

## CNPase 在新生大鼠视网膜发育过程中的表达

唐茂丹, 陈伟伟, 查 皓, 袁 云, 李娟娟, 吴春云  
(昆明医科大学人体解剖学与组织胚胎学系, 云南 昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 研究 CNPase 在正常新生大鼠视网膜细胞动态发育过程中表达的变化. **方法** 随机将 15 只正常新生大鼠分为生后天数 (P) 1、3、5、7、14 d 5 个组 (P1, P3, P5, P7, P14, 每组 n=3), 经心腔灌注固定后摘取眼球进行冰冻切片; 应用免疫组织化学方法检测 CNPase 在新生大鼠视网膜细胞中表达的变化. **结果** 与 P3, P5, P7, P14 相比, P1 组视网膜 CNPase 阳性细胞数量增多, 贯穿于视网膜外成神经细胞层. 与 P1 相比, P3、P5 和 P7 组 CNPase 阳性细胞数量减少并向神经节细胞层靠近, 而且呈现递减的趋势. P14 组 CNPase 阳性细胞消失, 视网膜分层结构初步形成. **结论** CNPase 短暂表达于新生大鼠视网膜细胞, 提示其可能帮助诱导发育中的视网膜神经节细胞分化, 促进视网膜发育.

**[关键词]** 新生鼠; CNPase; 视网膜发育

**[中图分类号]** R339.14\*6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2013) 04-0016-04

## Expression of CNPase in the Developing Rat Retina

TANG Mao-dan, CHEN Wei-wei, ZHA Hao, YUAN Yun, LI JUAN-juan, WU Chun-yun  
(Dept. of Human Anatomy/Histology and Embryology, Kunming Medical University,  
Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To study morphological features and evolutionary progress of the 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the developing rat retina. **Methods** The eyes from normal neonatal rats, divided randomly into 5 groups including 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d (P1, P3, P5, P7, P14. n=3 in each group), were removed for conducting frozen sections. Immunohistochemical method was used to detect the expression of CNPase in the developing rat retina. **Results** In the developing rat retina of P1 group, CNPase was strongly expressed in the outer neuroblastic layer. Then CNPase decreased in P3 group, P5 and P7 groups. And it migrated to the ganglion cell layer and eventually disappeared in the 14d group. Retinal layered structure was preliminary formed. **Conclusion** CNPase transiently expresses in the developing retina of neonatal rats, suggesting that CNPase can promote the differentiation of retinal ganglion cell and promote retinal development.

**[Key words]** Neonatal Rats; 2', 3'-Cyclic-Nucleotide Phosphodiesterases; Retinal development

2', 3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶 (2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, CNPase) 是催化细胞中的 cAMP 生成 2'-AMP 的一种水解酶, 与中枢神经系统有着密切的关系. 有证据表明 CNPase 表达于多种类型的细胞如少突胶质细胞<sup>[1]</sup>、视网膜感光细胞<sup>[2]</sup>、海马神经元<sup>[3]</sup>、胚胎期的阿米巴样小胶质细胞<sup>[4]</sup>等. 但在中枢神经系统的视网膜

发育过程中, CNPase 表达的变化仍然不清楚. 本实验通过研究大鼠视网膜发育过程中 CNPase 表达的变化, 揭示 CNPase 对视网膜发育的影响.

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**[基金项目]** 云南省应用基础研究基金资助项目 (2009ZC097M); 云南省应用基础研究计划基金资助项目 (2011FB243)

**[作者简介]** 唐茂丹 (1985~), 女, 云南昆明市人, 在读硕士研究生, 主要从事视网膜疾病临床与研究工作.

**[通讯作者]** 吴春云. E-mail:wuchunyunkm@163.com

**1.1.1 实验动物** 健康新生 SD 大鼠 15 只, 雌雄不限, 新加坡国立大学实验动物中心提供. 所有实验操作遵循国际动物研究使用规范. 实验组中 15 只鼠分别取材于生后天数 (P) P1, P3, P5, P7 和 P14 (每组 3 只), 均用于视网膜矢状位免疫组织化学染色. 操作中尽量减少动物痛苦及意外致动物死亡.

