

通窍活血方对体外培养的视网膜 Müller 细胞 在高压缺氧状态下谷氨酸摄取功能的影响^{*}

翟楠^{**} 秦伟^{***} 杨宇琦 陈一兵 王雪菁 王炜
刘春兰 张月 李懿 曾东兴 刘丹

(广州中医药大学附属中山医院, 广东 中山 528400)

摘要:目的 观察在高压缺氧条件下视网膜 Müller 细胞谷氨酸(Glu)摄取功能改变,以及通窍活血方对其影响。方法 体外纯化培养 7 天 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞至 P2 代;采用中药血清药理学方法制备通窍活血方含药血清;根据[3H]标记的 D,L-Glu 摄入量判断 Müller 细胞谷氨酸(Glu)摄入功能。结果 高压缺氧条件下 Müller 细胞谷氨酸(Glu)摄取功能明显下降($P<0.05$);通窍活血方含药血清可明显改善高压缺氧条件下 Müller 细胞谷氨酸(Glu)摄取功能($P<0.05$)。结论 通窍活血方含药血清可明显改善高压缺氧条件下 Müller 细胞谷氨酸(Glu)摄取功能,这可能是通窍活血复方对青光眼患者视神经保护的干预途径之一。

关键词:通窍活血;Müller 细胞;高压缺氧;谷氨酸

中图分类号: R 775 文献标识码: A 文章编号: 1002-168X(2015)06-0094-05

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.06.034

Effect of Tongqiao Huoxue Decoction on Glutamate Intakes of the Cultured Retinal Müller Cells under High Hypoxia

Zhai Nan, Qin Wei, Yang Yuqi, Chen Yibing, Wang Xuejing, Wang Wei,
Liu Chunlan, Zhang Yue, Li Yi, Zeng Dongxing, Liu Dan

(Zhongshan Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Tongqiao Huoxue Decoction on the altered glutamate intakes under the conditions of high pressure and hypoxia. **Methods:** SD rats and P2 generation of retinal Müller cells were produced by vitro purification culture of seven days; the medicinal serums of dredging orifices and activating blood circulation were prepared by serum pharmacology of Chinese medicine; the intake amount of L-Glu can be used to judge the absorbing function of Müller cells according to the labeled D by [3H]. **Results:** The absorbing function of glutamate (Glu) in Müller cells under the conditions of high pressure and hypoxia significantly decreased ($P<0.05$); Tongqiao Huoxue Decoction containing serum can significantly improve the absorbing function of glutamate (Glu) in Müller cells under the conditions of high pressure and hypoxia ($P<0.05$). **Conclusion:** Tongqiao Huoxue Decoction containing serum can significantly improve the absorbing function of glutamate (Glu) and it may be one of the herbal interventions for patients with glaucoma optic neuroprotective drug.

Keywords dredging orifices and activating blood circulation, Müller cells, hypoxia by high pressure, glutamate

^{*} 基金项目:广东省中医药管理局资助项目(20122046);广东省中山市科技局资助项目(20122A035);广东省中山市局资助项目(J2012062)

^{**} 作者简介:翟楠(1972-),女,陕西宝鸡人,副主任医师,研究方向:白内障青光眼诊治。E-mail:1472859179@qq.com.

^{***} 通讯作者:秦伟(1979-),男,山西长治人,副主任医师,博士,研究方向:眼底病防治。E-mail:1779405068@qq.com.

