论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0376-05

TO901317修复酒精致新生小鼠视网膜节细胞损伤的实验研究

唐永萍[1],杨 阳[2],徐 培[2],徐海伟[1],阴正勤[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院全军眼科中心,视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室[1],基础医学部发育生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 观察酒精暴露对新生小鼠视网膜结构的影响,以及肝脏X受体(LXRs)激动剂TO901317对酒精损伤小鼠视网膜的保护作用。**方法** 将新生C57BL/6J小鼠分为对照组、酒精暴露组和激动剂TO预处理组,每组3只。采用HE染色检测各组小鼠视网膜大体结构改变,采用免疫组化染色检测各组小鼠视网膜NeuN阳性细胞数、GFAP表达变化。**结果** 免疫组化染色发现LXRβ主要分布于新生小鼠视网膜节细胞层,HE染色发现酒精组新生小鼠视网膜节细胞数量较对照组显著减少($P<0.01$),TO处理能显著翻转酒精暴露导致的视网膜节细胞层细胞数量减少($P<0.05$);免疫组化染色发现酒精组小鼠眼球视网膜节细胞层NeuN阳性细胞数明显少于对照组($P<0.01$),而TO预处理组较酒精组NeuN阳性细胞显著增多($P<0.01$)。对各组进行GFAP免疫组化染色并采用光密度分析进行半定量分析,结果显示酒精组小鼠视网膜GFAP表达较对照组和TO预处理组显著增高($P<0.01$)。**结论** LXRs受体激活可有效抑制酒精所致视网膜中星形胶质细胞的活化,挽救节细胞丢失。

[关键词] 肝脏X受体;视网膜;神经节细胞层;星形胶质细胞
[中图法分类号] R394.2; R595.6; R774.1 [文献标志码] A

Neuroprotective effect of liver X receptor agonist TO901317 on ganglion cells in alcohol-induced retinal injury in neonatal mice

Tang Yongping[1], Yang Yang[2], Xu Pei[2], Xu Haiwei[1], Yin Zhengqin[1] ([1]Center of Ophthalmology, Key Lab of Visual Damage and Regeneration & Restoration of Chongqing, Southwest Hospital, [2]Department of Developmental Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of alcohol exposure on the retina of neonatal mice and the neuroprotective role of liver X receptor (LXR) agonist TO901317 (TO). **Methods** Mice were randomly divided into 3 groups, including a control group, an alcohol exposure group and a TO pretreatment group ($n=3$). Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the general structure of mouse retina, and immunochemistry was applied to detect NeuN-positive neurons and GFAP expression in the retina. **Results** LXRβ was mainly expressed in retinal ganglion cell layer of neonatal (postnatal day 6, P6) mice. HE staining showed a significant decrease in cell number in retinal ganglion cell layer of the alcohol exposure group compared with the control group ($P<0.01$), while TO could protect the ganglion cells from alcohol damage ($P<0.05$). Compared with the control group, NeuN-positive cells in the retinal ganglion cell layer of the alcohol exposure group significantly decreased ($P<0.01$), but the TO pretreatment group had more NeuN-positive cells than the alcohol exposure group ($P<0.01$). GFAP expression significantly increased in the retinal ganglion cell layer of the alcohol exposure group as compared with the control group and TO pretreatment group ($P<0.01$). **Conclusion** LXR agonist TO can inhibit alcohol-induced astrocyte activation in retina and rescue retinal ganglion cells in neonatal mice.

[**Key words**] liver X receptor; retina; ganglion cell layer; astrocyte

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271051, 31071299) and the Starting Funds of Scientific Research for the Personnels Returned From Overseas of Chongqing (CSTC2011jjzt0137). Corresponding author: Yin Zhengqin, Tel: 86-23-68754401, E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(31271051,31071299);重庆市留学回国人员启动基金(CSTC2011jjzt0137)
[通信作者] 阴正勤,电话:(023)68754401,E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121221.1602.001.html(2012-12-21)

