata N, Roy S. Mitochondria- and caspase- dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy [J]. Br J Ophthalmol. 2008, 92(4): 552-6.

[31] Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin [J]. J Clin Invest. 1998, 102(4): 783-91.

[32] Marquardt T, Gruss P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all [J]. Trends Neurosci. 2002, 25(1): 32-8.

[33] Kowluru RA, Koppolu P. Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy [J]. Free Radic Res. 2002, 36(9): 993-9.

[34] 谷瑞东. 洛美利嗪对糖尿病大鼠早期视网膜神经节细胞的保护作用: 中国医科大学; 2013.

[35] Mariga A, Mitre M, Chao MV. Consequences of brain-derived neurotrophic factor withdrawal in CNS neurons and implications in disease [J]. Neurobiol Dis. 2016.

[36] Cobianchi S, Arbat-Plana A, Lopez-Alvarez VM, Navarro X. Neuroprotective effects of exercise treatments after injury: the dual role of neurotrophic factors [J]. Curr Neuropharmacol. 2016.

[37] Morgan-Warren PJ, O'Neill J, de Cogan F, Spivak I, Ashush H, Kalinski H, et al. siRNA-Mediated Knockdown of the mTOR Inhibitor RTP801 Promotes

112

Retinal Ganglion Cell Survival and Axon Elongation by Direct and Indirect Mechanisms [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016,57(2):429-43.

[38] Kador KE, Grogan SP, Dorthe EW, Venugopalan P, Malek MF, Goldberg JL, et al. Control of Retinal Ganglion Cell Positioning and Neurite Growth: Combining 3D Printing with Radial Electrospun Scaffolds [J]. Tissue Eng Part A. 2016, 22(3-4): 286-94.

[39] Vigneswara V, Esmaeili M, Deer L, Berry M, Logan A, Ahmed Z. Eye drop delivery of pigment epithelium-derived factor-34 promotes retinal ganglion cell neuroprotection and axon regeneration [J]. Mol Cell Neurosci. 2015, 68: 212- 21.

[40] Mohamed R, El-Remessy AB. Imbalance of the Nerve Growth Factor and Its Precursor: Implication in Diabetic Retinopathy [J]. J Clin Exp Ophthalmol. 2015, 6(5).

[41] Dorfman D, Aranda ML, Rosenstein RE. Enriched Environment Protects the Optic Nerve from Early Diabetes-Induced Damage in Adult Rats [J]. PLoS One. 2015, 10(8): e0136637.

[42] Seki M, Soussou W, Manabe S, Lipton SA. Protection of retinal ganglion cells by caspase substrate-binding peptide IQACRG from N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010, 51(2): 1198-207.

[43] Ohara N, Kaneko M, Furukawa T, Koike T, Sone H, Tanaka S, et al. Rapid Normalization of High Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody Titers and Preserved Endogenous Insulin Secretion in a Patient with Diabetes Mellitus: A Case Report and Literature Review [J]. Intern Med. 2016, 55(5): 485-9.

[44] Gu L, Xu H, Wang F, Xu G, Sinha D, Wang J, et al. Erythropoietin exerts a neuroprotective function against glutamate neurotoxicity in experimental

113

Diabetic retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014,55(12):8208-22.

[45] Zeng K, Xu H, Chen K, Zhu J, Zhou Y, Zhang Q, et al. Effects of taurine on glutamate uptake and degradation in Muller cells under diabetic conditions via antioxidant mechanism [J]. Mol Cell Neurosci. 2010, 45(2): 192-9.

[46] Cao Y, Li X, Shi P, Wang LX, Sui ZG. Effects of L-carnitine on high glucose-induced oxidative stress in retinal ganglion cells [J]. Pharmacology. 2014, 94(3-4): 123-30.

[47] Fan J, Xu G, Jiang T, Qin Y. Pharmacologic induction of heme oxygenase- 1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012, 53(10): 6541-56.

[48] Lahouaoui H, Coutanson C, Cooper HM, Bennis M, Dkhissi-Benyahya O. Clock genes and behavioral responses to light are altered in a mouse model of diabetic retinopathy [J]. PLoS One. 2014, 9(7): e101584.

[49] Wee KB, Aguda BD. Akt versus p53 in a network of oncogenes and tumor suppressor genes regulating cell survival and death [J]. Biophys J. 2006, 91(3): 857-65.

[50] 李煜德. CNTF对视神经损伤后视网膜神经节细胞凋亡的影响: 内蒙古医学院; 2009.

[51] Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RK, Drexler HC, Rotello RJ, Fishman MC, et al. Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene [J]. Science. 1994, 263(5148): 826-8.

