

学校编码: 10384 密级

学号: 24520111153335

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

白血病抑制因子在大鼠急性和慢性青光眼
模型视网膜中的表达和意义研究

Expression of Leukemia Inhibitory Factor in the Rat Retina
of Acute and Chronic Glaucoma Models

胡倩倩

指导教师姓名: 吴仁毅 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2014年4月

论文答辩日期: 2014年5月

2014年 月

白血病抑制因子在大鼠实验性青光眼模型视网膜中的表达

姓名 胡倩倩

指导教师 吴仁毅 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的 研究白血病抑制因子(Leukemia inhibition factor, LIF)及其相关信号通路分子在急性和慢性高眼压大鼠视网膜中表达的动态变化,并初步探讨其意义。

方法 1.健康SD大鼠以前房灌注正常生理盐水的方法使眼压升高至70 mmHg,维持1 h。右眼作为正常对照。回复正常眼压后12h、24h、2 d、3 d和7 d处死动物。

2. 健康SD大鼠烧灼巩膜上静脉建立慢性高眼压模型,眼压升高后3 d、1 w、2 w、3 w、4 w处死动物。分别取上述模型动物的视网膜组织行TUNEL染色检测视网膜神经节细胞凋亡,以HE染色检测视网膜组织结构变化,透射电子显微镜下观察视网膜组织。取视网膜组织提取总蛋白及总RNA,以Western blot法检测视网膜中LIF、LIF-receptor (LIFR)及LIF下游信号通路分子signal transducers and transcription activators 3 (STAT3)、磷酸化STAT3 (P-STAT3)、serine-threonine kinase (Akt)、磷酸化Akt(P-Akt)、extracellular regulated protein kinases (ERK)和磷酸化ERK (P-ERK)蛋白表达水平,以Real-time PCR检测LIF和LIFR mRNA表达水平。

结果 1.与正常对照相比,HE染色结果显示随着时间延长,急性高眼压组视网膜内丛状层及内核层变薄,视神经节细胞数量逐渐减少;TUNEL染色结果显示急性高眼压组细胞凋亡数量显著增加,急性高眼压后24 h细胞凋亡数量最多。透射电镜结果显示再灌注后12 h及3 d,视网膜神经节细胞发生凋亡晚期表现,染色质浓缩、边集,线粒体空泡化,发生明显肿胀,再灌注后12 h凋亡细胞数量明显多于再灌注后3 d。与正常对照相比,急性高眼压组LIF蛋白表达上调,急性高眼压后12 h表达水平最高;LIFR蛋白表达水平于各时间点均高于正常对照组,且随时间延长逐渐升高。LIF mRNA表达水平上调,急性高眼压后12 h表达最高;LIFR mRNA在急性高眼压后表达上调,3 d时表达水平最高。下游信号通路分子蛋白STAT3、Akt及其磷酸化形式P-STAT3、P-Akt表达均高于对照组。急性高眼压组ERK表达无明显变化,P-ERK表达下调。

2. 与正常对照相比,HE染色结果显示慢性高眼压后视网膜内丛状层、外核层明显变薄,神经节细胞减少,细胞核大小不一,慢性高眼压后4 w视网膜神经纤维

层变薄。TUNEL 染色结果显示慢性高眼压组细胞凋亡数量明显增多。慢性高眼压后 LIF 蛋白表达上调，慢性高眼压后 2 w 表达最高；LIFR 蛋白表达水平高于正常对照组，慢性高眼压后 4 w 表达最高。LIF mRNA 表达明显上调，慢性高眼压后 3 d 表达最高，LIFR mRNA 表达显著高于正常对照组，并于 4 w 时达最高水平。下游信号分子蛋白 STAT3、Akt 及其磷酸化形式 P-STAT3、P-Akt 表达均高于对照组；与正常对照相比，慢性高眼压组 ERK 表达水平无明显变化，P-ERK 表达水平 2 w 时无明显变化，3 d、1 w、3 w 和 4 w 时表达下调。