青光眼 (glaucoma) 是一组与病理性高眼压有关损害视神经影响视觉功能的临床症候群或眼病,致盲率极高,是世界第二大致盲性眼病^[1]。探讨青光眼患者视功能障碍的机理以及应对方法已是国内外眼科研究的热点之一。青光眼视神经损害有机械学说和血流学说两个传统学说。血流学说认为,视神经的缺血缺氧是高眼压之外青光眼视神经损害的另一致病因素。目前对高眼压下视网膜神经节细胞损害的研究较为广泛、深入,而对高眼压缺氧条件下视网膜胶质细胞损害及其与神经节细胞损害之间关系的研究较少。谷氨酸 (Glutamate Glu) 是视网膜重要的兴奋性神经递质,而同时 Glu 的异常大量聚集亦会使之成为神经毒素。视网膜各层均大量存在 Glu 受体, Glu 大量异常细胞外聚集可导致其靶细胞受损,而视网膜神经节细胞就是其最主要的侵害靶靶^[2]。有研究表明在缺血缺氧状态下可致 Müller 细胞的 Glu 运转功能障碍,由 Müller 细胞 Glu 摄取功能障碍引起的兴奋性神经毒性可能是造成视神经损伤的重要原因之一^[3]。故本文拟从高压缺氧状态下视网膜 Müller 细胞 Glu 运转功能障碍及通窍活血复方含药血清对其影响的角度对通窍活血中药复方对青光眼视神经保护机理进行研究,以期开拓青光眼视神经保护的新思路。

1 实验材料

1.1 实验动物 视网膜 Müller 细胞培养:实验用清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,新生 7 天,10 只,双眼未睁,雌雄不限;成都中医药大学-动物实验中心提供(生产合格证:SCXK(川)2008-011)。

制备通窍活血中药复方含药血清:标准实验用清洁级 Sprague-Dawley (SD) SD 大鼠 50 只,8-12 周龄,雌雄各半,体重 150-180 g,由成都中医药大学-动物实验中心提供(生产合格证:SCXK(川)2008-011)。

1.2 实验药物 通窍活血中药复方(石菖蒲、川芎、当归、丹参、郁金、桔梗)由成都中医药大学附属医院中药房提供。

1.3 实验试剂 连二亚硫酸钠(天津滨海科迪有限公司);GFAP 鉴定 I 抗兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),EnvisionTM (K500711) 兔/鼠通用型检测试剂盒(美国 DAKO 公司);Vimentin

鉴定 I 抗山羊多克隆抗体(美国 SANTA CRUZ 公司);GS 鉴定 I 抗兔多克隆抗体(美国 SANTA CRUZ 公司),II 抗生物素化羊克兔抗体(美国 SANTA CRUZ 公司);[3H]D,L-谷氨酸(中国科学院上海应用物理研究所)。

2 实验方法

2.1 大鼠视网膜 Müller 细胞体外纯化培养方法^[4-6] (1)新生 7 天 SD 大鼠 10 只,颈椎脱位法处死,75 % 医用酒精中浸泡 15 min,无菌条件下取眼球,含双抗 PBS 液反复冲洗三遍后置 DMEM 中,5 % CO₂、37 °C 培养箱中培养 12 h。

(2)无菌操作台移取 DMEM 液,再加入 0.25 % 胰蛋白酶 5 mL,消化后再置于同等条件培养箱中 60 min。

(3)无菌操作台吸除胰蛋白酶,加入含 20 % 胎牛血清 DMEM 液,消化中止。

(4)无菌操作台显微镜下沿角巩缘剪除角膜,剪除玻璃体及晶状体,尽量完整剥除视网膜。吸管轻轻吸取视网膜,放置于 10 mL 离心管中,反复吹打至乳糜状,接种于培养瓶中,72 h 后换液。

(5)传代培养:培养 5 d 见 Müller 细胞 80 % 融合贴壁生长,弃培养液,用含双抗 PBS 液反复冲洗培养瓶三遍,再加入 0.25 % 胰蛋白酶 5 mL,置培养瓶于同条件培养箱,消化 30 min,吸管轻轻反复吹打培养瓶壁,吸入预先装有 DMEM 液的 10 mL 离心管中,消化停止,1000 r/min 离心 10 分钟,吸除上清液。细胞计数板计数,调整细胞密度为 1×10^5 / mL,3 mL/瓶置于培养瓶,于同条件培养箱中继续培养。P2 代细胞为实验用细胞。

2.2 通窍活血中药复方含药血清制备方法

(1)在标准实验动物房喂养 50 只 SD 大鼠 7 天后随机分为两组:通窍活血中药含药血清组、空白对照组。

(2)通窍活血中药复方组,每日给予通窍活血中药复方含药血清浸膏 10.87 g/kg · d,连续灌胃 7 天,1 次/日。空白对照组给予等容量生理盐水灌胃。

(3)末次给药后 1 小时,腹膜下注射 0.1 % 戊巴比妥 1 mL,用自制固定板固定,5 mL 空针腹主动脉采血,置于 15 mL 离心管中,静置于 4 °C 冰箱 24 小时。

