

引文格式:李云,刘菲. Cyt C 和 Caspase 3 在 STZ 诱导糖尿病大鼠晶状体上皮细胞中的表达[J].

眼科新进展,2014,34(3):228-231. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0060

【实验研究】

Cyt C 和 Caspase 3 在 STZ 诱导糖尿病大鼠晶状体上皮细胞中的表达

李云 刘菲

作者简介:李云,女,1987年5月出生,江西南昌人,硕士。研究方向:糖尿病相关眼病的发病机制。联系电话:13870955693;E-mail:ly8610563@126.com

About LI Yun:Female,born in May,1987. Master degree. Research direction: pathogenesis of diabetes related eye diseases. Tel: 13870955693; E-mail: ly8610563@126.com

收稿日期:2013-10-18

修回日期:2013-11-29

本文编辑:方红玲

作者单位:330006 江西省南昌市,南昌大学第二附属医院眼科(李云,刘菲);330006 江西省南昌市,南昌大学附属眼科医院(李云)

通讯作者:刘菲,E-mail:liufei61@yahoo.cn

Received date:Oct 18,2013

Accepted date:Nov 29,2013

From the Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University (LI Yun, LIU Fei), Nanchang 330006, Jiangxi Province, China; Department of Ophthalmology, Affiliated Eye Hospital of Nanchang University (LI Yun), Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Responsible author: LIU Fei, E-mail: liufei61@yahoo.cn

may incite the release of Cyt C and activate Caspase 3 to induce the apoptosis of lens epithelial cells which results in cataract formation.

[Rec Adv Ophthalmol,2014,34(3):228-231]

Expression of Cyt C and Caspase 3 in lens epithelial cells of streptozotocin-induced diabetic rats

LI Yun, LIU Fei

【Key words】 lens epithelial cells;apoptosis;Cyt C;Caspase 3

【Abstract】 **Objective** To evaluate the expression of Cyt C and Caspase 3 in lens epithelial cells of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats, and provide new clues for studying the mechanism of diabetic cataract. **Methods** A total of 60 healthy SD male rats were randomly divided into control group and diabetic group, 30 in each group. The rats in diabetes group were intraperitoneal injected with STZ, and the control group with PBS. The changes of blood glucose were monitored and lens opacity was observed by slit lamp microscope every 4 weeks. Anterior lens capsule were sampled at the end of 12 weeks and the expression of Cyt C and Caspase 3 in lens epithelial cells was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The blood glucose of diabetic group was $(24.04 \pm 2.40) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and that of control group was $(5.13 \pm 0.37) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ at the end of 12 weeks. Slit-lamp examination showed that lens opacification was observed in diabetic group while the lens of control group was transparent at the end of 12 weeks. Immunohistochemistry data suggested that the expression of Cyt C and Caspase 3 in diabetic group was positive whereas the expression in control group was negative. Western blot indicated that the cytosolic contents of Cyt C in diabetic group (0.9280 ± 0.0297) were higher than that in control group (0.5250 ± 0.0258) , there was statistical difference ($P < 0.05$). And the mitochondrial contents of Cyt C in diabetic group (0.5105 ± 0.0264) were lower than the control group (0.8460 ± 0.0335) , there was statistical difference ($P < 0.05$). Besides, the expression level of Caspase 3 in diabetic group (0.9060 ± 0.0276) was significantly higher than that of control group (0.4305 ± 0.0252) , there was statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Cyt C is released from the mitochondria into the cytosol and the expression of Caspase 3 increase in lens epithelial cells of STZ-induced diabetic rats, indicating that high glucose may incite the release of Cyt C and activate Caspase 3 to induce the apoptosis of lens epithelial cells which results in cataract formation.