胎儿酒精综合征(fetal alcohol syndrome, FAS)是一种由于孕期饮酒过量导致的胎儿发育异常综合征。在美国有 0.5‰～3‰的新生儿被诊断为 FAS。FAS 患儿存在智力以及身体发育迟缓、面部畸形、脑过小以及大脑结构异常等一系列改变[1]。实验动物也证实出生前酒精暴露可导致脑容积过小、脑质量减轻等现象[2]。海马、小脑以及胼胝体等部位的神经元的丢失被认为是出现上述异常的主要原因[3-5]。作为中枢神经系统的一部分,视网膜以及视觉通路同样受到酒精毒性的影响。在 90% 的 FAS 儿童中均存在眼球发育异常,包括小睑裂、视神经发育不良、视神经成鞘延迟、视网膜神经节细胞层细胞数量减少等[6],这些视觉器官的改变在出生早期酒精暴露的各种动物模型中也得到了证实[7-8]。

肝脏 X 受体(liver X receptors, LXRs)为核受体家族成员,在调节炎症反应、脂质胆固醇代谢以及中枢神经系统发育中发挥着重要作用。该受体尤其是 LXRβ 在中枢神经系统以及视网膜中表达,在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson disease, PD)等神经退行性疾病中,LXRs 通过调节炎症反应、脂质代谢等减少神经元丢失,从而延缓疾病的发展[9]。该受体是否对视网膜中神经元具有保护作用目前尚不清楚。为此,本实验通过给予酒精暴露的新生小鼠 LXRs 激动剂 TO901317 以探讨 LXRs 对视网膜神经元的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雌性 C57BL/6J 孕鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,喂养环境为光照时间 8:00～20:00,室温控制在 18～22 ℃,给予足够的食物和水。将分娩得到的新生小鼠分为 3 组,每组 3 只,酒精组给予二甲基亚硝胺和 20% 酒精;LXRs 激动剂 TO 预处理组给予激动剂 TO901317 和 20% 酒精;对照组给予二甲基亚硝胺和灭菌生理盐水。

1.2 给药方式

酒精组:出生后第 4 天腹腔注射 DMSO,10 mg/kg,出生后第 5 天颈部皮下注射 20% 酒精,2.5 mg/kg,2 h 后再给予相同剂量 20% 酒精[10];LXRs 激动预处理组:于出生后第 4 天腹腔注射激动剂 TO901317(激动剂 TO 用 DMSO∶PBS = 1∶3 配制而成),10 mg/kg,出生后第 5 天颈部皮下注射 20% 酒精,2.5 mg/kg,2 h 后再给予相同剂量 20% 酒精;对照组:分别于出生后第 4 天注射 DMSO,10 mg/kg,第 5 天注射与酒精组相同剂量的灭菌生理盐水。于出生后第 6 天(P6)处死小鼠并收集眼球标本。

1.3 主要药物和试剂

激动剂 TO901317 购自 Cayman 公司,DMSO 购自 Sigma 公司,山羊抗肝脏 X 受体 β 抗体由 Gustafsson 教授惠赠,鼠抗 NeuN 抗体购自 Millipore 公司,兔抗 GFAP 抗体购自北京中杉公司,生物素标记的羊抗兔、兔抗鼠购自 Zymed 公司,兔抗山羊、SABC 复合物购自 Vector 公司,DAB 显色试剂盒购自北京中杉公司。

1.4 HE 染色和免疫组化

将收集的眼球标本去除角膜后于 4% 多聚甲醛中 4 ℃过夜,梯度酒精脱水,石蜡包埋切片(厚度 5 μm)。选过视神经层面的切片行 HE 染色,常规脱蜡和酒精水化后,苏木精 5 min,水洗 10 min,0.5% 盐酸酒精分色 3～5 s,水洗 10 min,伊红 3 min,水洗 10 min,37 ℃烘干后中性树脂封片。选取过视神经平面的切片分别行 LXRβ、GFAP 和 NeuN 免疫组化染色,常规脱蜡和酒精水化后,微波中高火 3 min,停 3 min,中火 3 min 抗原修复,室温冷却,漂洗后 0.3% Triton X-100 通透 30 min,分别与含有山羊抗 LXRβ(1∶100),兔抗 GFAP(1∶200),鼠抗 NeuN(1∶300)的一抗工作液孵育,4 ℃过夜;漂洗后与生物素化的羊抗兔(1∶200),兔抗鼠(1∶200)IgG,37 ℃孵育 2 h;漂洗后与 SABC 复合物 37 ℃孵育 1 h;漂洗后 DAB 显色,37 ℃烘干,中性树脂封片。