(4)24 小时后,离心分离血清;灭活,过滤除菌,分装,-20 ℃ 冰箱保存备用。通窍活血中药复方含药血清组与空白对照组所制备血清分别称为中药含药血清及空白血清。

2.3 视网膜 Müller 细胞的鉴定方法 蛋白胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acid protein,GFAP) 免疫组化染色鉴定:

(1)预置盖玻片的 6 孔培养板中原代 Müller 细胞生长接近融合,吸除培养液,PBS 液漂洗 2 次,加入 4 % 多聚甲醛 2 ml/孔,室温静置 10 min,固定细胞。

(2)固定完毕,吸除多聚甲醛,PBS 液漂洗 3 次,每次 3 min。

(3)滴加无水甲醇配置的新鲜 3 % H_2O_2 (30 % H_2O_2 : 无水甲醇 = 1 : 9) 2 ml/孔,室温孵育 10 min (灭活内源性酶),蒸馏水漂洗,PBS 液漂洗 10 min。

(4)滴加 I 抗 (兔多克隆抗体 GFAP 1 : 200 bs-0199R 博奥森生物技术有限公司),37 ℃ 孵育 45 min,PBS 液漂洗 10 min。

(5)滴加 EnVision™ 工作液,37 ℃ 孵育 45 min,PBS 液漂洗 10 min。

(6)滴加色源底物溶液 DAB,镜下控制显色。

(7)染色完毕,蒸馏水漂洗,苏木精复染,脱水,透明封固,镜下采片计数。

(8)同方法行 P1、P2 代 Müller 细胞 GFAP 染色鉴定。

波形蛋白 (Vimentin) 免疫组化染色鉴定:

(1)预置盖玻片的 6 孔培养板中原代 Müller 细胞生长接近融合,吸除培养液,PBS 液漂洗 2 次,加入 4 % 多聚甲醛 2 ml/孔,室温静置 10 min,固定细胞。

(2)固定完毕,吸除多聚甲醛,PBS 液漂洗 3 次,每次 3 min。

(3)滴加无水甲醇配置的新鲜 3 % H_2O_2 (30 % H_2O_2 : 无水甲醇 = 1 : 9) 2 ml/孔,室温孵育 10 min (灭活内源性酶),蒸馏水漂洗,PBS 液漂洗 10 min。

(4)滴加 I 抗 (山羊多克隆抗体 Vimentin 1 : 100 sc-7557 SANTA CRUZ),37 ℃ 孵育 45 min,PBS 液漂洗 10 min。

(5)滴加 PV-9003 试剂盒中的试剂 1 (工作

液),37 ℃ 孵育 20 min,PBS 液漂洗 10 min。

(6)滴加 PV-9003 试剂盒中的试剂 2 (工作液),37 ℃ 孵育 20 min。

(7)滴加色源底物溶液 DAB,镜下控制显色。

(8)染色完毕,蒸馏水漂洗,苏木精复染,脱水,透明封固,镜下采片计数。

(9)同方法行 P1、P2 代 Müller 细胞 Vimentin 染色鉴定。

谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase,GS) 免疫组化染色鉴定:

(1)预置盖玻片的 6 孔培养板中原代 Müller 细胞生长接近融合,吸除培养液,PBS 液漂洗 2 次,加入 4 % 多聚甲醛 2 ml/孔,室温静置 10 min,固定细胞。

(2)固定完毕,吸除多聚甲醛,PBS 液漂洗 3 次,每次 3 min。

(3)滴加无水甲醇配置的新鲜 3 % H_2O_2 (30 % H_2O_2 : 无水甲醇 = 1 : 9) 2 ml/孔,室温孵育 10 min (灭活内源性酶),蒸馏水漂洗,PBS 液漂洗 10 min。