【关键词】 晶状体上皮细胞;细胞凋亡;Cyt C;Caspase 3

【摘要】 **目的** 研究 Cyt C 和 Caspase 3 在 STZ 诱导糖尿病大鼠晶状体上皮细胞(lens epithelial cells,LEC)中的表达,为糖尿病性白内障的发生机制提供新的线索。**方法** 60 只健康雄性 SD 大鼠分为实验组和对照组,每组各 30 只,实验组大鼠腹腔注射 STZ 溶液,对照组腹腔注射柠檬酸缓冲液。每 4 周监测大鼠血糖并用裂隙灯观察大鼠晶状体混浊情况,12 周末取大鼠晶状体前囊膜,应用免疫组织化学和 Western blot 检测 LEC 中 Cyt C 和 Caspase 3 的表达。**结果** 12 周末实验组大鼠空腹血糖为 $(24.04 \pm 2.40) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对照组为 $(5.13 \pm 0.37) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。裂隙灯观察显示实验过程中实验组大鼠晶状体出现混浊,而对照组大鼠晶状体均透明。免疫组织化学结果显示:实验组大鼠 LEC 中 Cyt C 和 Caspase 3 表达呈阳性,而对照组则为阴性。Western blot 结果显示实验组胞浆内 Cyt C 含量 (0.9280 ± 0.0297) 大幅度上升,远高于对照组 (0.5250 ± 0.0258) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而实验组大鼠线粒体内 Cyt C 含量 (0.5105 ± 0.0264) 则大幅度下降,远低于对照组 (0.8460 ± 0.0335) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);实验组大鼠 LEC 中 Caspase 3 的表达量 (0.9060 ± 0.0276) 明显高于对照组 (0.4305 ± 0.0252) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** STZ 诱导糖尿病大鼠 LEC 中 Cyt C 由线粒体释放入胞浆且 Caspase 3 表达量增加,高血糖可能通过刺激 LEC 释放 Cyt C 和激活 Caspase 3,诱导 LEC 凋亡从而形成白内障。

【眼科新进展,2014,34(3):228-231]

随着糖尿病发病率的上升及病程的延长,糖尿病患者发生各种慢性并发症日益增多。糖尿病性白内障已成为糖尿病并发症中仅次于视网膜病变的第二大眼病^[1],是导致糖尿病患者视力下降甚至失明的重要原因^[2]。研究发现,晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LEC)凋亡可能是各种非先天性白内障的共同细胞学基础,而 Cyt C 及 Caspase 3 在细胞凋亡中发挥了关键作用。本实验建立糖尿病动物模型,应用免疫组织化学方法和 Western blot 技术检测 LEC 中 Cyt C 及 Caspase 3 的表达情况,为糖尿病性白内障的发病机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和主要试剂 60 只 SD 大鼠购自南昌大学医学院动物科学部,均为雄性,体质量(180 ± 10)g。链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司;Cyt C 抗体、Caspase 3 (Ab-150)抗体及生物素标记兔抗大鼠 IgG 购自 Anbobio 公司;免疫组织化学试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司;线粒体提取试剂盒购自美国 Keygen 公司。

1.1.2 主要仪器 德国罗氏公司卓越型血糖仪,美国 Biorad 公司 ChemiDoc-It 化学发光成像分析系统及垂直电泳仪,德国 Eppendorf 低温超速离心机,日本奥林巴斯倒置光学显微镜、裂隙灯眼前段照相系统。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 60 只 8 周龄健康 SD 大鼠随机分为对照组和实验组,每组各 30 只。

1.2.2 动物模型制作 实验组:大鼠禁食 12 h,一次性腹腔注射 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ STZ 溶液(临用时用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 4.5 柠檬酸缓冲液配制,在 30 min 内注射完毕),剂量为 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,3 d 后在大鼠尾静脉采血检测血糖浓度,空腹血糖达到 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为糖尿病大鼠。不达标者待血糖恢复至正常后再常规剂量注射。若出现死鼠则需按样本量补足。对照组:给予腹腔注射等量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 4.5 柠檬酸缓冲液。

1.2.3 观测指标 造模后每 4 周取大鼠尾静脉血检测 2 组大鼠的空腹血糖浓度,并用裂隙灯观察 2 组大鼠晶状体的混浊情况。12 周末,对照组和实验组随机选取 10 只大鼠(共 20 眼),取晶状体前囊膜行免疫组织化学染色;另对照组和实验组随机选取 10 只大鼠(共 20 眼),取晶状体前囊膜行 Western blot 检测胞浆及线粒体内 Cyt C 的表达;剩余 10 只大鼠(共 20 眼)取晶状体前囊膜行 Western blot 检测 Caspase 3 的表达。