1.5 计数方法

视网膜神经节细胞层(retinal ganglion cell layer, GCL)细胞计数:GCL 接近于单层排列,因此可以通过计数单位长度内细胞数量来得到该层的细胞密度(/mm),本实验统计了位于距视乳头 215～785 μm GCL 细胞数量,并计算单位长度上细胞数[11]。NeuN 阳性细胞计数:统计了鼻侧、颞侧视网膜距视乳头 215～785 μm 所有 NeuN 阳性细胞[11]。GFAP 表达半定量分析:使用 IPP(Image Pro Plus)软件对鼻侧、颞侧视网膜距视乳头 215～785 μm GFAP 的表达进行光密度分析。

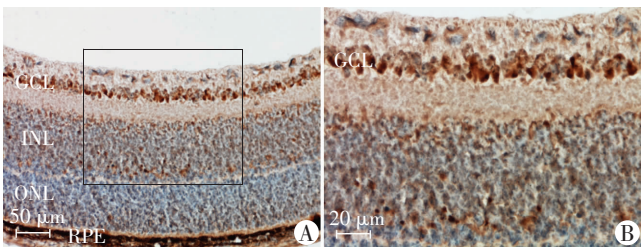
1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组总体均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 LXRβ 在 P6 新生小鼠视网膜中的表达

使用多克隆抗体对 LXRβ 受体在 P6 野生型小鼠视网膜中的表达情况进行检测,结果显示,棕黄色阳性细胞位于蓝色细胞中,呈核表达,且阳性细胞主要分布于 GCL 中,内核层中有少量阳性细胞(图 1)。



A: 出生后 6d 小鼠视网膜中 LXRβ 分布;B:A 图局部放大 RPE:视网膜色素上皮层;ONL:外核层;INL:内核层;GCL:节细胞层

图 1 LXRβ 在 P6 小鼠视网膜中的表达 (SABC)

2.2 TO对酒精暴露P6新生小鼠视网膜结构的影响

使用HE染色方法检测酒精暴露对新生鼠视网膜结构的影响(图2)。发现对照组GCL细胞数为(178.6±12.1)个/mm,酒精组GCL细胞数(131.4±9.6)个/mm,与对照组相比,酒精暴露组小鼠视网膜GCL细胞数量明显减少($P<0.01$)。TO预处理组GCL细胞数为(165.9±20.8)个/mm,与酒精组相比GCL细胞数量明显增加($P<0.05$),TO预处理组和对照组的GCL细胞数量之间无明显差异($P>0.05$)。视网膜其余层次结构在3组小鼠中未见明显差异。提示酒精暴露可损伤新生小鼠GCL中的细胞,导致该层细胞丢失,而预先给予TO901317可减轻酒精对视网膜神经节细胞层细胞的毒性作用。见图2。