结论 LIF 在急性及慢性高眼压大鼠视网膜中表达的动态变化，提示其可能参与了大鼠视网膜和视神经的损伤/保护过程，STAT3、P-STAT3、Akt、P-Akt 与 LIF 蛋白表达的一致性变化提示 LIF 可能是通过 JAK/STAT3 及 Akt 信号通路介导视网膜和视神经的损伤/保护过程。

关键词:白血病抑制因子； 急性高眼压； 慢性高眼压

Abstract

Purpose To investigate the expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and its downstream signaling pathways in the rat retina of experimental glaucoma model.

Methods 1.The acute ocular hypertension was established by infusing the anterior chamber with normal saline and the intraocular pressure(IOP) was elevated to 110 mmHg for an hour. The retinal tissues were obtained at 12 h, 24 h, 2 d, 3 d and 7 d after the ocular hypertension was ceased.

2.Chronic ocular hypertension was induced by episcleral vein cauterly. The retinal tissues were obtained at 3 d, 1 w, 2 w, 3 w and 4 w after chronic ocular hypertension was ceased.Hematoxylin and eosin (H&E) and TUNEL staining were conducted to assess the morphological change and the apoptosis of retinal cells, respectively. Transmission electron microscope was used to determine the presence of apoptic cells in the retina. The expression of LIF, LIF receptor (LIFR), STAT3, phosphorylated STAT3(P-STAT3), Akt, phosphorylated-Akt (P-Akt), ERK, phosphorylated ERK (P-ERK) was determined at different time points after ocular hypertension by western blot analysis. Quantitative real-time PCR was conducted to detect the expression of LIF and LIFR mRNA.

Results 1.At 12 h, 24 h, 2 d, 3 d and 7 d of reperfusion, the thickness of the inner nuclear layer and the inner plexiform layer was decreased and the cell arrangement of retinal ganglion cells (RGCs) and INL was irregular with a significant reduction in the RGC counting. Late apoptosis phenomenon characterized by chromatin condensation and margination, mitochondrial vacuolization and swelling occurred at 12 h and 3 d after acute ocular hypertension. Both the expression of LIF protein and mRNA were increased after acute ocular hypertension and reached the highest level at 12 h after retinal reperfusion. The LIFR protein and mRNA levels were both upregulated and peaked at 3 d after retinal reperfusion. At 12 h after retinal reperfusion, the levels of P-STAT3 and P-Akt were significantly higher than in the normal retina, while P-ERK was detected to be reduced since 12 h after the retinal reperfusion in the rat retina.

2.The thickness of the inner nuclear layer and the outer plexiform layer was decreased and the nucleus of (RGCs) were in different size with a significant reduction in the RGC counting. The thickness of retinal nerve fiber layer was significantly decreased at 4 w after chronic ocular hypertension compared with the normal retina. The number

of apoptosis cells were significantly increased after chronic ocular hypertension compared with normal retina. Both the expression of LIF protein and mRNA were increased after chronic ocular hypertension. The expression of LIF protein reached the highest level at 2 w after chronic ocular hypertension while the level of LIF mRNA reached the highest at 3 d after chronic ocular hypertension. The LIFR protein and mRNA levels were both upregulated and peaked at 4 w after chronic ocular hypertension. At 3 d after chronic ocular hypertension, the levels of P-STAT3 and P-Akt were significantly higher than in the normal retina. The expression of P-ERK was detected to be reduced in the rat retina at 3 d, 1 w, 3 w, 4 w after chronic ocular hypertension, while the expression of P-ERK at 2 w after chronic ocular hypertension has no significant difference with the normal retina.

Conclusion The change in the expression of LIF and LIFR after ocular hypertension suggests that LIF may probably play an important role in the process of retinal degeneration/protection induced by experimental glaucoma via the activation of JAK-STAT3 and Akt signaling pathways.