**1.1.2 主要试剂** 鼠抗 CNPase 单克隆第一抗体购自 Chemicon 公司 (美国); 抗生物素蛋白-生物素化的辣根过氧化物酶浓缩型试剂盒购自 Vector Laboratories 公司 (美国).

## 1.2 方法

**1.2.1 标本的制备** 在每组大鼠定时用 35 g/L 水合氯醛或戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 用体积分数 2% 多聚甲醛经胸腔灌注固定后取眼球, 后固定 4 h, 20% 蔗糖溶液 4℃ 过夜, OCT 包埋后使用冰冻切片机 (Leica CM 3050) 制作大鼠眼球矢状位冰冻切片, 切片厚度为 20 μm, 切取部位出现视神经后随机取 5 片裱在明胶处理过的载玻片上. 自然风干后, 储存在 -20℃ 直到免疫组织化学染色.

**1.2.2 免疫组织化学染色和图像分析** 应用免疫组织化学生物素化过氧化物酶复合物 (ABC) 的方法进行组织染色. 0.1% Triton X-100+0.1 M PBS (pH=7.4) 洗涤 10 min; 0.3% 的过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性 15 min; 5% 正常马血清封闭液, 室温 1 h; 倾去血清, 用小鼠抗 CNPase 单克隆第一抗体 (1:300) 室温孵育过夜; 第二抗体 (生物素共轭的抗小鼠 IgG, 1:200,) 孵育 1 h, 随后由抗生物素蛋白-生物素化的辣根过氧化物酶 (1:100) 孵育 1 h; DAB 显色; 0.25% 甲基绿醋酸钠混合缓冲液 (pH = 4.8) 复染; 中性树胶封片. 激光共聚焦显微镜 (FV 1000, Olympus) 观察并采集图像. 应用 Image-pro plus 6.0 进行图像平均光密度分析和 CNPase 阳性细胞计数.

## 1.3 统计学处理

数据采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS 统计软件包秩和检验进行统计学处理,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,  $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 CNPase 平均光密度值数据分析

对 P1 组、P3 组、P5 组、P7 组、P14 组视网膜 CNPase 平均光密度进行数据分析, 结果提示与 P14 组的 CNPase 物质浓度相比, 其他组的 CNPase 物质浓度都要高, 见表 1. 各组阳性细胞计数 (图 1).

### 2.2 P1 组 CNPase 的表达

在大鼠视网膜 P1 组上 (图 2), 视网膜主要分为两层. 只有神经节细胞层出现分化, CNPase 阳性细胞 (棕色) 呈多边形表达于外成神经细胞层 (箭头所示), 与 P3, P5, P7, P14 相比, 阳性细胞增多, CNPase 表达明显增强.

### 2.3 P3 组 CNPase 的表达

在大鼠 P3 组 CNPase 阳性细胞减少, CNPase 表达降低, 并向神经细胞层迁移, 内层视网膜核层有分化的趋势 (图 3).

### 2.4 P5 组 CNPase 的表达

与 P3 组相比, 在大鼠 P5 组视网膜上 CNPase 阳性细胞减少更为明显 (图 4).

### 2.5 P7 组 CNPase 的表达

在大鼠 P7 组视网膜上, CNPase 阳性细胞数量减少, CNPase 在神经节细胞层附近弱阳性表达, 内层视网膜分化明显, 有分化出内丛状层的表现 (图 5).

### 2.6 P14 组 CNPase 的表达

在大鼠 P14 组视网膜上, CNPase 阳性细胞消失, CNPase 未见表达, 但是不断迁移的核层形成了初步的视网膜形态结构. 可辨认出的结构由内至外分别为: 神经节细胞层、内丛状层、内核层及外核层 (图 6).

表 1 正常新生大鼠视网膜 14 d CNPase 平均光密度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The result of the average optical density in CNPase in 14 days neonatal rat's retina ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	CNPase 平均光密度值
P1 d 组	3	0.35 ± 0.07**
P3 d 组	3	0.31 ± 0.08**
P5 d 组	3	0.30 ± 0.02**
P7 d 组	3	0.27 ± 0.04**
P14 d 组	3	0.00 ± 0.00

与 P14 d 组较, \*\* $P < 0.01$ .