2.3 TO对酒精暴露P6新生小鼠视网膜GCL中NeuN阳性细胞数量的影响

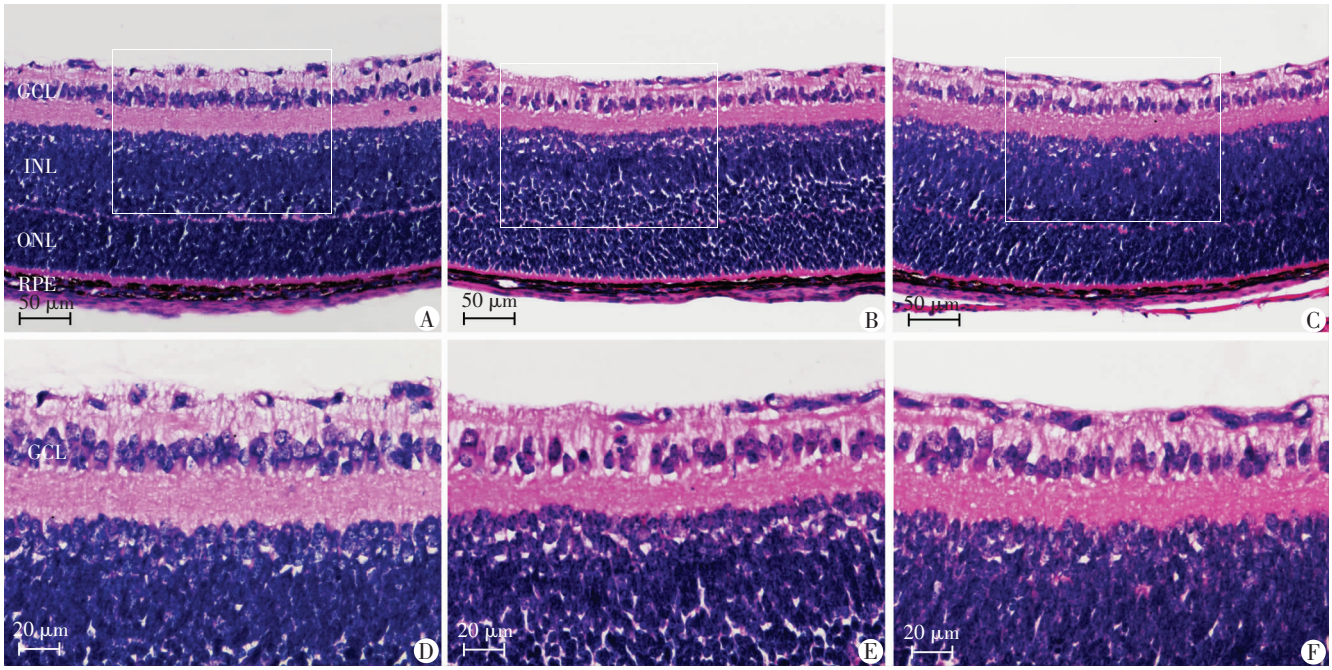
采用成熟神经元标志物NeuN检测各组小鼠视网膜中神经元数量变化。发现对照组NeuN阳性细胞数为(44.1±1.2)个,酒精组NeuN阳性细胞数(28.3±1.2)个,与对照组相比,酒精暴露组小鼠视网膜NeuN阳性细胞数明显减少($P<0.01$)。TO预处理组NeuN阳性细胞数为(37.6±0.9)个,NeuN阳性细胞数量较酒精组明显增多($P<0.01$)。TO预处理组和对照组的NeuN细胞数量之间无明显差异($P>0.05$)。说明酒精暴露可损伤新生小鼠GCL中NeuN阳性神经元数量,而预先给予激动剂可减轻酒精对视网膜神经节细胞层神经元的毒性作用。见图3。

2.4 TO对酒精暴露P6新生小鼠视网膜结构中GFAP阳性细胞的作用

采用星形胶质细胞标记物GFAP检测各组小鼠眼球视网膜中星形胶质细胞的活化情况。结果显示酒精组中星形胶质细胞数量较正常对照增多,纤维增粗明显,而给予激动剂的小鼠视网膜中GFAP阳性表达接近于正常对照。采用光密度对各组GFAP表达量进行半定量分析,发现酒精组GFAP光密度值(27.84±5.14)较对照组(7.46±0.84)和TO预处理组(8.36±1.42)低,均有统计学意义($P<0.01$),而TO预处理组和对照组的光密度值之间无明显差异($P>0.05$)。提示酒精增强了视网膜中胶质细胞激活,而激动剂可抑制酒精引起的视网膜GCL胶质细胞的激活。见图4。

