

### 【基础研究】

通信作者:牛雪红(1965-),女,辽宁丹东人,学士,主任医师,研究方向:糖尿病视网膜膜病变;E-mail:13904153056@163.com

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)可引起 Müller 细胞损伤,表现为胶质增殖甚至瘢痕形成<sup>[1-2]</sup>。在 DR 进程中,损伤的 Müller 细胞可分泌众多细胞因子造成神经元功能障碍<sup>[3]</sup>,从而抑制神经元再生,最终引起视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)数量的减少<sup>[4-5]</sup>。因此,抑制 Müller 细胞增殖可有效减轻 DR 对视网膜的损伤。Cdh1 是细胞周期末期促进复合物(anaphase promoting complex, APC)的调节亚基,可调控细胞周期<sup>[6]</sup>,近年来发现其与胶质细胞增殖关系密切<sup>[7]</sup>。因此,本研究拟观察 DR 状态下 Cdh1 在视网膜内的表达情况,进一步探讨 Müller 细胞胶质增殖与 Cdh1 蛋白表达的关系,为研究 DR 的治疗方案拓展思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雄性 Sprague Dawley 大鼠 40 只,体质量 220~240 g,购自锦州医科大学。

**1.2 主要试剂与仪器** 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国 Sigma 公司,过表达 Cdh1 蛋白的慢病毒载体购自上海吉玛制药技术有限公司;兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、兔抗大鼠  $\beta$ -actin 一抗购自英国 Abcam 公司,兔抗大鼠 Cdh1 一抗购自北京奥维亚生物技术有限公司,二抗购自北京碧云天生物技术公司;荧光倒置显微镜购自日本 Olympus 公司,冰冻切片机构自德国 SLEE 公司,水平电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

**1.3 动物分组及模型制备** 采用随机数字表法将 40 只大鼠随机分为对照组、糖尿病(diabetes mellitus, DM)组、过表达 Cdh1 组和阴性病毒组,每组 10 只。DM 组、过表达 Cdh1 组及阴性病毒组大鼠单次腹腔注射 STZ 55 mg · kg<sup>-1</sup>, 72 h 后采集尾静脉血,检测血糖水平,血糖 > 16.7 mmol · L<sup>-1</sup> 即为 DM 模型构建成功。模型诱导成功后,依据药品说明书,过表达 Cdh1 组大鼠双侧玻璃体腔注射 6  $\mu$ L 过表达 Cdh1 蛋白的慢病毒载体,阴性病毒组大鼠给予 6  $\mu$ L 慢病毒载体稀释液,对照组和 DM 组大鼠不任何处理。玻璃体腔注射时采用质量分数 10% 水合氯醛麻醉,实验期间大鼠正常喂养,未出现动物死亡。实验遵循国家《实验动物管理条例》。

**1.4 样本制备** 干预 12 周后,每组取 5 只大鼠,麻醉后以 40 g · L 多聚甲醛固定,然后使用手术剪取眼球,质量分数 10%、20%、30% 梯度蔗糖溶液脱水,最佳切削温度化合物(optimal cutting temperature compound, OCT)包埋切片,厚度为 15  $\mu$ m,湿盒内 4  $^{\circ}$ C 保存,用于免疫荧光、免疫组织化学染色及苏木

精-伊红染色(hematoxylin eosin, HE)染色。其余大鼠麻醉处死分离视网膜,裂解,冰上剪碎,12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 30 min 后取上清液, - 20  $^{\circ}$ C 保存用于后续实验。

**1.5 免疫组织化学检测大鼠视网膜组织中 Cdh1 表达** 取“1.4 项”制备的切片,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)洗涤 3 次,每次 5 min;体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温浸泡 10 min, PBS 洗涤 3 次;体积分数 3% 山羊血清室温孵育 30 min;滴加兔抗大鼠 Cdh1 (1 : 500), 4  $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗涤 3 次;滴加二抗,室温孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次;滴加链霉-亲和素-生物素-酶复合物试剂,室温孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次;3,3'-二氨基苯联胺显色后显微镜观察,棕黄色为阳性表达。应用 Image J 软件分析 Cdh1 阳性表达率,阳性表达率 = 阳性区域面积/整个图片面积。

**1.6 免疫荧光检测大鼠视网膜组织中 GFAP 表达**

取“1.4 项”制备的切片, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;体积分数 5% 山羊血清 + 体积分数 0.5% Triton-100 室温孵育 2 h;滴加兔抗大鼠 GFAP (1 : 300), 4  $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗涤 4 次,每次 3 min;滴加山羊抗兔 A488,室温孵育 2 h;PBS 洗涤 4 次,每次 3 min;封片后荧光显微镜观察并拍照,采用显微镜自带软件分析荧光吸光度值,以对照组荧光吸光度为 100%,进而换算出各组荧光密度百分比。