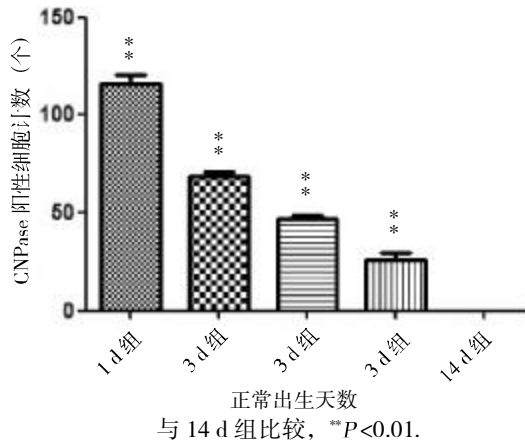


图 1 CNPase 阳性细胞在正常新生大鼠视网膜 14 d 的短暂表达

Fig. 1 The transient expression of CNPase positive cells in 14 days neonatal rat's retina

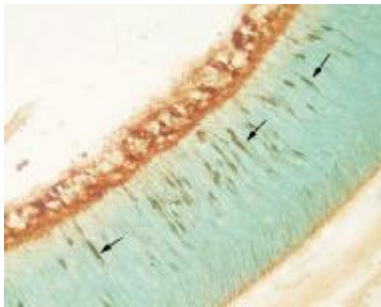


图 2 新生大鼠 P1 组视网膜, CNPase 阳性细胞贯穿于视网膜外成神经细胞层 (× 400)

Fig. 2 In P1 group, CNPase positive cells throughout the retinal outer neuroblastic layer (× 400)

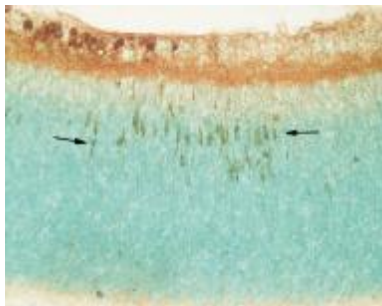


图 3 新生大鼠视网膜 P3 组, CNPase 阳性细胞减少并向神经节细胞层迁移 (× 400)

Fig. 3 In P3 group, the decrease in the number of CNPase positive cells and migrate to the ganglion cell layer (× 400)

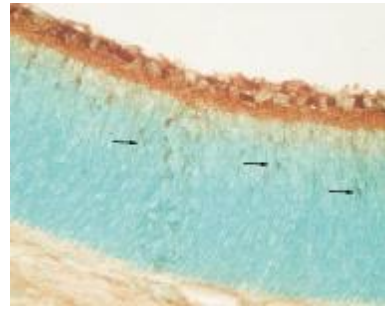


图 4 新生大鼠视网膜 P5 组, CNPase 阳性细胞减少 (× 400)

Fig. 4 In P5 group, the obvious decrease in the number of CNPase positive cells (× 400)

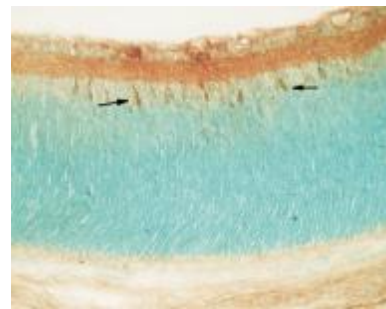


图 5 新生大鼠视网膜 P7 组, 可见很少量的 CNPase 阳性细胞, 内层视网膜已见分化 (× 400)

Fig. 5 In P7 group, the number of CNPase positive cells rarely observed and the differentiation of inner retina layer observed meanwhile (× 400)

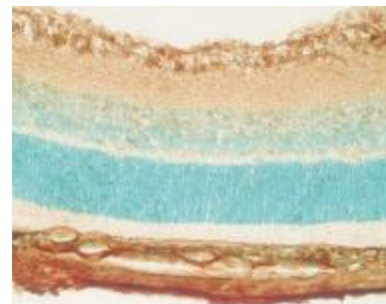


图 6 新生大鼠视网膜 P14 组, 未见 CNPase 阳性细胞. 不断迁移的核层形成了初步的视网膜形态结构 (× 400)