(4)滴加 5 % 脱脂奶粉封闭液 2 ml,室温静置 20 min。

(5)滴加 I 抗 (兔多克隆抗体 GS 1 : 50 SC-9067 SANTA CRUZ),4 ℃ 过夜后在 37 ℃ 复温 45 分钟,TBST 液漂洗 3 次。

(6)滴加 II 抗 (Goat anti-rabbit IgG-HRP,1 : 2000,SC-2004 SANTA CRUZ),37 ℃ 孵育 1 小时,TBST 液漂洗 3 次。

(7)滴加试剂 SABC,室温静置 20 min,TBST 液漂洗 4 次。

(8)滴加色源底物溶液 DAB,镜下控制显色。

(9)染色完毕,蒸馏水漂洗,苏木精复染,脱水,透明封固,镜下采片计数。

(10)同方法行 P1、P2 代 Müller 细胞染色鉴定。

2.4 Glu 摄取量的测定^[7] 将 P2 代 Müller 细胞以 1×10^4 个/mL 的密度种植于 48 孔细胞培养板,5 % CO_2 37 ℃ 培养箱中培养 24 h;24 h 后移除含血清培养液,加入无血清培养液,5 % CO_2 37 ℃ 培养箱培养 24 h 后弃培养液,更换为各实验组培养条件培养液,5 % CO_2 37 ℃ 培养箱中继续培养 48 h,加 [3H]D,L-Glu (终浓度 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至培养液,孵育 15 min,冰冷生理盐水反复洗涤终止反应,再用

0.1 mol · L⁻¹NaOH 裂解细胞、离心收集上清液,用 β 液闪仪测定细胞对 [3H] D, L-Glu 摄取量。单位: [3H] DL-Glu10-10 mmol · min⁻¹ · mg⁻¹ Pro。样本做复管。考马斯亮兰法测定细胞蛋白质含量。

2.5 实验分组 正常对照组:含 20 % 空白血清的 DMEM 液。正常中药干预组:含 20 % 中药含药血清的 DMEM 液。高压缺氧 1 组:40 mmHg 下含 20 % 空白血清的 DMEM 液及终浓度为 1 mmol/L 的连二亚硫酸钠。中药干预高压缺氧 1 组:40 mmHg 含 20 % 中药含药血清的 DMEM 液及终浓度为 1 mmol/L 的连二亚硫酸钠。高压缺氧 2 组:60 mmHg 压力下含 20 % 空白血清的 DMEM 液及终浓度为 1 mmol/L 的连二亚硫酸钠。中药干预高压缺氧 2 组:60 mmHg 压力下含 20 % 中药含药血清的 DMEM 液及终浓度为 1 mmol/L 的连二亚硫酸钠。

2.6 统计学方法 SPSS15.0 统计软件包统计处理实验数据,统计方法采用单因素方差分析,各项检测结果均以 (均数±标准差) 表示。

3 实验结果

3.1 视网膜 Müller 细胞免疫组化染色鉴定结果

(1)GFAP 免疫组化染色鉴定:纯化培养原代视网膜 Müller 细胞,85 % 以上 GFAP 染色阳性,表现为胞浆内呈棕黄色的丝网状结构。P1 代与 P2 代细胞 90 % 以上 GFAP 染色阳性。

(2)Vimentin 免疫组化染色鉴定:纯化培养原代视网膜 Müller 细胞,85 % 以上 Vimentin 染色阳性,表现为细胞内大量颗粒样棕黄色阳性反应,以细胞核及其周围胞浆内多见。P1 代与 P2 代细胞 90 % 以上 Vimentin 染色阳性。

(3)GS 免疫组化染色鉴定:纯化培养原代视网膜 Müller 细胞,80 % 以上细胞 GS 染色阳性,表现为细胞核及细胞浆内明显大量棕色阳性反应,细胞周围可见稍浅的免疫阳性反应勾勒出的带有终足以及蹼形爪的扁平细胞轮廓,P1 代与 P2 代细胞 85 % 以上 GS 染色阳性。