Keywords: leukemia inhibitory factor; acute ocular hypertension; chronic ocular hypertension

目录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 前言	1
1.1 青光眼性视神经节细胞损伤的病理生理	1
1.2 LIF 简介	4
1.2.1 LIF 基因和蛋白	5
1.2.2 LIF 的信号转导	6
1.2.2.1 JAK/STAT3 信号通路	6
1.2.2.2 Janus 激酶 (Janus-activated kinase)	6
1.2.2.3 STAT 家族	6
1.2.2.4 JAK/STAT 信号转导途径	7
1.2.2.5 JAK-STAT 信号通路 with 神经损伤	8
1.2.3 PI3K/Akt 信号通路及作用	9
1.2.3.1 PI3K	9
1.2.3.2 Akt	10
1.2.3.3 PI3K/Akt 信号通路 with 神经损伤	10
1.2.4 ERK 信号通路	10
第二章 材料与方法	12
2.1 实验材料	12
2.1.1 抗体	12
2.1.2 主要实验试剂	12
2.1.3 Realtime PCR 引物	13
2.1.4 主要实验仪器	13
2.2 实验方法	14
2.2.1 急性高眼压大鼠模型建立	14
2.2.2 慢性高眼压大鼠模型建立	15
2.2.3 眼压的测定	15
2.2.4 视网膜组织切片的制备	15
2.2.5 视网膜透射电镜标本的制备	16

2.2.5.1 透射电镜视网膜标本取材及前固定.....	16
2.2.5.2 视网膜透射电镜切片的制备.....	17
2.2.6 视网膜组织总蛋白的提取.....	18
2.2.7 视网膜组织总 RNA 提取.....	18
2.2.8 苏木素-伊红染色 (H&E 染色) 及原位末端转移酶标记技术 (TUNEL 染色).....	19
2.2.8.1 石蜡切片脱水.....	19
2.2.8.2 苏木素-伊红染色 (H&E 染色).....	19
2.2.8.3 原位末端转移酶标记技术 (TUNEL 染色).....	20
2.2.9 Realtime PCR 反应.....	21
2.2.9.1 逆转录.....	21
2.2.9.2 Realtime PCR.....	21
2.2.10 Western blot 免疫印迹分析.....	22
2.2.10.1 BCA 法检测蛋白浓度.....	22
2.2.10.2 Western Blot 免疫印迹分析.....	23
第三章 结果.....	26
3.1 LIF 在急性高眼压大鼠视网膜的表达.....	26
3.1.1 急性高眼压后视网膜组织结构变化.....	26
3.1.2 急性高眼压导致视网膜细胞凋亡.....	27
3.1.3 急性高眼压后视网膜 LIF 和 LIFR 表达量的变化.....	29
3.1.4 急性高眼压后 LIF 下游信号通路分子表达量的变化.....	31
3.2 LIF 在慢性高眼压大鼠视网膜的表达.....	33
3.2.1 巩膜上静脉烧灼后不同时间眼压测定结果.....	33
3.2.2 慢性高眼压后视网膜组织结构变化.....	34
3.2.3 慢性高眼压导致视网膜细胞凋亡.....	35
3.2.4 慢性高眼压大鼠视网膜 LIF 和 LIFR 表达量的变化.....	37
3.2.5 慢性高眼压后 LIF 下游信号通路分子表达量的变化.....	39
第四章讨论.....	41
第五章结论.....	46
参考文献.....	47
附录一.....	55
附录二.....	56