**1.7 Western blot 法检测大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达** 提取视网膜总蛋白,二喹啉甲酸法测蛋白浓度,最终加入 15  $\mu$ L 样品缓冲液。质量分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至聚偏氟乙烯膜,以含体积分数 1% 牛血清白蛋白的 TBST 室温封闭 2 h;加入一抗 4  $^{\circ}$ C 过夜;TBST 洗涤 4 次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 4 次;电化学发光试剂盒显影, Image J 软件分析灰度值,蛋白相对表达量 = 蛋白灰度值/内参灰度值,实验重复 6 次,取均值。

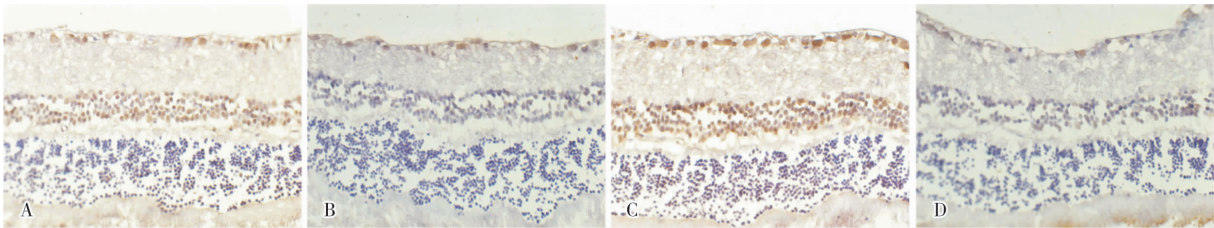
**1.8 HE 染色检测 RGC 数量** 取“1.4 项”制备的切片, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加苏木精反应 2 min;PBS 中浸泡 1 min,自来水冲洗;体积分数 95% 乙醇脱水 1 min;伊红浸染 2 min,自来水冲洗;脱水透明后封片,拍照后应用 Image J 软件计数 RGC 数量。

**1.9 统计学处理** 应用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,符合正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 各组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率比较** 结果见图 1。对照组、DM 组、过表达 Cdh1 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率分别为 $(21.17 \pm 0.15)\%$ 、 $(9.28 \pm 0.12)\%$ 、 $(32.19 \pm 0.13)\%$ 、 $(9.36 \pm 0.18)\%$ 。DM 组及阴性病毒组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率

低于对照组,过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率高于 DM 组和阴性病毒组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );阴性病毒组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率与 DM 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

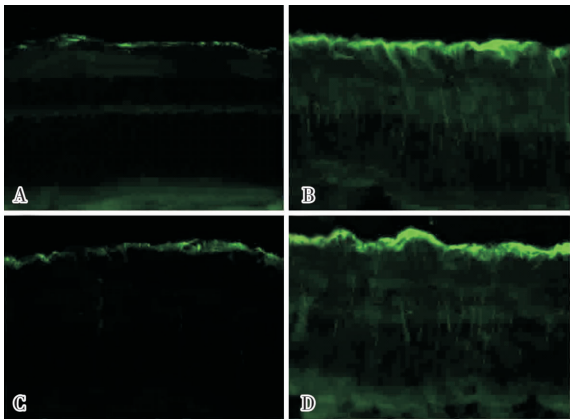


A:对照组;B:DM 组;C:过表达 Cdh1 组;D:阴性病毒组。  
图 1 各组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白表达 (免疫组织化学染色,  $\times 400$ )

Fig.1 Expression of Cdh1 protein in retinal tissues of rats in each group (immunohistochemistry staining,  $\times 400$ )

**2.2 各组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达比较** 结果见图 2。对照组、DM 组、过表达 Cdh1 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达分别为 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(183.72 \pm 1.42)\%$ 、 $(125.80 \pm 1.12)\%$ 、 $(178.26 \pm 1.05)\%$ 。DM 组、过表达 Cdh1 组及阴性病毒组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达低于 DM 组和阴性病毒组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );阴性病毒组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达与 DM 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