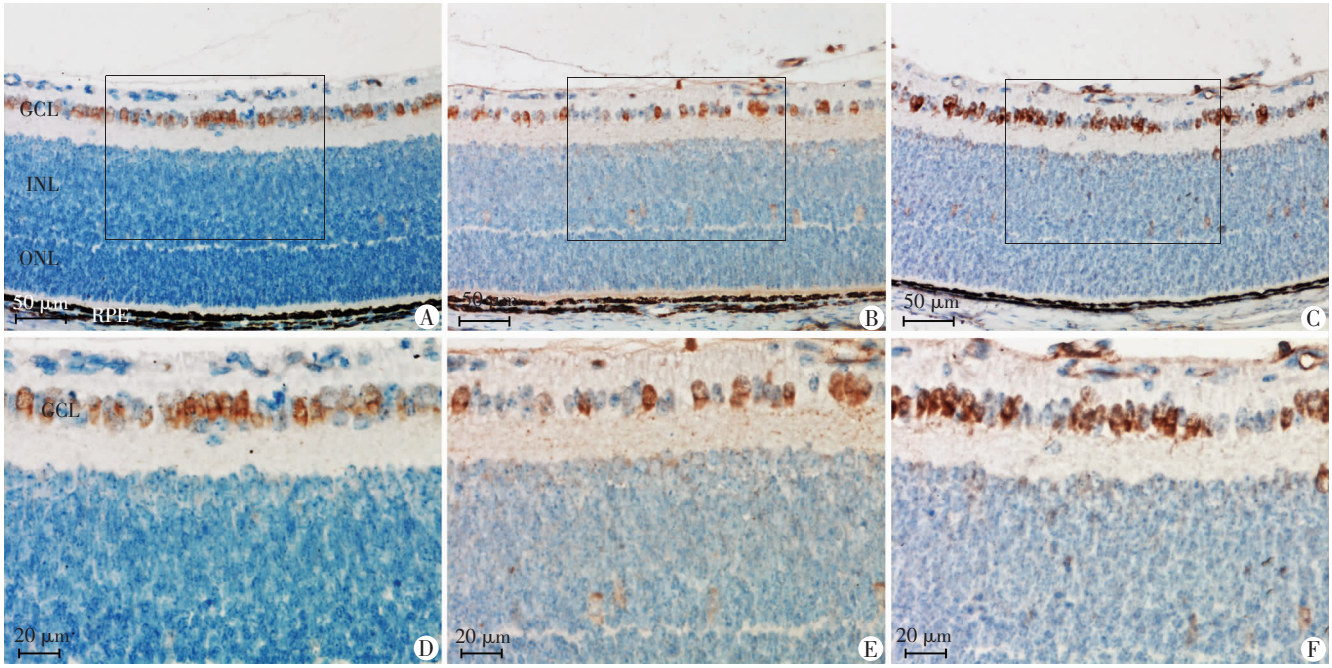
3 讨论

FAS是一种常见的非遗传性的新生儿多器官发育异常综合征。其主要临床表现包括生长缓慢、颅面部畸形、中枢神经系统功能障碍,以及视觉系统发育障碍,如小睑裂、视神经成鞘滞后、视力下降等。实验动物模型常用于研究酒精暴露引起多系统损伤的机制。在FAS患者和动物模型中均发现有脑体积减小、脑质量减轻的现象[1-2]。小鼠对酒精毒性敏感,新生小鼠单次给予酒精即可导致毒性损伤。以往研究[3-5]发现,在小鼠酒精暴露后的大脑海马、胼胝体,以及小脑中均有明显的神经元丢失。视网膜为中枢神经系统的一部分,90%的FAS患儿有眼球发育异常,在酒精暴露小鼠和大鼠的视网膜中观察到神经节细胞层神经元的丢失。出生后酒精暴露动物模型常用于FAS导致的器官损伤研究,Tenkova等[10]采用皮下注射的方法给予新生小鼠酒精,发现酒精对出生后第3~5天小鼠



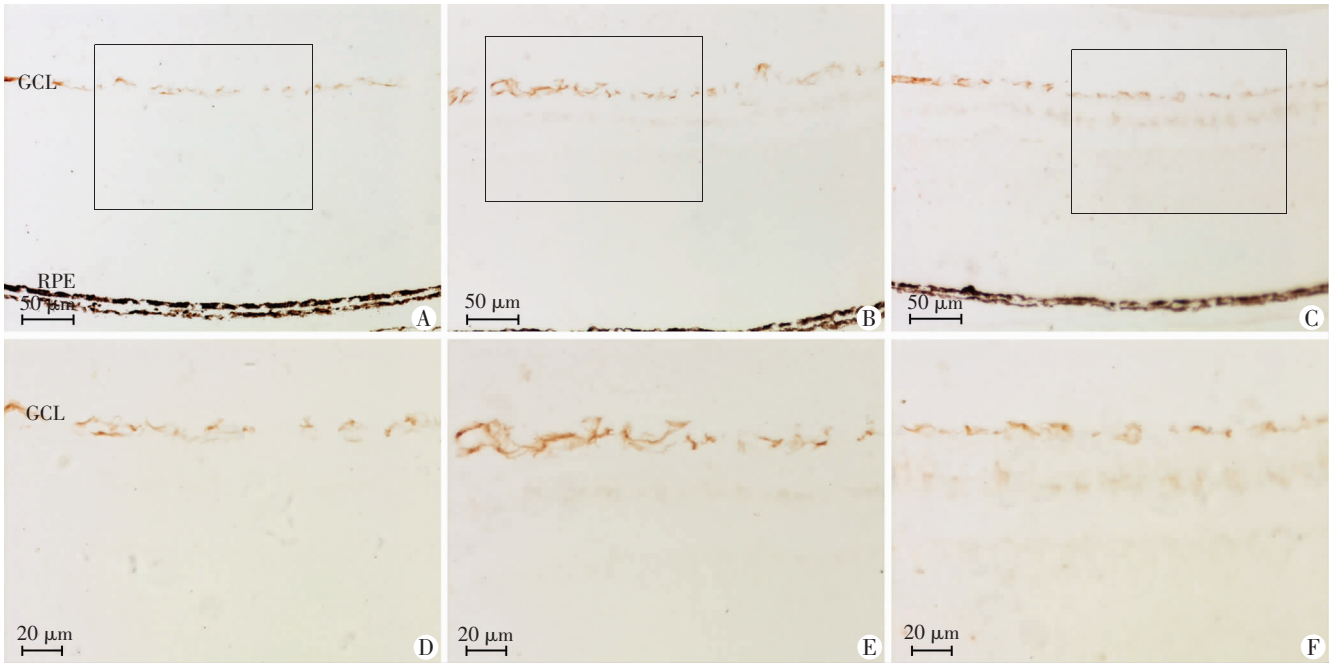
A:对照组;B:酒精暴露组;C:TO预处理组;D、E、F:分别为A、B、C图局部放大