3.2 通窍活血中药含药血清对正常条件、高压缺氧条件下体外纯化培养视网膜 Müller 细胞 Glu 摄取功能的影响 与正常对照组比较高压缺氧条件下 Müller 细胞谷氨酸 (Glu) 摄取功能明显下降,有统计学意义 ($P<0.05$);通窍活血中药复方含药血清可明显改善高压缺氧条件下 Müller 细胞谷氨酸

(Glu) 摄取功能,有统计学意义 ($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 通窍活血中药含药血清对正常条件、高压缺氧条件对体外纯化培养视网膜 Müller 细胞 Glu 摄取功能的影响

组别	n	Glu 摄取量
正常对照组	6	3.12±0.76
正常中药干预组	6	9.01±0.92 *
高压缺氧 1 组	6	1.22±0.63 *
中药干预高压缺氧 1 组	6	8.69±0.79 **
高压缺氧 2 组	6	1.17±0.32 *
中药干预高压缺氧 2 组	6	7.32±0.83 #

注:与正常对照组比较 * $P<0.05$;与高压缺氧 I 组比较 ** $P<0.05$;与高压缺氧 II 组比较 # $P<0.05$ 。

4 讨论

青光眼属中医的五风内障(青风、绿风、黄风、乌风、黑风)范畴。中医眼科认为肝肾与眼关系密切,肝藏血,而肝脉以本经上连目系,肝脉条达则肝所藏之血经肝经上输于目系,目系得养,则目视精明。正如《审视瑶函》所说:“血盛则玄府得通利,出入升降而明,虚则玄府不能出入升降而昏。”《医学纲目》亦云:“气血盛则玄府得利,出入升降而明,虚则玄府无以出入升降而昏”。目系“上属于脑”,而肾藏精,精生髓,脑为髓海,故肾精直接濡养目系,肾精充沛,则目系功能正常,髓海充满。正如清·王清任《医林改错·脑髓论》所云:“精汁之清者,化而为髓,由脊骨上行入脑,名曰脑髓,……两目即脑汁所生,两目系如线,长于脑,所见之物归于脑。”青光眼病变部位在瞳神和目系,多因五志过极,肝失条达,肝气郁结,脉络不畅,气滞血瘀;或年老体弱,精血亏耗,气虚血瘀,致闭塞玄府,神光无以发越而致视力、视野和视神经的病理性改变。故而气滞血瘀、气虚血瘀和玄府闭塞是青光眼导致视功能障碍的基本病机;故而益气活血、通窍明目、开启玄腑实为治本之法,治疗之要务。本研究选用石菖蒲、川芎、当归、丹参、郁金、桔梗组方,石菖蒲芳香通窍,宁心安神;当归补血活血;川芎血中之气药,行气活血;郁金凉血活血,行气开郁;丹参凉血活血,养血安神,诸药同用行血而不破血,补血而不滞血,散中有收,补中有散,与石菖蒲同用共济通窍活血之功,更得桔梗载药上行,直达病位。

视网膜组织中含有多种细胞成分,视网膜 Müller 细胞体外培养的关键问题就是如何通过简

洁准确的方法对视网膜 Müller 细胞进行纯化培养。Hicks^[7]证实由于视网膜神经元和其他胶质细胞的耐受性差易于受损,可以通过将完整鼠眼球浸入含抗生素的无血清 DMEM 中过夜的方法刺激 Müller 细胞的增殖,起到纯化的作用;此外用胰蛋白酶消化后的鼠眼球,视网膜很容易完全脱离,取材完整而方便。视网膜 Müller 细胞具有贴壁较其他细胞早,且较为紧密的特点,经过反复的实验摸索,本次试验将首次培养液换液时间定为 72 小时,换液过程中反复吹打培养瓶瓶壁,换液太早则贴壁细胞甚少,太晚则会有较多杂细胞和其他组织贴壁生长,纯化培养较为困难。两次传代后可获得纯化程度极高、细胞性能稳定、细胞形态理想的视网膜 Müller 细胞。视网膜 Müller 细胞是一种存在于视网膜中的特殊星形胶质细胞,胶质纤维酸性蛋白(GFAP)既存在于正常成熟星形胶质细胞中,又见于增生的星形胶质细胞中,随着星形胶质细胞的发育成熟而表达,可作为 Müller 细胞鉴定标志物之一^[8]。波形蛋白(Vimentin)是一种细胞骨架蛋白,存在于视网膜的 Müller 细胞中,常用于特异性的显示视网膜 Müller 细胞^[9]。谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)在视网膜中由 Müller 细胞合成,可以将神经递质谷氨酸转化为无活性的谷氨酰胺,从而减轻谷氨酸对视网膜的毒性,由于 GS 仅存在于视网膜的 Müller 细胞中,GS 可作为 Müller 细胞的特异性标志物^[8,10]。结合相关文献报道及前期实验结果,本次实验采用新生 7 天的 SD 大鼠作为材料来源,进行眼球培养前处理纯化传代培养 Müller 细胞,并将 P2 代 Müller 细胞作为研究对象。