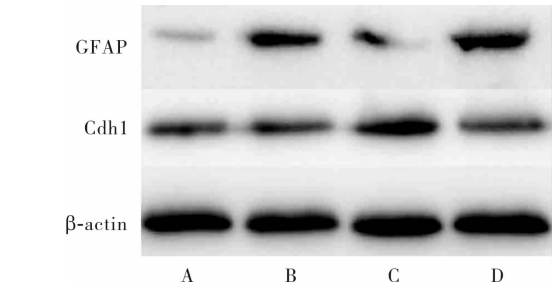
高于对照组,Cdh1 表达低于对照组,差异有统计意义( $P < 0.01$ )。过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达量高于对照组( $P < 0.05$ );过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白相对表达量低于阴性病毒组,Cdh1 蛋白相对表达量高于阴性病毒组;而阴性病毒组与 DM 组 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达量表达量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



A:对照组;B:DM 组;C:过表达 Cdh1 组;D:阴性病毒组。  
图 2 各组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达 (免疫荧光染色,  $\times 400$ )

Fig.2 Expression of GFAP protein in retina tissues of rats in each group (immunofluorescent staining,  $\times 400$ )

**2.3 各组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白、Cdh1 蛋白相对表达量比较** 结果见图 3 和表 1。DM 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白相对表达量



A:对照组;B:DM 组;C:过表达 Cdh1 组;D:阴性病毒组。  
图 3 各组大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白表达 (Western blot)

Fig.3 Expression of GFAP and Cdh1 proteins in retinal tissues of rats in each group (Western blot)

表 1 4 组大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达量比较

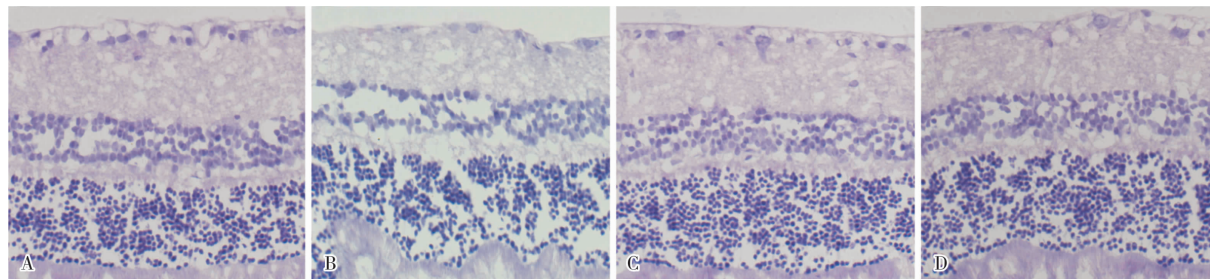
Tab.1 Comparison of the relative expression of GFAP and Cdh1 protein in retinal tissues of rats among the four groups

组别	n	GFAP 蛋白	Cdh1 蛋白
对照组	10	$0.09 \pm 0.02$	$0.18 \pm 0.07$
DM 组	10	$0.25 \pm 0.12^a$	$0.11 \pm 0.01^a$
过表达 Cdh1 组	10	$0.15 \pm 0.05^{ab}$	$0.24 \pm 0.04^a$
阴性病毒组	10	$0.25 \pm 0.09^{ab}$	$0.11 \pm 0.03^a$

注:与对照组比较<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ;与 DM 组比较<sup>b</sup>  $P < 0.05$ 。

**2.4 各组大鼠视网膜组织中 RGC 数量比较** 结果见图 4。对照组、DM 组、过表达 Cdh1 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 RGC 数量分别为 $(15.62 \pm 0.47)$ 、 $(7.19 \pm 0.34)$ 、 $(12.42 \pm 0.39)$ 、 $(8.24 \pm 0.41)$ 个。DM 组、过表达 Cdh1 组及阴性病毒组大鼠视网膜组织中

RGC 数量显著少于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 RGC 数量显著多于 DM 组和阴性病毒组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );阴性病毒组与 DM 组大鼠视网膜组织中 RGC 数量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



A:对照组;B:DM组;C:过表达 Cdh1 组;D:阴性病毒组。

图 4 各组大鼠视网膜组织中 RGC 数量(HE 染色,  $\times 400$ )

Fig. 4 RGC number in retinal tissues of rats in each group(HE staining,  $\times 400$ )

### 3 讨论

Cdh1 可负性调节细胞周期,从而使细胞从  $G_1$  期向 S 期进行<sup>[8]</sup>。有学者研究发现,Cdh1 可下调周期调节蛋白 Skp2,进而调控 p27 的变化,使细胞停滞在  $G_1$  期,避免异常增殖<sup>[9]</sup>。由此推测,调控 Cdh1 活性可能对 DR 状态下 Müller 细胞的胶质增殖有抑制作用。本课题通过构建慢病毒 Cdh1 蛋白过表达载体,并注入大鼠玻璃体腔,使视网膜内过表达外源性 Cdh1 蛋白,观察其对 DR 状态下 Müller 细胞增殖是否具有调控作用。本研究发现,DR 状态下,大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白表达明显降低,提示高血糖会引起细胞周期末期促进复合物-Cdh1 活性下降。这与邱瑾等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。