图2 TO对酒精暴露P6新生小鼠视网膜结构的影响 (HE)



A:对照组;B:酒精暴露组;C:TO 预处理组;D、E、F:分别为 A、B、C 图局部放大

图 3　TO 对酒精暴露 P6 新生小鼠视网膜中 NeuN 阳性神经元数量的影响　(SABC)



A:对照组;B:酒精暴露组;C:TO 预处理组;D、E、F:分别为 A、B、C 图局部放大

图 4　TO 对酒精暴露 P6 新生小鼠视网膜中 GFAP 表达的影响　(SABC)

视网膜节细胞层神经元的影响最明显,但其损伤机制尚不清楚。

LXRs 为转录因子核受体家族成员,已发现的有两个亚型,LXRα 和 LXRβ。LXRs 在多个器官系统中均有表达,LXRα 主要分布于肝脏、胰腺等代谢相关器官,而中枢神经系统中则以 LXRβ 为主。LXRs 的主要功能为调节脂质代谢、调节免疫[12-13]。作为中枢神经系统的一部分,视网膜中也有 LXRβ 的表达,Annicotte 等[14]使用原位杂交的方法发现在胚胎 16.5 d 时,小鼠视网膜中即有 LXRβ 表达。本实验通过免疫组织化学方法也证实在出生后 6 d 的小鼠视网膜中存在 LXRβ 表达,且此时 LXRβ 阳性细胞主要分布于神经节细胞层。LXRβ 在视网膜中的作用还尚不清楚。TO901317 是一种人工合成的非选择性 LXRs 激动剂,

动物实验研究发现,LXRs激动剂在枢神经系统神经退行性疾病中可以减少神经元的丢失,减缓病情发展[9,15]。PD是常见的中枢神经系统神经退行性疾病,其特征性病理改变为中脑黑质多巴胺神经元的丢失、胶质瘢痕形成[16]。Dai等[9]通过给予PD模型小鼠LXRs激动剂,观察到激动剂可以明显减少该模型小鼠中脑黑质多巴胺神经元的丢失,并抑制星形胶质细胞的活化。

本研究发现,新生小鼠酒精暴露后导致了视网膜神经节细胞层神经元数量的明显丢失,这与以往研究[10]结果一致。提前给予小鼠LXRs激动剂后,发现GCL中神经元数量丢失较酒精暴露组明显减少,提示激动剂的使用可以减少酒精暴露引起的GCL神经元丢失。通过GFAP染色发现酒精组视网膜星形胶质细胞活化明显强于对照组和TO预处理组,提示酒精暴露增强了视网膜中炎症反应,而激动剂则可以抑制酒精暴露后视网膜星形胶质细胞的活化,抑制了视网膜炎症反应。在视神经钳夹伤动物模型和视网膜退行性疾病中常常发现有星形胶质细胞过度活化,胶质瘢痕形成等改变,活化的胶质细胞分泌的炎症介质和细胞因子损伤视网膜神经元,进一步加重视网膜病变[17-18]。在本研究的酒精暴露模型中,观察到LXRs激动剂可以抑制星形胶质细胞活化,减少了GCL神经元的丢失,提示激动剂可能通过抑制酒精暴露后视网膜的炎症反应而缓解酒精对视网膜神经元的毒性作用,这与激动剂在中枢神经系统疾病中减缓神经元退变的机制相似[19-20]。激动剂是否还通过抑制小胶质细胞以及其他炎症反应介质来保护视网膜神经元还有待进一步证实。