Fig. 6 In P14 group, the CNPase positive cells cannot be observed and the structure of initial retinal layer is formed (× 400)

### 3 讨论

视网膜是中枢神经系统的一部分,由多层细胞组成,其发育过程在中枢神经系统的发育中具有重要的代表性<sup>[5]</sup>。在其发育过程中,以视杯内层神经上皮为基础,逐步分化形成视网膜节细胞、无长突细胞、双极细胞和 Müller 细胞等细胞层结构,形成完整的视网膜结构<sup>[6]</sup>。研究表明,在多层视网膜细胞的分化过程中,多种因子参与了细胞分化的调控过程<sup>[7]</sup>。

CNPase 具有 N 末端结构和 C 末端的磷酸二酯酶活性, N 末端结构的功能不清楚, C 末端结构可催化 2', 3'-cAMP 生成 2'-AMP 和 3'-AMP。同时, CNPase 与蛋白质和细胞膜连接的异戊二烯化位点导致 CNPase 活性主要在细胞膜的表面<sup>[8]</sup>。CNPase 在髓磷脂中含量较多,是髓鞘的形成的一种重要的相关蛋白质,在少突胶质细胞的轴突生成具有关键作用<sup>[9]</sup>。研究发现,少突胶质细胞在中枢神经组织发育过程扮演重要的角色,普遍认为 CNPase 是少突胶质细胞的一个标志性蛋白,常常通过检测 CNPase 的表达确定少突胶质细胞的数量,从而研究中枢神经系统的发育过程。在大鼠脊髓发育过程中神经干细胞分化的研究中,出生 4 d 可检测到 CNPase 的阳性细胞,以后逐步减少<sup>[10]</sup>。但在视网膜的发育过程中, CNPase 未见报道,笔者的研究发现, P1 组视网膜 CNPase 阳性细胞数量增多,贯穿于视网膜外成神经细胞层。P3、P5 和 P7 组 CNPase 阳性细胞数量减少并向神经节细胞层靠近,而且呈现递减的趋势。P14 组 CNPase 阳性细胞消失,视网膜分层结构初步形成。结果提示, CNPase 可能帮助诱导发育中的视网膜神经节细胞分化,促进视网膜发育。

oligodendrocytes [J]. *J Neurochem*, 1983, 41 (2): 506 - 515.

- [2] KOHSAKA S, NISHIMURA Y, TAKAMATSU K, et al. Immunohistochemical localization of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and myelin basic protein in the chick retina [J]. *J Neurochem*, 1983, 41(2): 434 - 439.
- [3] CHO S J, JUNG J S, SHIN S C, et al. Nonspecific association of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase with the rat forebrain postsynaptic density fraction [J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35: 486 - 493.
- [4] WU C Y, J LU, Q CAO, et al. Expression of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the amoeboid microglial cells in the developing rat brain [J]. *Neuroscience*, 2006, 142(2): 333 - 341.
- [5] ZABOURI N, BOUCHARD J F, CASANOVA C. Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina [J]. *J Comp Neurol*, 2011, 519 (7): 1 258 - 1 280.
- [6] 陈裕庆, 刘少峰. Pax2 和 Sox2 及 Prox1 在胚胎小鼠眼发育中的表达模式 [J]. *国际眼科杂志*, 2012, 12(5): 819 - 822.
- [7] ZHANG X, SERB J M, GREENLEE M H. Mouse retinal development: a dark horse model for systems biology research [J]. *Bioinform Biol Insights*, 2011, 5: 99 - 113.
- [8] MYLLYKOSKI M, RAASAKKA A, HAN H, et al. Myelin 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: active-site ligand binding and molecular conformation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): 32 336.
- [9] MYLLYKOSKI M, ITOH K, KANGAS S M, et al. The N-terminal domain of the myelin enzyme 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: direct molecular interaction with the calcium sensor calmodulin [J]. *J Neurochem*, 2012, 123(4): 515 - 524.
- [10] 张皓, 云管英俊, 孙秀宁, 等. 大鼠脊髓发育过程中神经干细胞的分化 [J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(5): 60 - 62.

(2013-02-07 收稿)

#### [参考文献]

- [1] MCMORRIS F A. Cyclic AMP induction of the myelin enzyme 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in rat