研究发现,DR 状态下 Müller 细胞胶质增殖随病程的延长可造成胶质瘢痕,最终打破视网膜稳态,引起神经细胞损伤<sup>[11]</sup>。因此,在 DR 早期减少 Müller 细胞胶质增殖,对防治 DR 尤为重要。GFAP 为中间丝骨架蛋白,研究证实,GFAP 与视网膜胶质增殖密切相关<sup>[12-13]</sup>,可作为 Müller 细胞增殖的标志物。GFAP 在 Müller 细胞中的作用尚不完全清楚,但 GFAP 表达量的改变与神经退行性疾病密切相关<sup>[14-15]</sup>。在 DR 状态下,视网膜 GFAP 表达的增加会引起谷氨酸代谢的改变,而谷氨酸的长期堆积会对视网膜产生毒性作用<sup>[16]</sup>。本研究通过大鼠玻璃体腔注射慢病毒载体过表达 Cdh1,成功上调了大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白表达量。免疫荧光检测结果显示,过表达 Cdh1 蛋白后视网膜组织中 GFAP 表达明显降低,说明调节视网膜组织中 Cdh1 蛋白的表达可抑制 DR 状态下 Müller 细胞胶质增殖。

DR 状态下视网膜血管通透性增加,炎症因子、

谷氨酸等毒性物质进入视网膜,从而破坏神经元和胶质细胞的完整性,最终引起神经元凋亡或死亡<sup>[17]</sup>。RGC 轴突构成视神经,越来越多的证据表明,在 DR 早期即发生视网膜 RGC 死亡,且 RGC 数量减少是 DR 进程中的重要组成部分<sup>[18]</sup>。与正常大鼠比较,DR 大鼠视网膜神经细胞发生凋亡,特别是在视网膜节细胞层<sup>[19]</sup>。本研究发现,DR 状态下视网膜组织中 RGC 数量明显减少,而过表达 Cdh1 蛋白后 RGC 数量有所增加。

综上所述,Cdh1 蛋白表达下降预示着视网膜细胞周期再循环,异常进入细胞周期可能导致 RGC 凋亡或死亡,而 Müller 细胞则发生反应性增殖。因此,慢病毒过表达 Cdh1 蛋白对 DM 大鼠视网膜 Müller 细胞胶质增殖具有一定的抑制作用,能够减轻 RGC 损伤。Cdh1 作为 DR 状态下视网膜神经损伤的重要参与者,探讨调控其活性对 DR 损伤的影响具有重要的研究价值。

### 参考文献:

- [1] BRESSLER S B, BEAULIEU W T, GLASSMAN A R, *et al.* Factors associated with worsening proliferative diabetic retinopathy in eyes treated with panretinal photocoagulation or ranibizumab [J]. *Ophthalmology*, 2017, 124(4): 431-439.
- [2] LIU L, ZUO Z, LU S, *et al.* Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation *in vivo* and *in vitro* [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(7): 813-821.
- [3] LE Y Z. VEGF production and signaling in Müller glia are critical to modulating vascular function and neuronal integrity in diabetic retinopathy and hypoxic retinal vascular diseases [J]. *Vis Res*, 2017, 139(10): 108-114.
- [4] REN H L, LV C N, XING Y, *et al.* Downregulated nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) aggravates cognitive impairments via