参考文献:

[1] Drever N, Yin H, Kechichian T, *et al*. The expression of antioxidant enzymes in a mouse model of fetal alcohol syndrome[J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 206(4): 358.e19-358.e22.

[2] Bonthius D J, West J R. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure[J]. Alcohol Clin Exp Res, 1990, 14(1): 107-118.

[3] Gonzalez-Burgos I, Alejandre-Gomez M, Olvera-Cortes M E, *et al*. Prenatal-through-postnatal exposure to moderate levels of ethanol leads to damage on the hippocampal CA1 field of juvenile rats a stereology and Golgi study[J]. Neurosci Res, 2006, 56(4): 400-408.

[4] Miki T, Yokoyama T, Sumitani K, *et al*. Ethanol neurotoxicity and dentate gyrus development[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2008, 48(3): 110-117.

[5] Qiang M, Wang M W, Elberger A J. Second trimester prenatal alcohol exposure alters development of rat corpus callosum[J]. Neurotoxicol Teratol, 2002, 24(6): 719-732.

[6] Stromland K. Ocular involvement in the fetal alcohol syndrome[J]. Surv Ophthalmol, 1987, 31(4): 277-284.

[7] Ashwell K W, Zhang L L. Optic nerve hypoplasia in an acute exposure model of the fetal alcohol syndrome[J]. Neurotoxicol Teratol, 1994, 16(2): 161-167.

[8] Harris S J, Wilce P, Bedi K S. Exposure of rats to a high but not low dose of ethanol during early postnatal life increases the rate of loss of optic nerve axons and decreases the rate of myelination[J]. J Anat, 2000, 197(Pt 3): 477-485.

[9] Dai Y B, Tan X J, Wu W F, *et al*. Liver X receptor β protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(32): 13112-13117.

[10] Tenkova T, Young C, Dikranian K, *et al*. Ethanol-induced apoptosis in the developing visual system during synaptogenesis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(7): 2809-2817.

[11] Ohno Y, Nakanishi T, Umigai N, *et al*. Oral administration of crocetin prevents inner retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 690(1/3): 84-89.

[12] Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, *et al*. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2007(61): 736-759.

[13] Jamroz-Wisniewska A, Wojcicka G, Horoszewicz K, *et al*. Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2007(61): 760-785.

[14] Annicotte J S, Schoonjans K, Auwerx J. Expression of the liver X receptor alpha and beta in embryonic and adult mice[J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004, 277(2): 312-316.

[15] Mandrekar-Colucci S, Landreth G E. Nuclear receptors as therapeutic targets for Alzheimer's disease[J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(9): 1085-1097.

[16] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models[J]. Neuron, 2003, 39(6): 889-909.

[17] Zhao T T, Tian C Y, Yin Z Q. Activation of Muller cells occurs during retinal degeneration in RCS rats[J]. Adv Exp Med Biol, 2010(664): 575-583.

[18] Xue L P, Lu J, Cao Q, *et al*. Nestin expression in Muller glial cells in postnatal rat retina and its upregulation following optic nerve transection[J]. Neuroscience, 2006, 143(1): 117-127.

[19] Cui W, Sun Y, Wang Z, *et al*. Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice[J]. Neuroscience, 2012(210): 200-210.

[20] Bray J G, Reyes K C, Roberts A J, *et al*. Synaptic plasticity in the hippocampus shows resistance to acute ethanol exposure in transgenic mice with astrocyte-targeted enhanced CCL2 expression[J]. Neuropharmacology, 2012(67C): 115-125.

(**收稿**:2012-10-24;**修回**:2012-12-12)

(编辑 张 维)