[52] Ono M, Sawa Y, Ryugo M, Alechine AN, Shimizu S, Sugioka R, et al. BH4 peptide derivative from Bcl-xL attenuates ischemia/reperfusion injury thorough anti-apoptotic mechanism in rat hearts [J]. Eur J Cardiothorac Surg. 2005, 27(1): 117-21.

[53] Nagai I, Satoh H, Yoshida M, Watanabe K. [Tendencies to mistakes in

114

Hearing and limitation among cleft palate patients due to vowel non- distinguishability] [J]. Aichi Gakuin Daigaku Shigakkai Shi. 1975,12(4):430-8.

[54] Grewal AS, Bhardwaj S, Pandita D, Lather V, Sekhon BS. Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases [J]. Mini Rev Med Chem. 2015, 16(2): 120-62.

[55] Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, Adeboje A, Lorenzi M. A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat [J]. Diabetes. 2003, 52(2): 506-11.

[56] Ino-ue M, Yokogawa H, Yamamoto M, Naka H, Kuriyama H. Structural impairments in optic nerve of diabetic rats ameliorated with the aldose reductase inhibitor [J]. Exp Eye Res. 1998, 66(4): 397-401.

[57] Ola MS, Moore P, El-Sherbeny A, Roon P, Agarwal N, Sarthy VP, et al. Expression pattern of sigma receptor 1 mRNA and protein in mammalian retina [J]. Brain Res Mol Brain Res. 2001, 95(1-2): 86-95.

[58] Ola MS, Moore P, Maddox D, El-Sherbeny A, Huang W, Roon P, et al. Analysis of sigma receptor (sigmaR1) expression in retinal ganglion cells cultured under hyperglycemic conditions and in diabetic mice [J]. Brain Res Mol Brain Res. 2002, 107(2): 97-107.

[59] Leaver SG, Cui Q, Bernard O, Harvey AR. Cooperative effects of bcl-2 and AAV-mediated expression of CNTF on retinal ganglion cell survival and axonal regeneration in adult transgenic mice [J]. Eur J Neurosci. 2006, 24(12): 3323-32.

[60] Yuan D, Xu Y, Hang H, Liu X, Chen X, Xie P, et al. Edaravone protect against retinal damage in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. PLoS One. 2014, 9(6): e99219.

[61] Kowluru RA, Kowluru A, Mishra M, Kumar B. Oxidative stress and epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. Prog

115

Retin Eye Res. 2015,48:40-61.

[62] Naruse R, Suetsugu M, Terasawa T, Ito K, Hara K, Takebayashi K, et al. Oxidative stress and antioxidative potency are closely associated with diabetic retinopathy and nephropathy in patients with type 2 diabetes [J]. Saudi Med J. 2013, 34(2): 135-41.

[63] Obrosova IG, Kador PF. Aldose reductase / polyol inhibitors for diabetic retinopathy [J]. Curr Pharm Biotechnol. 2011, 12(3): 373-85.

[64] Mohamed Q, Wong TY. Emerging drugs for diabetic retinopathy [J]. Expert Opin Emerg Drugs. 2008, 13(4): 675-94.

[65] Dong LY, Jin J, Lu G, Kang XL. Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress [J]. Mar Drugs. 2013, 11(3): 960-74.

[66] Afarid M, Torabi-Nami M, Zare B. Neuroprotective and restorative effects of the brain-derived neurotrophic factor in retinal diseases [J]. J Neurol Sci. 2016, 363: 43-50.

[67] Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S. Neurotrophic factors for retinal ganglion cell neuropathy - with a special reference to diabetic neuropathy in the retina [J]. Curr Diabetes Rev. 2014, 10(3): 166-76.

[68] Abu El-Asrar AM, Nawaz MI, Siddiquei MM, Al-Kharashi AS, Kangave D, Mohammad G. High-mobility group box-1 induces decreased brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in the diabetic retina [J]. Mediators Inflamm. 2013, 2013: 863036.

[69] Leibinger M, Muller A, Andreadaki A, Hauk TG, Kirsch M, Fischer D. Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor [J]. J Neurosci.

116

2009,29(45):14334-41.

[70] Mathews MK, Guo Y, Langenberg P, Bernstein SL. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) -mediated ganglion cell survival in a rodent model of non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy (NAION) [J]. Br J Ophthalmol. 2015, 99(1): 133-7.

[71] Cui Q, Lu Q, So KF, Yip HK. CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999, 40(3): 760-6.

[72] Aizu Y, Katayama H, Takahama S, Hu J, Nakagawa H, Oyanagi K. Topical instillation of ciliary neurotrophic factor inhibits retinal degeneration in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Neuroreport. 2003, 14(16): 2067-71.