- neuroinflammation and synaptic plasticity in the senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mouse: a model of accelerated senescence[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(2): 1132-1144.
- [5] SALVI L, PLATEROTI P, BALDUCCI S, *et al.* Abnormalities of retinal ganglion cell complex at optical coherence tomography in patients with type 2 diabetes: a sign of diabetic polyneuropathy, not retinopathy[J]. *J Diabetes Complicat*, 2015, 30(3): 469-476.
- [6] CHENG R, LIANG X, ZHAO Q, *et al.* APC (Cdh1) controls cell cycle entry during liver regeneration[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 354(2): 78-84.
- [7] SILIES M, KLÄMBT C. APC/CFzr/Cdh1-dependent regulation of cell adhesion controls glial migration in the *Drosophila* PNS[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(11): 1357-1364.
- [8] ONDRACKA A, ROBBINS J A, CROSS F R. An APC/C-Cdh1 biosensor reveals the dynamics of Cdh1 inactivation at the G<sub>1</sub>/S transition[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): 159-166.
- [9] LIU W, WU G, LI W, *et al.* Cdh1-anaphase-promoting complex targets Skp2 for destruction in transforming growth factor  $\beta$ -induced growth inhibition[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(8): 2967-2979.
- [10] 邱瑾, 姚文龙, 张玥, 等. 氧糖剥夺对体外培养大鼠星形胶质细胞内 Cdh1 蛋白表达的影响及机制[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2012, 41(3): 274-277.
- [11] COUGHLIN B A, FEENSTRA D J, MOHR S. Müller cells and diabetic retinopathy[J]. *Vision Res*, 2017, 139(10): 93-100.
- [12] IVAN F B, ROBERT J, SORIANO-ROMAN LAURA, *et al.* Histologic characterization of retina neuroglia modifications in diabetic zucker diabetic fatty rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(11): 4925-4933.
- [13] LIU B, LV C, ZHANG J, *et al.* Effects of eldepryl on glial cell proliferation and activation in the substantia nigra and striatum in a rat model of Parkinson's disease. [J]. *Neurol Res*, 2017, 39(5): 459-467.
- [14] BRENNER M, NICHOLAS A P. The significance of deiminated GFAP in neurodegenerative diseases with special emphasis on alexander disease[J]. *Pro Dei Hum Heal Dis*, 2017, 21(9): 391-412.
- [15] 刘晓斌, 李民, 黄卫东. 血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  和胶质纤维酸性蛋白水平与脑胶质瘤恶性程度及患者预后的相关性[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(12): 1097-1100.
- [16] JHA K A, NAG T C, WADHWA S, *et al.* Immunohistochemical localization of GFAP and glutamate regulatory proteins in chick retina and their levels of expressions in altered photoperiods[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 37(6): 1-14.
- [17] DEHDASHTIAN E, MEHRZADI S, YOUSEFI B, *et al.* Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress[J]. *Life Sci*, 2017, 193(1): 20-33.
- [18] NG D S, CHIANG P P, TAN G, *et al.* Retinal ganglion cell neuronal damage in diabetes and diabetic retinopathy [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 44(4): 243-250.
- [19] HUANG W J, GAO F J, HU F Y, *et al.* Asiatic acid prevents retinal ganglion cell apoptosis in a rat model of glaucoma[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12(8): 489-498.

(本文编辑: 杨 博)

## (上接第 616 页)

- [7] GALM O, WILOP S, REICHEL T, *et al.* DNA methylation changes in multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2004, 18(10): 1687-1692.
- [8] GONZALEZ-PAZ N, CHNG W J, MCCLURE R F, *et al.* Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications[J]. *Blood*, 2007, 109(3): 1228-1232.
- [9] BRAGGIO E, MAIOLINO A, GOUVEIA M E, *et al.* Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma[J]. *Int J Hematol*, 2010, 91(1): 87-96.
- [10] 马媛, 史进方, 仇惠英, 等. CMTM5 表达对多发性骨髓瘤细胞增殖的影响及其机制研究[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(1): 58-62.
- [11] 贾谷, 马艳萍, 张灵, 等. 多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞与 U266 细胞中 ICSBP/IRF8 基因表达沉默的初步研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(5): 1127-1130.
- [12] KANTARJIAN H, ISSA J P J, ROSENFELD C S, *et al.* Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study[J]. *Cancer*, 2006, 106(8): 1794-1803.
- [13] WU D, DU X, JIN J, *et al.* Decitabine for treatment of myelodysplastic syndromes in Chinese patients: an open-label, phase-3b study[J]. *Adv Ther*, 2015, 32(11): 1140-1159.
- [14] ZHANG C, XIANG T, LI S, *et al.* The novel 19q13 KRAB zinc-finger tumour suppressor ZNF382 is frequently methylated in oesophageal squamous cell carcinoma and antagonises Wnt/ $\beta$ -catenin signalling[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 573.
- [15] LIU Z, ZHANG J, GAO Y, *et al.* Large-scale characterization of DNA methylation changes in human gastric carcinomas with and without metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(17): 4598-4612.
- [16] ECCO G, IMBEAULT M, TRONO D, *et al.* KRAB zinc finger proteins[J]. *Development*, 2017, 144(15): 2719-2729.
- [17] WANG W, CAI J, LIN Y, *et al.* Zinc fingers function cooperatively with KRAB domain for nuclear localization of KRAB-containing zinc finger proteins[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92155.
- [18] KUANG S Q, TONG W G, YANG H, *et al.* Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia [J]. *Leukemia*, 2008, 22(8): 1529-1538.
- [19] TAO Y F, HU S Y, LU J, *et al.* Zinc finger protein 382 is down-regulated by promoter hypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia patients[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1505-1515.

(本文编辑: 孟 月)