青光眼视神经保护的治疗现状及进展	56
致谢.....	66

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract (Chinese)	I
Abstract (English)	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Pathophysiology of Glaucomatous Damage	1
1.2 Introduction of LIF	4
1.2.1 The gene and protein of LIF	5
1.2.2 Signaling pathway of LIF	6
1.2.2.1 JAK/STAT3 signaling pathway.....	6
1.2.2.2 Janus-activated kinase.....	6
1.2.2.3 STAT family	6
1.2.2.4 JAK/STAT signaling pathway.....	7
1.2.2.5 JAK/STAT signaling pathway and neuropathy	8
1.2.3 PI3K/Akt signaling pathway	9
1.2.3.1 PI3K	9
1.2.3.2 Akt.....	10
1.2.3.3 PI3K/Akt signaling pathway.....	10
1.2.4 ERK signaling pathway	10
Chapter 2 Materials and Methods	12
2.1 Materials	12
2.1.1 Antibody	12
2.1.2 Experimental reagents.....	12
2.1.3 Primer of Realtime PCR	13
2.1.4 Experimental equipments.....	13
2.2 Methods	14
2.2.1 Establishment of rat acute ocular hypertension model	14
2.2.2 Establishment of rat chronic ocular hypertension model.....	15
2.2.3 Measure of intraocular pressure.....	15
2.2.4 Preparation of retinal tissue slices.....	15
2.2.5 Preparation of retinal tissue slices of transmission electron microscope....	16
2.2.5.1 Fixation of retinal tissues	16
2.2.5.2 Preparation of retinal tissue slices of transmission electron microscope	17
.....	17

2.2.6 Extraction of retinal tissue protein	18
2.2.7 Extraction of retinal tissue RNA	18
2.2.8 H&E and TUNEL staining.....	19
2.2.8.1 Dehydration.....	19
2.2.8.2 H&Estaining	19
2.2.8.3 TUNEL staining	20
2.2.9 Realtime PCR reaction.....	21
2.2.9.1 Reverse transcription	21
2.2.9.2 Realtime PCR.....	21
2.2.10 Western blot analysis	22
2.2.10.1 Bicinchoninic acid	22
2.2.10.2 Western Blot analysis.....	23
Chapter 3 Results	26
3.1 Expression of Leukemia Inhibition Factor in Rat Retina after Acute Ocular Hypertension	26
3.1.1 Change of retinal morphology after acute ocular hypertension.....	26
3.1.2 Apoptosis of the retinal cells induced by acute ocular hypertension.....	27
3.1.3 Expression of LIF and LIFR in the rat retina after acute ocular hypertension	29
3.1.4 Expression of downstream signaling pathway of LIFafter acute ocular hypertension.....	31
3.2 Expression of Leukemia Inhibition Factor in Rat Retina after ChronicOcular Hypertension	33
3.2.1 Measure of intraocular pressure.....	33
3.2.2 Change of retinal morphology after chronic ocular hypertension	34
3.2.3 Apoptosis of the retinal cells induced by chronic ocular hypertension	35
3.2.4 Expression of LIF and LIFR in the rat retina after chronic ocular hypertension.....	37
3.2.5 Expression of downstream signaling pathway of LIF after chronic ocular hypertension.....	39
Chapter 4 Disscussion.....	41
Chapter 5Conclusion	46
Reference	47
Appendix one.....	55
Appendix two.....	56

Current approaches and advances in neuroprotection of glaucoma	56
Acknowledgements	66

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

青光眼是全球第一位的不可逆性致盲眼病，世界卫生组织的统计数据表明 2010 年青光眼占全球视觉缺陷和致盲眼病的比率分别为 2 %和 8 %。在 1990 至 2010 年间由于全球老年人数量的增加导致因青光眼引起的致残率增加了一倍多^[1]。2010 年全球有 6000 多万人患青光眼，至 2020 年全球青光眼的患病人数将增加至 8000 万。

青光眼是一组由于多种因素导致的具有特征性视神经损害和视野缺损的眼病。眼压升高被认为是导致青光眼的最主要因素之一，临床上对青光眼的治疗主要是把眼压控制在正常范围内，以降低疾病加重的发展趋势。然而，临床实践表明，很多病人虽然有效的降低了眼压，但仍然存在视神经的损伤及视野丢失。一些病人的眼压虽然在正常范围内，却存在视神经损伤和视野缺损，这部分病人即为正常眼压性青光眼患者或低眼压性青光眼患者。越来越多证据表明，除了高眼压外青光眼还有其他发病因素。