[73] Oppenheim RW, Wiese S, Prevette D, Armanini M, Wang S, Houenou LJ, et al. Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons [J]. J Neurosci. 2001, 21(4): 1283-91.

[74] Mizisin AP, Vu Y, Shuff M, Calcutt NA. Ciliary neurotrophic factor improves nerve conduction and ameliorates regeneration deficits in diabetic rats [J]. Diabetes. 2004, 53(7): 1807-12.

[75] Hellstrom M, Harvey AR. Cyclic AMP and the regeneration of retinal ganglion cell axons [J]. Int J Biochem Cell Biol. 2014, 56: 66-73.

[76] Peruga I, Hartwig S, Merkler D, Thone J, Hovemann B, Juckel G, et al. Endogenous ciliary neurotrophic factor modulates anxiety and depressive-like behavior [J]. Behav Brain Res. 2012, 229(2): 325-32.

[77] Xue W, Cojocaru RI, Dudley VJ, Brooks M, Swaroop A, Sarthy VP. Ciliary neurotrophic factor induces genes associated with inflammation and gliosis in the retina: a gene profiling study of flow-sorted, Muller cells [J]. PLoS One. 2011, 6(5): e20326.117

[78] Wen R, Tao W, Li Y, Sieving PA. CNTF and retina [J]. Prog Retin Eye Res. 2012, 31(2): 136-51.

[79] Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, et al. Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAS in the rat retina [J]. J Neurosci. 1995, 15(11): 7377-85.

[80] Harvey AR, Hellstrom M, Rodger J. Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway [J]. Prog Brain Res. 2009, 175: 151-61.

[81] Holm NR, Christophersen P, Hounsgaard J, Gammeltoft S, Olesen SP. CNTF inhibits high voltage activated Ca2+ currents in fetal mouse cortical neurones [J]. J Neurochem. 2002, 82(3): 495-503.

[82] Park K, Luo JM, Hisheh S, Harvey AR, Cui Q. Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells [J]. J Neurosci. 2004, 24(48): 10806-15.

[83] Peterson WM, Wang Q, Tzekova R, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia [J]. J Neurosci. 2000, 20(11): 4081-90.

[84] 武晶晶. CNTF基因修饰的骨髓间充质干细胞对视神经钳夹伤大鼠RGCs的保护作用: 天津医科大学; 2014.

[85] Wen R, Song Y, Kjellstrom S, Tanikawa A, Liu Y, Li Y, et al. Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor [J]. J Neurosci. 2006, 26(52): 13523-30.

[86] Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, Lee VW, Yick LW, Hugon J, et al. CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway [J]. Eur J Neurosci. 2004, 19(2): 265-72.118

[87] Lu Q, Cui Q, Yip HK, So KF. c-Jun expression in surviving and regenerating retinal ganglion cells: effects of intravitreal neurotrophic supply [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003, 44(12): 5342-8.

[88] Dittrich F, Thoenen H, Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat [J]. Ann Neurol. 1994, 35(2): 151-63.

[89] The pharmacokinetics of subcutaneously administered recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to parameters of the acute-phase response. The ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I-II Study Group [J]. Clin Neuropharmacol. 1995, 18(6): 500-14.

[90] Balaggan KS, Ali RR. Ocular gene delivery using lentiviral vectors [J]. Gene Ther. 2012, 19(2): 145-53.

[91] Cayouette M, Behn D, Sendtner M, Lachapelle P, Gravel C. Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse [J]. J Neurosci. 1998, 18(22): 9282-93.

[92] van Adel BA, Kostic C, Deglon N, Ball AK, Arsenijevic Y. Delivery of ciliary neurotrophic factor via lentiviral-mediated transfer protects axotomized retinal ganglion cells for an extended period of time [J]. Hum Gene Ther. 2003, 14(2): 103-15.

[93] Hellstrom M, Pollett MA, Harvey AR. Post-injury delivery of rAAV2- CNTF combined with short-term pharmacotherapy is neuroprotective and promotes extensive axonal regeneration after optic nerve trauma [J]. J Neurotrauma. 2011, 28(12): 2475-83.

[94] MacLaren RE, Buch PK, Smith AJ, Balaggan KS, MacNeil A, Taylor JS, et

119

Al. CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae undergoing focal injury and branch vessel occlusion [J]. Exp Eye Res. 2006,83(5):1118-27.

[95] 付云杰. 抑制NgR-Rhoa-Rock信号通路对糖尿病大鼠视网膜RGC 的保护作用: 辽宁医学院; 2014.

[96] Wang T, Xiong JQ, Ren XB, Sun W. The role of Nogo-A in neuroregeneration: a review [J]. Brain Res Bull. 2012, 87(6): 499-503.