Müller 细胞是视网膜中 Glu 代谢的主要场所,因此 Müller 细胞对 Glu 摄取功能的正常与否关系到视网膜内环境的稳定,对保护视网膜神经元免受 Glu 兴奋性神经毒性具有重要意义^[11]。Glu 受体广泛存在于视网膜各层,Glu 异常大量细胞外聚集可导致其靶细胞受损,而视网膜神经节细胞就是其最主要的侵害标靶。本研究结果表明高压缺氧条件下 Müller 细胞谷氨酸(Glu)摄取功能明显下降($P<0.05$),这就可能引起细胞外 Glu 的异常聚集并导致靶细胞视网膜神经节细胞的损害,从而引起青光眼患者视功能损害。而通窍活血中药复方含药血清可明显改善高压缺氧条件下 Müller

细胞谷氨酸(Glu)摄取功能($P<0.05$),这就表明通窍活血中药复方可明显改善高压缺氧条件下 Müller 细胞谷氨酸(Glu)摄取功能,减少 Glu 细胞外堆积,从而减轻靶细胞视网膜神经节细胞的损害,这可能是通窍活血复方对青光眼患者视神经保护的干预途径之一。鉴于 Müller 对 Glu 的摄取是一个较为复杂的过程,因此通窍活血中药复方究竟是通过什么途径改善高压缺氧状态下视网膜 Müller 对 Glu 的摄取功能的,笔者将在今后做进一步的研究。

参考文献

- [1] 葛坚. 眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,245.
- [2] Sucher N J, Uptan S A, Drey E B M, Molecular basic glutamate retinal ganglial cells [J]. Vision Res, 1998, 38 (10):1505.
- [3] Li Q, Puro D G. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(9):3109.
- [4] 李树宁, 王铮华, 白海青, 等. 改进的酶消化法培养新生大鼠视网膜 Müller 细胞 [J]. 眼科研究, 2005, 23(2): 155-157.
- [5] 黄敏丽, 陈维平, 何少健, 等. 大鼠视网膜 Müller 细胞的培养与鉴定 [J]. 广西医科大学学报, 2007, 24(2): 223-224.
- [6] 苟琳, 张作明, 许汉鹏, 等. 恒温摇动法纯化培养大鼠视网膜 Müller 细胞的技术研究 [J]. 眼科研究, 2002, 20 (5):411-413.
- [7] Hicks D, Courtois Y. The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro. An improved method for isolation and culture [J]. Exp Eye Res. 1990, 51(2):119-129.
- [8] 王芳, 赛音, 贺西格, 等. 大鼠 Müller 细胞的体外培养及免疫组织化学鉴定 [J]. 解剖学杂志, 2005, 28(5):599-601.
- [9] 沈伟哉, 郭国庆. 人胎视网膜超氧化物歧化酶和波形蛋白免疫阳性细胞的发育 [J]. 解剖学杂志, 2004, 24(4): 327-330.
- [10] Grosche J, Hartig W, Reichenbach A. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and β -2 protooncogene protein by Müller cell in retinal light damage of rats [J]. Neurosci Lett, 1995, 185 (2):119-122.
- [11] 谢学军, 李芳梅, 张梅, 等. 补肾活血法对 Müller 细胞谷氨酸摄取功能的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2008, 18(1):19-22.

(收稿日期:2015-04-29 编辑:文颖娟)