现在的研究认为，尽管有多种可能的致病因素，青光眼性视神经损伤的最终共同通路被认为是视神经节细胞（retinal ganglion cell）的死亡。Quigley 等^[2]首先在灵长类动物实验性青光眼模型中发现了 RGC 凋亡，他们用 TUNEL 染色法检测实验性青光神经节细胞中的凋亡，发现实验性青光眼动物 RGC 细胞凋亡数量至少是对照组的 10 倍。LeVin 等发现 RGCs 的凋亡现象存在于前部缺血性视神经病变的眼中^[3]。因此，研究青光眼视神经损伤的病理生理，以阻断 RGCs 的凋亡，对于青光眼的预防及治疗具有重要意义。

1.1 青光眼性视神经节细胞损伤的病理生理

1.1.1 谷氨酸的兴奋性毒性

谷氨酸是中枢神经系统和视网膜神经传导的重要神经递质。谷氨酸浓度高于生理水平时对神经元产生毒性，毒性程度取决于浓度升高的程度及持续时间。谷氨酸介导的细胞毒性依赖于细胞外钙离子的流入，激活级联反应，导致神经元细胞死亡^[4]。

突触周围的 Müller 细胞和星形胶质细胞表达谷氨酸转运体，可以将细胞外的谷氨酸盐转进神经胶质细胞内。在神经胶质细胞内谷氨酰胺合成酶将谷氨酸转化为无毒的谷氨酰胺，谷氨酰胺被神经胶质细胞释放进入神经元细胞，并在其内被谷氨酰胺酶重新转化为谷氨酸。这个循环补充了神经递质并且避免了谷氨酸盐的毒性。

然而谷氨酸盐的毒性作用是对于压力升高和局部缺血的直接效应还是对于垂死的神经节细胞释放的谷氨酸的次级反应仍有待确定。虽然有大量的证据表明高剂量或持续性的谷氨酸作用可以通过离子型谷氨酸受体的过表达而促进 RGC 细胞的死亡^[5]。但在青光眼中谷氨酸的含量是否升高并没有一致的结论。

1.1.2 神经营养因子的减少

随着神经系统形成，产生的多余的神经元逐步通过细胞凋亡被清除。神经元的生长需要神经生长因子，这些神经生长因子是逆轴向运输的。这些被称为神经营养因子的生长因子调节细胞的新陈代谢从而保持正常的细胞周围环境^[6]。因此，由于逆神经轴突运输受阻而缺少神经营养因子的部位会导致 RGC 死亡。这组小的生长肽段包括大脑来源的神经营养因子 (BDNF)、神经生长因子 (NGF)、神经营养因子-3(NT-3)和神经营养因子-4 (NT-4)^[7,8]。有假设认为由于神经营养因子沿着成熟 RGC 轴突的逆向运输持续进行，因此 RGC 靶点分泌 NGF 和 BDNF 的减少对于成熟的 RGC 的存活几乎没有效果却可以导致成熟中的 RGC 的凋亡。因此，在青光眼中轴突运输障碍可导致神经营养因子的缺乏并导致神经元的死亡^[9]。

1.1.3 细胞凋亡

细胞凋亡是细胞死亡的普遍方式。它是一个精细的过程，细胞开始于一个死亡程序进而导致细胞萎缩，染色体断裂及细胞核固缩。另一方面，当细胞坏死时，细胞膜破裂导致细胞内容物流向细胞外基质，从而破坏并杀死其他细胞。细胞死亡过程的连续出现是两相的，并且对视神经损伤模型的研究阐明了 RGC 退化的快慢阶段^[10]。早期的退化过程即从第一到三天应该是细胞坏死然后是细胞凋亡。

现有研究认为在青光眼中机体的 RGC 轴突在视神经乳头处受到压迫，导致轴浆流被阻碍，从而导致靶源性神经营养因子的供应不足，引起细胞表面一些促凋亡受体如 p75NTR 的活化，进而导致细胞凋亡。由高眼压或低血流灌注压引起

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