1.2.4 方法

1.2.4.1 免疫组织化学法检测 Cyt C、Caspase 3 的表达 12 周末颈椎脱臼法处死大鼠,完整取出双眼

球后娩出晶状体,用显微无齿镊撕取晶状体前囊膜,立即放入体积分数 4% 甲醛液中固定 24 ~ 48 h,制成 $4 \mu\text{m}$ 厚石蜡切片,应用免疫组织化学三步法检测 LEC 中 Cyt C、Caspase 3 的表达。一抗浓度均为 1 : 150,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.2.4.2 Western blot 检测 Cyt C 的表达 将晶状体前囊膜组织剪成细小碎片,按线粒体提取试剂盒说明书制备线粒体蛋白样品与胞浆蛋白样品,BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳完毕后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉封闭,用 Cyt C 抗体作用过夜,PBS 液洗脱后与兔抗鼠 IgG-过氧化物酶二抗结合,洗膜,ChemiDoc-It 化学发光成像分析系统显影成像。

1.2.4.3 Western blot 检测 Caspase 3 的表达 晶状体前囊膜组织碾磨成粉末,蛋白裂解液充分裂解后加入蛋白抽提剂,在 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,保留蛋白膜,滴加 1 mL 纯乙醇后,在 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件下离心 3 min,制备蛋白样品,应用 BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳完毕后蛋白转移至硝酸纤维素膜上, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉封闭,用 Caspase 3 抗体作用过夜,PBS 液洗脱后与兔抗鼠 IgG-过氧化物酶二抗结合,洗膜,ChemiDoc-It 化学发光成像分析系统显影成像。

1.3 结果判断 结果判断标准:胞浆中呈现棕黄色均匀着色,表明 Caspase 3 及 Cyt C 染色阳性。Western blot 定量分析通过 Quantity One 软件测定灰度值。

1.4 统计学分析 本实验数据以均数 \pm 标准差表示,使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。两样本均数比较采用两样本 t 检验,重复测量设计资料的统计分析采用单变量方差分析(ANOVA 法),重复测量数据不同时间点的两两比较采用 Bonferroni 分析进行。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖监测结果 大鼠模型制作 3 d 后,实验组大鼠空腹血糖为 $(22.24 \pm 2.50) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,达到成模标准,至 12 周末空腹血糖为 $(24.04 \pm 2.40) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在实验过程中无明显波动。对照组大鼠血糖实验开始时为 $(5.13 \pm 0.52) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,实验结束时为 $(5.13 \pm 0.37) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,波动始终处于正常水平。

2.2 裂隙灯检查结果 整个实验过程中,可观察到实验组大鼠晶状体出现混浊(图 1),对照组大鼠晶状体均透明(图 2)。

2.3 免疫组织化学检测结果 实验组大鼠晶状体囊膜中 Cyt C 和 Caspase 3 呈阳性表达(图 3-图 4),但是在对照组表达呈阴性(图 5-图 6)。

2.4 Western blot 检测结果

2.4.1 不同分组 Cyt C 的表达特点 实验组大鼠 LEC 线粒体 Cyt C 含量为 0.5105 ± 0.0264 ,对照组为 0.8460 ± 0.0335 ,2 组比较差异有统计学意义

($P<0.05$);实验组大鼠胞浆 Cyt C 含量为 $0.928\ 0\pm 0.029\ 7$,对照组为 $0.525\ 0\pm 0.025\ 8$,2 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组胞浆内 Cyt C 含量增多,线粒体内 Cyt C 减少,说明在 STZ 诱导糖尿病大鼠 LEC 中 Cyt C 发生了位置转移,由线粒体释放到胞浆中。

Figure 1 Lens was trubid in experimental group 实验组大鼠晶状体混浊

Figure 2 Lens was transparent in control group 对照组晶状体透明

Figure 3 Expression of Cyt C in experimental group(×400) 实验组 Cyt C 表达情况(×400)

