

H-89 和 wortmannin 对霍乱毒素促进受损视网膜节细胞再生作用的影响

李 雯, 梁玉香, 李海标

(中山大学基础医学院组织胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究蛋白激酶 A(PKA)抑制剂 H-89 和磷酸肌醇 3-激酶(PI3-K)特异抑制剂 wortmannin 对霍乱毒素(CTx)促进受损视网膜节细胞(RGCs)再生的影响,探讨 CTx 促进受损视网膜节细胞(RGCs)再生的作用机制。【方法】成年金黄地鼠近侧切断视神经(ON),移植一段自体坐骨神经(SN)与 ON 近侧残端缝合,玻璃体内注射给药。20 只动物分 4 组,每组 5 只。注射 CTx 为 CTx 组,注射 CTx 和 H-89 为 CTx+H 组、注射 CTx 和 wortmannin 为 CTx+W 组、不给药组为对照组。用粒蓝(GB)逆行标记再生的 RGCs,取视网膜于荧光镜下计数。【结果】动物存活 4 周后,对照组、CTx 组和 CTx+H 组再生节细胞平均数(个/视网膜)分别为: (1 431±352), (2 567±883)和(1 606±293)个/视网膜($n=5$)。CTx+H 组与对照组比较差异无显著性($P < 0.05$),而与 CTx 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$),表明 H-89 可抑制 CTx 的促再生作用;CTx+W 组再生节细胞数为:(1 872±262)个/视网膜($n=5$),与对照组和 CTx 组比较差异均有显著性($P < 0.05$),提示 wortmannin 对 CTx 有部分的抑制作用。【结论】CTx 可能是通过 PKA-CREB 通路实现对受损 RGCs 的促再生作用,PI3-K-Akt 通路可能是 PKA-CREB 通路的下游分支。

关键词:轴突再生;霍乱毒素;视网膜;节细胞

中图分类号:R329.2

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)01-0034-04

Effects of H-89 and Wortmannin on Promoting Effects of CTx on Regeneration of Injured Retinal Ganglion Cells

LI Wen, LIANG Yu-xiang, LI Hai-biao

(Department of Histology & Embryology, Preclinical Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effects of PKA inhibitor H89 and PI3-K inhibitor wortmannin acting on the regeneration promoting effects of CTx and the regeneration promoting mechanism of CTx on injured retinal ganglion cells (RGCs). 【Methods】Optic nerve (ON) of adult golden hamster was transected, a segment of autologous sciatic nerve (SN) was removed and sutured to the proximal stump of ON. Twenty animals were separated into 4 groups, which were CTx, CTx+H, CTx+W, and control groups, each group have 5 animals. CTx only, CTx and H-89 or wortmannin were given by intravitreal injection. The regenerated RGCs were labeled retrogradely by granular blue (GB) and counted under fluorescent microscope. 【Results】Four weeks later, the mean number of regenerating RGCs were counted as 1 431±352, 2 567±883, and 1 606±293/retina in control group, CTx group, and CTx + H group, respectively. The mean number of regenerating RGCs in the CTx +H group had no significant difference compared with that in control group ($P < 0.05$), it has significant difference compared with that in CTx

收稿日期:2004-06-25

基金项目:国家自然科学基金资助课题(9870266);广东省自然科学基金资助课题(980096)

作者简介:李 雯(1964-),女,江西南昌人,博士,副教授,现在中山大学第一附属医院外科实验室. E-mail:liwen32@hotmail.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

group ($P < 0.05$). This results showed that H-89 can inhibit the regeneration promoting effects of CTx on injured RGCs. In the group treated with wortmannin (CTx+W), the mean number of regenerating RGCs was $1\ 872 \pm 262/$ retina, which has significant difference compared with those in CTx group and control group ($P < 0.05$). This suggest that wortmannin can partially inhibit the regeneration promoting effects of CTx on injured RGCs.

【Conclusion】 The regeneration promoting effects of CTx on injured RGCs could be realized by activating PKA-CREB pathway, PI3-K-Akt pathway may be one of downstream pathways.