[97] Yan J, Zhou X, Guo JJ, Mao L, Wang YJ, Sun J, et al. Nogo-66 inhibits adhesion and migration of microglia via GTPase Rho pathway in vitro [J]. J Neurochem. 2012, 120(5): 721-31.

[98] Peng X, Kim J, Zhou Z, Fink DJ, Mata M. Neuronal Nogo-A regulates glutamate receptor subunit expression in hippocampal neurons [J]. J Neurochem. 2011, 119(6): 1183-93.

[99] Hasegawa T, Ohno K, Sano M, Omura T, Omura K, Nagano A, et al. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo-A and Nogo-receptor in the rat central nervous system [J]. Brain Res Mol Brain Res. 2005, 133(1): 119-30.

[100] Li C, Wen H, Wang Q, Zhang C, Jiang L, Dou Z, et al. Exercise Training Inhibits the Nogo-A/NgR1/Rho-A Signals in the Cortical Peri-infarct Area in Hypertensive Stroke Rats [J]. Am J Phys Med Rehabil. 2015, 94(12): 1083-94.

[101] Deng Q, Cai W, Li S, Zhang Y, Su B. Small Nogo-66-binding peptide promotes neurite outgrowth through RhoA inhibition after spinal cord injury [J]. Brain Res Bull. 2013, 99: 140-4.

[102] Fischer D, He Z, Benowitz LI. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state [J]. J Neurosci. 2004, 24(7): 1646-51.

[103] Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in

120

Physiology and pathophysiology [J]. J Mol Med (Berl). 2002,80(10):629-38.

[104] Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, et al. p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions [J]. FEBS Lett. 1997, 404(2- 3): 118-24.

[105] Koch JC, Tonges L, Barski E, Michel U, Bahr M, Lingor P. ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS [J]. Cell Death Dis. 2014, 5: e1225.

[106] Tan H, Zhong Y, Shen X, Cheng Y, Jiao Q, Deng L. Erythropoietin promotes axonal regeneration after optic nerve crush in vivo by inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway [J]. Neuropharmacology. 2012, 63(6): 1182-90.

[107] Yao L, Chandra S, Toque HA, Bhatta A, Rojas M, Caldwell RB, et al. Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout [J]. Cardiovasc Res. 2013, 97(3): 509-19.

[108] Kopp MA, Liebscher T, Niedeggen A, Laufer S, Brommer B, Jungehulsing GJ, et al. Small-molecule-induced Rho-inhibition: NSAIDs after spinal cord injury [J]. Cell Tissue Res. 2012, 349(1): 119-32.

[109] Kirsch M, Lee MY, Meyer V, Wiese A, Hofmann HD. Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells [J]. J Neurochem. 1997, 68(3): 979-90.

[110] 刘万鹏, 刘学政, 左中夫. 抑制NGR对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 江苏医药. 2013, 39(7): 751-3.

[111] Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell- permeable C3-like Rho antagonists [J]. Neurobiol Dis. 2007, 25(1): 65-72.121

[112] Kjoller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases [J]. Exp Cell Res. 1999, 253(1): 166-79.

[113] 修阳晖, 林发森, 朱益华. 视神经损伤后影响轴突再生的因素[J]. Fujian Medical Journal. 2006, 28(3): 113-5.

122

致 谢

回顾博士研究生的学习工作，三年的时间已近尾声，从入学考试、报到、上课、实验、撰写论文每个阶段的影像依然历历在目；操场上的三角梅、杏湖畔的晨风、宿舍前的大榕树、食堂里的老友粉，还有实验室里同学们忙碌的身影仿佛就在身边。值此论文完成之际，感叹时间飞逝；感谢师长、同学们给我的指导、帮助；感恩伴我学习、工作的桂医大老师、同学及校园内的花花草草。谢谢你们！

首先，要感谢我的导师：刘学政教授。恩师对学术执着的追求精神、对人生积极乐观的态度、对学生悉心的教诲与指导、对工作严谨求实的作风，给了我奋斗的目标与无限的前进动力。在我科研设计、实验、论文撰写过程中，您不倦的教诲与关怀让我在科研工作上晋升一个平台，得到了很大的提高，令我受益匪浅。在此，谨向我的导师致以最崇高的敬意和诚挚的谢意！

其次，感谢罗国容教授、谢小薰教授、黄绍明教授在学术上的指导，感谢学长在实验上的悉心指导和无私帮助；感谢桂医大人体解剖学教研室以及锦医大解剖学教研室的全体老师在我实验过程中给予的帮助和支持；感谢我的同学、师兄、师弟们对我实验的支持和帮助。

最后，祝愿所有关心、帮助过我的老师、同学、朋友们平安幸福！

123

# 攻读博士期间发表的学术论文

124