2.4.2 不同分组 Caspase 3 的表达特点 本实验结果显示,实验组大鼠 LEC 中 Caspase 3 表达量为 $0.906\ 0\pm 0.027\ 6$,对照组表达量为 $0.430\ 5\pm 0.025\ 2$,2 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

Figure 4 Expression of Caspase 3 in experimental group(×400) 实验组 Caspase 3 表达情况(×400)

Figure 5 Expression of Cyt C in control group(×400) 对照组 Cyt C 表达情况(×400)

Figure 6 Expression of Caspase 3 in control group(×400) 对照组 Caspase 3 表达情况(×400)

3 讨论

糖尿病性白内障是糖尿病的主要慢性并发症之一^[1],其主要的临床表现为晶状体发生混浊导致视力下降甚至失明,主要病理学改变是 LEC 的异常增殖、迁移、分化引起前后囊下的纤维化、混浊^[2]。LEC 的凋亡可能是各种非先天性白内障的共同细胞学基础^[3]。大量研究表明,将人晶状体上皮细胞(HLEC)培养于含糖的培养基 24 h 后,细胞存活率显著下降,并能检测到细胞凋亡的发生^[4-6];Nambu 等^[7]在大鼠 LEC 中也观察到类似的结果。

Takamura^[8]在糖尿病动物模型亦发现 LEC 出现明显的凋亡特征。

由 Fas/FasL 介导的膜死亡受体通路和线粒体信号通路是细胞凋亡分子机制的关键信号转导通路。大量数据显示,线粒体不仅是真核细胞内主要的 ATP 生产中心,而且是调控细胞凋亡的中心环节。在凋亡信号的作用下,Bcl-2 促凋亡蛋白被激活,形成线粒体外膜通道,使线粒体通透性转换孔(MPTP)呈不可逆的高水平开放状态,线粒体通透性发生改变,位于线粒体膜间隙的 Cyt C 等凋亡信号分子被释放入胞浆,与 Apaf-1 和 Caspase 9 前体结合形成凋亡体,随后激活 Caspase 9,后者作为蛋白酶继续活化下游的凋亡效应分子 Caspase 3,激活 Caspase 级联反应,发生 DNA 片段化、染色质浓缩等特征性改变,最终导致不可逆的细胞死亡^[9-10]。

Caspase 是一类以无活性前体酶原(pro-caspase)的形式存在于细胞中的蛋白水解酶家族。细胞受到凋亡刺激时,Caspase 被激活并引发 Caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡^[11]。Caspase 3 是细胞凋亡的主要效应因子,并与细胞凋亡的形态变化紧密相关^[10]。Cyt C 是一种由核基因编码的水溶性蛋白,位于线粒体内膜外侧呼吸链复合物Ⅲ与Ⅳ之间,是电子传递链复合体中的一个组成部分,在呼吸链中起电子传递的作用。研究表明^[12],Cyt C 不仅参与线粒体的能量代谢过程,而且是线粒体介导的细胞凋亡途径中不可或缺的重要因子,在凋亡过程中起着关键作用。当细胞受到凋亡刺激时,Cyt C mRNA 表达上调,编码合成 Cyt C 增多,同时在凋亡刺激因子作用下,合成的 CytC 从线粒体释放入胞浆,激活 Caspase 级联反应导致细胞凋亡^[13]。