Key words: retina; ganglion cells; axonal regeneration; cholera toxin

[J SUN Yat-sen (Med Sci), 2005, 26 (1): 34-37]

目前大量的研究使人们确信,给予适当条件,成年哺乳动物中枢神经有能力再生。如给予适当的神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs),受损中枢神经元可以维持存活和再生其突起^[1];去极化和高水平的cAMP可以使RGCs等神经元表面的NTFs受体上调,从而可提高神经元对NTFs的反应性^[2]。但这些因素促进中枢神经元再生的机制尚不清楚。cAMP介导的信号转导途径和磷酸肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K)途径是外界信号引起细胞内基因表达的两条重要信号转导途径。研究表明,前者可通过蛋白激酶A(Protein kinase A, PKA)磷酸化某些转录子,如cAMP反应元件结合蛋白(CREB),来调控某些即早基因(如c-fos, c-Jun)或延迟反应基因的表达,促进神经元的存活和再生^[3]。后者通过激活丝-苏氨酸激酶Akt其下游与死亡相关的基因,抑制细胞的凋亡,促进其存活^[4]。霍乱毒素(cholera toxin, CTx)是兴奋性G蛋白(Gs)的特异性激动剂,Gs与腺苷酸环化酶(AC)偶联,激活Gs可作用于AC,使cAMP生成增多^[5]。我们已有的研究表明,玻璃体注射CTx可以大幅度提高视神经切断后的RGCs的存活和轴突再生,CTx可能通过PKA-CREB和PI3-K-Akt通路促进受损RGCs存活作用^[6]。那么,CTx是否也通过cAMP作用于细胞内的相应的位点起促进RGCs的轴突再生还不清楚。为此,我们利用PKA抑制剂H-89和PI3-K特异抑制剂wortmannin玻璃体内注射,分别阻断PKA-CREB和PI3-K-Akt这两条重要的信号转导通路,观察它们对CTx促进成年地鼠受损RGCs再生的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年健康雄性金黄地鼠20只,体质量80~100g,年龄6~8周,中山大学实验动物中心提供。本实验动物随机分为4组($n=5$):①对照组:在切断的视神经(ON)近侧残端缝接一段2cm自体坐骨神经,玻璃体内注射CTx溶剂;②CTx组:在对照组基础上加玻璃体内注射CTx;③CTx+H组:在CTx组的基础上加玻璃体内注射H-89;④CTx+W组:在CTx组的基础上加玻璃体内注射wortmannin。术后动物存活4周。

1.2 试剂

CTx(RBI公司产品),溶于 $\text{Na}_2\text{EDTA}/\text{NaCl}$,使用剂量为每眼480pg。H-89(dihydrochloride,美国RBI公司产品),溶于双蒸水,使用浓度为 $60\ \mu\text{mol/L}$ 。wortmannin(RBI公司产品),溶于二甲亚砜,使用浓度为 $1\ \mu\text{mol/L}$ 。

1.3 手术方法

玻璃体内注射 $3\ \mu\text{L}$ H-89或wortmannin后30min,距球后1mm处切断ON,移植一段长约2cm的自体坐骨神经,并将其包埋、固定,眼球复位后在原针孔处注入CTx(每次注药均注意停留至少1min,以保证药液尽量不外漏)。术后分别在第7、14天再次给予上述药物,CTx在H-89或wortmannin之后约1h给予。动物存活4周后,观察RGCs的再生情况。

1.4 再生RGCs的标记与计数

动物存活4周后,于取材前3d麻醉动物,在与ON缝接端约1.5cm处切断移植的坐骨神经,并在近侧残端放置沾有3%粒蓝的明胶海绵进行逆行标记。3d后在麻醉状态下摘出眼球,于 $4\ ^\circ\text{C}$ 40g/L多聚甲醛中剥离视网膜并继续固定1h,经 $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液漂洗后制备视网膜平铺片,荧光显微镜下计数整个视网膜再生的粒蓝标记的RGCs,拍摄视网膜颞上象限距视盘1mm处粒蓝标记的再生RGCs照片。采用成对 t 检验进行统

计分析再生的 RGCs 数。

2 结果

1 对照组与 CTx 再生组 RGCs 数

图 1 示切断 ON, ON 近端缝接自体坐骨神经后, 部分 RGCs 轴突再生长入移植的坐骨神经。对照组与 CTx 再生组再生的 RGCs 平均数分别为 $(1\,431 \pm 352)$ 及 $(2\,567 \pm 883)$ 个/视网膜 ($\bar{x} \pm s, n=5$) (图 2A, B)。

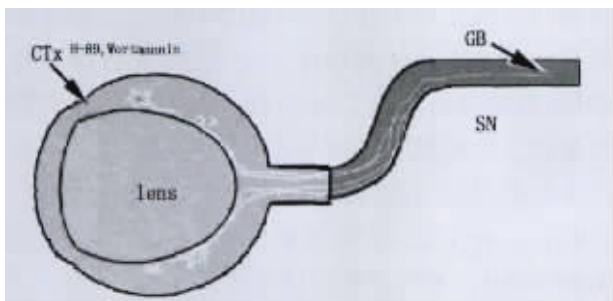


图 1 ON 切断缝接 SN 的 RGCs 轴突再生模型

Fig.1 The RGCs regenerating model after ON transected and sutured to SN

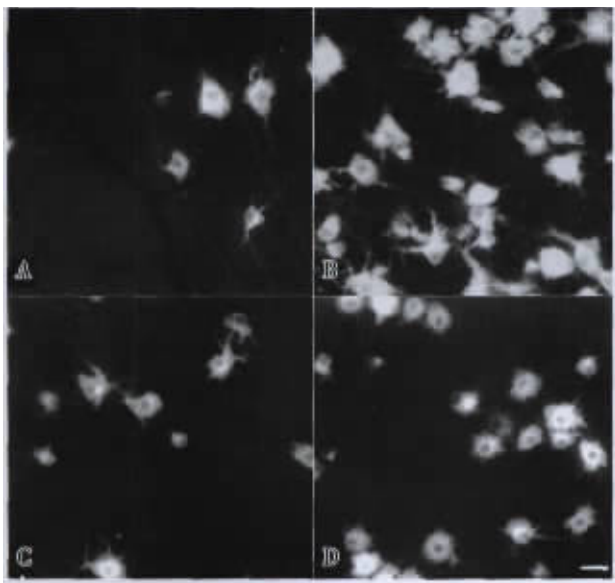


图 2 视网膜粒蓝标记的再生 RGCs

Fig.2 The regenerating RGCs labeled by granular blue in retina

The upper-temporal quadrant 1mm from optic disk, in 4 weeks survival groups: A: Control group; B: CTx group; C: CTx+H group; D: CTx+W group Bar=40 μm

2.2 H-89 对 CTx 促进 RGCs 再生作用的影响

应用 H-89 后, CTx 促进 RGCs 再生的能力下降, 再生 RGCs 数为 $(1\,606 \pm 293)$ 个/视网膜 ($\bar{x} \pm s, n=5$) (图 2C)。经成对 t 检验分析, 与对照组相比, $P > 0.05$; 同 CTx 组相比, $P < 0.05$, 说明 H-89 可抑制 CTx 对 RGCs 的促再生作用。

2.3 Wortmannin 对 CTx 促进 RGCs 再生作用的影响

应用 wortmannin 后, CTx 促进 RGCs 再生的能力受影响较少, 再生 RGCs 数为 $(1\,872 \pm 262)$ 个/视网膜 ($\bar{x} \pm s, n=5$) (图 2D), 与对照组和 CTx 组比较, 再生 RGCs 数之间的差异均有显著性 ($P < 0.05$), 结果提示, wortmannin 可部分抑制 CTx 对 RGCs 的促再生作用。

3 讨论

给予适当的 NTFs, 受损中枢神经元可以维持存活和再生其突起, 但这些因素促进中枢神经元再生的机制尚不完全清楚。研究发现 NTFs 可通过和它们相应的受体结合引发一系列的信号转导而发挥它们的生物学作用^[3]。目前研究最多的是 Ras-MAPK 和 PI3-K-Akt 途径, 前者可通过某些转录因子如 CREB 等起作用。近来的研究表明 CREB 是神经营养素 (NTs) 对神经元存活和再生起重要作用的靶点, NTs 通过它来调控有关基因的表达^[3]。而 PI3-K-Akt 途径中的 Akt 是 NTFs 促神经元存活通路中的关键蛋白激酶, 它通过磷酸化 Bad, 释放出 Bcl-X_L, 促进神经元存活^[7], 还可通过磷酸化 caspase9 和 FKHRL1 直接或间接抑制死亡相关基因的表达, 而起抗凋亡作用^[8-9]。一些研究也表明, 不少 NTFs 具有显著的抗神经元凋亡作用, 可能通过抗凋亡作用而促进神经元的存活, 例如 CNTF、BDNF 能阻断鸡胚、鼠胚及其它新生动物运动神经元的凋亡, 促进其存活; NT-4/5 可明显减少新生大鼠 RGCs 的凋亡; GDNF 能阻断成年大鼠 ON 切断后 RGCs 的凋亡, 促进其存活^[10]。