本实验结果说明,STZ-糖尿病大鼠 LEC 中 Cyt C

由线粒体内释放到了胞浆中,通过激活 Caspase 3 从而启动细胞凋亡,导致白内障的发生。

参考文献

- 1 Dedov I, Maslova O, Suntsov Y, Bolotskaia L, Milenkaia T, Besmertnaia L. Prevalence of diabetic retinopathy and cataract in adult patients with type 1 and type 2 diabetes in Russia[J]. *Rev Diabet Stud*, 2009, 6(2): 124-129.
- 2 Brian G, Taylor H. Cataract blindness—challenges for the 21st century[J]. *Bull World Health Organ*, 2001, 79(3): 249-256.
- 3 Li WC, Kuszak JR, Dunn K, Wang RR, Ma W, Wang GM, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals[J]. *J Cell Biol*, 1995, 130(1): 169-181.
- 4 Wu ZM, Yin XX, Ji L, Gao YY, Pan YM, Lu Q, et al. Ginkgo biloba extract prevents against apoptosis induced by high glucose in human lens epithelial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(9): 1042-1050.
- 5 Zhang Z, Yao K, Jin C. Apoptosis of lens epithelial cells induced by high concentration of glucose is associated with a decrease in caveolin-1 levels[J]. *Mol Vis*, 2009, 15(9): 2008-2017.
- 6 Kim YS, Kim NH, Lee YM, Kim JS. Preventive effect of chlorogenic acid on lens opacity and cytotoxicity in human lens epithelial cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(6): 925-928.
- 7 Nambu H, Kubo E, Takamura Y, Tsuzuki S, Tamura M, Akagi Y. Attenuation of aldose reductase gene suppresses high-glucose-induced apoptosis and oxidative stress in rat lens epithelial cells[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 82(1): 18-24.
- 8 Takamura Y. Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract[J]. *Exp Eye Res*, 2003, 77(1): 51-57.
- 9 Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 742-758.
- 10 莫镜, 崔其亮, 姚君, 张费通, 谭小华. 重组人白细胞介素-10 对缺氧条件下人微血管内皮细胞凋亡的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(14): 1107-1110.
- 11 Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome C release from mitochondria[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(9): 1423-1433.
- 12 Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, et al. Cytochrome C deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis[J]. *Cell*, 2000, 101(4): 389-399.
- 13 Larsen BD, Rampalli S, Burns LE, Brunette S, Dilworth FJ, Megeney LA. Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(9): 4230-4235.
- 14 周伟, 颜华, 靳春杰, 吴建国. 三七预防糖尿病视网膜微血管病变的实验研究[J]. 眼科新进展, 2013, 33(10): 914-917.
- 15 潘琳, 周水平, 蔡晓频, 彭俊云. 糖尿病大鼠视网膜血管铺片技术的改进及形态学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2001, 10(4): 456-458.
- 16 项晓人, 王坚, 朱荃. 视网膜毛细血管铺片制作技巧[J]. 临床与实验病理学杂志, 2002, 18(5): 564-565.
- 17 哈文静, 严宏, 张伟, 朱少君. 视网膜血管铺片技术的改进及在糖尿病视网膜病研究中的运用[J]. 国际眼科杂志, 2005, 5(6): 1139-1141.
- 18 崔彦, 许迅, 顾青. 改良的视网膜血管消化铺片联合共聚焦显微镜观察——视网膜血管的三维检查方法[J]. 眼科, 2006, 15(2): 138-141.
- 19 黎春怡, 黄卓烈, 张东方, 巫光宏, 初志战, 詹福建. 超声波和超临界流体对酶活性的影响[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 360-362.
- 20 黄卓烈, 陈小丽, 巫光宏, 朱国辉, 刘嘉儿. 超声波对胰蛋白酶活力影响的机理研究[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): 230-235.
- 21 Gharat N, Rathod VK. Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate[J]. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20(3): 900-905.

(上接第 227 页)

实验结果发现,超声波辅助胰蛋白酶消化,较摇床机械振荡方法,获得的理想铺片数量明显提高。一方面,超声波均匀提高了胰蛋白酶消化视网膜神经细胞的能力,避免了消化不足和消化过度的情况;另一方面,超声波又能形成机械振荡将神经细胞从血管网上分离出来,神经组织越少,大鼠视网膜血管网的展片就越容易,损失的血管网也越少。

总之,本研究提示超声波辅助胰蛋白酶的方法,可获得高质量的大鼠视网膜血管铺片,为进一步研究糖尿病视网膜病变的发病机制提供了稳定可靠的技术方法。

参考文献

- 1 Islam MS. Animal models of diabetic neuropathy: progress since 1960s[J]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013(18): 149452.
- 2 Yang Z, Li K, Yan X, Dong F, Zhao C. Amelioration of diabetic