cAMP 是细胞内非常重要的第二信使, 它可以参与细胞的多种功能和调控, 近年一个令人感兴趣的发现是, cAMP 还有抗神经元凋亡作用, 尤其对维持中枢神经元的存活和突起的生长有重要

作用。有研究提示,中枢神经元受损后,胞体内cAMP水平的下降会导致神经元对多种NTFs的反应性下降,而去极化和高水平的cAMP可以使RGCs表面的NTFs上调,从而可提高神经元对NTFs的反应性^[2,11]。最近Qiu等^[12]和Neumann等^[13]的实验均表明背根节内注射cAMP的类似物可以促进在体的受损感觉神经元轴突的再生,并且前者的实验表明受损初期神经元的再生是PKA依赖的。我们的实验表明,H-89玻璃体内注射可以抑制CTx对受损RGCs再生的促进作用,提示CTx促进受损RGCs再生的作用可能是通过cAMP作用于PKA而起作用的。Wortmannin玻璃体内注射亦可部分抑制CTx对受损RGCs再生的促进作用,说明CTx对受损RGCs再生的促进作用部分是通过PI3-K-Akt通路实现的,PI3-K-Akt通路极有可能是PKA-CREB的下游信号途径的一部分:即CTx升高视网膜cAMP后,通过激活PKA-CREB通路,然后作用于PI3-K-Akt和其它的信号传导通路而实现对受损RGCs的促再生作用,这个结果与我们在受损RGCs存活方面所做的实验结果相一致,提示CTx促进RGCs存活和再生的细胞信号传导通路的一致性,这同时也表明只有神经元胞体存活才有轴突再生的物质基础。由于胞内信号系统的相互作用十分复杂,cAMP是否还通过其它途径起作用,尚待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Cai D, Shen Y, De Bellard M, *et al.* Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via cAMP-dependent mechanisms [J]. *Neuron*, 1999, 22(1): 89-101.
- [2] Meyer-Frank A, Wilkinson GA, Kruttgen A, *et al.* Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons [J]. *Neuron*, 1998, 21(4): 681-93.
- [3] Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, *et al.* CREB: A major mediator of neuronal neurotrophin responses [J]. *Neuron*, 1997, 19(5): 1031-47.
- [4] Datta SR, Dudek H, Tao X, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. *Cell*, 1997, 91(2): 231-4.
- [5] Hleper JR, Gilman AG, G Protein[J]. *TIBS*, 1992, 17(10): 383-6.
- [6] 李雯,李海标.霍乱毒素对金黄地鼠视网膜神经肽Y免疫反应节细胞再生的影响[J].*中山医科大学学报*, 2001, 22(1): 5-7, 13.
- [7] Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, *et al.* Phosphorylated CREB binds specifically to nuclear protein CBP [J]. *Nature*, 1993, 365(6449): 855-9.
- [8] Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor [J]. *Cell*, 1999, 96(6): 857-68.
- [9] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation [J]. *Science*, 1998, 282(5392): 1318-21.
- [10] Oppenheim RW, Wiese S, Prevette D, *et al.* Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF [J]. *Nature*, 1995, 373(6512): 344-6.
- [11] Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, *et al.* Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy [J]. *Neuron*, 1999, 23(2): 285-95.
- [12] Qiu J, Cai D, McAtee M, *et al.* Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP [J]. *Neuron*, 2002, 34(6): 895-903.
- [13] Neumann S, Bradke F, Tessier-lavigne M, *et al.* Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation [J]. 2002, 34(6): 885-93.

(编辑 张恩健)