通窍活血方对体外培养的视网膜 Müller 细胞缺氧状态下谷氨酸摄取功能的影响

秦 伟 杨宇琦 翟 楠 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:观察在缺氧条件下视网膜 Müller 细胞谷氨酸(Glu)摄取功能的改变,以及通窍活血中药复方对这种改变的影响。方法:体外纯化培养 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞 7d 至 P2 代,分 6 组,分别采用空白血清、含药血清、空白血清与不同剂量连二亚硫酸钠、含药血清与不同剂量连二亚硫酸处理,测定视网膜 Müller 细胞在各实验条件下谷氨酸(Glu)摄取功能。结果:缺氧条件下 Müller 细胞 Glu 摄取功能较正常状态下明显下降($P<0.05$);与缺氧组比较,经通窍活血中药复方含药血清干预后缺氧条件下 Müller 细胞 Glu 摄取功能明显升高($P<0.05$)。结论:通窍活血中药复方含药血清可明显改善缺氧条件下 Müller 细胞 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药物干预途径之一。

关键词 中药复方 通窍活血 视网膜 Müller 细胞 谷氨酸 体外实验 SD大鼠
中图分类号 R289.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)01-0077-03

青光眼(glaucoma)是一组与病理性高眼压有关的,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,其中血流学说认为,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主要致病因素。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 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最主要的侵害标靶[2]。有研究表明,在缺血缺氧状态可致视网膜 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]。故本研究拟从缺氧状态下视网膜 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 供视网膜 Müller 细胞采集、培养用:实验用清洁级 Sprague-Dawley(SD)大鼠,新生 7d,10 只,双眼未睁,雌雄不限,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。制备通窍活血中药复方含药血清用:标准实验用清洁级 SD 大鼠 50 只,8~12 周龄,雌雄各半,体重 150~180g,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 药品与试剂 通窍活血中药复方(石菖蒲 15g,川芎 10g,当归 10g,丹参 10g,郁金 10g,桔梗 5g);连二亚硫酸钠(天津滨海科迪有限公司);谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase,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);[^{3}H]D,L-谷氨酸(中国科学院上海应用物理研究所)。

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)

2 实验方法

2.1 大鼠视网膜Müller细胞体外纯化培养方法 酶消化法获得体外纯化培养的大鼠视网膜Müller细胞，P2代细胞为实验用细胞[4-6]。

2.2 通窍活血中药复方含药血清制备方法 50只SD大鼠随机分为2组：通窍活血中药含药血清组、空白对照组。通窍活血中药含药血清组每日给予通窍活血中药复方含药血清浸膏10.87g/kg，连续灌胃7d，1次/d；空白对照组给予等容量生理盐水灌胃。末次给药后1h，腹膜下注射0.1%戊巴比妥1mL，用自制固定板固定，5mL空针腹主动脉采血，置于15mL离心管中，静置于4℃冰箱24h。24h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 谷氨酰胺合成酶(GS)免疫组化染色鉴定：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2mL/孔，室温静置10min，固定细胞；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45min，TBST液漂洗3次；滴加Ⅱ抗(Goat anti-rabbit IgG-HRP，1:2000，SC-2004 SANTA CRUZ)，37℃孵育1h，TBST液漂洗3次；滴加色源底物溶液DAB，镜下控制显色；苏木精复染，脱水，透明封固，镜下采片计数。同方法行P1、P2代Müller细胞染色鉴定。

2.4 实验分组 正常对照组：加入含20%空白血清的DMEM液；正常中药干预组：加入含20%中药含药血清的DMEM液；缺氧1组：加入含20%空白血清的DMEM液及终浓度为0.5mmol/L的连二亚硫酸钠；中药干预缺氧1组：加入含20%中药含药血清的DMEM液及终浓度为0.5mmol/L的连二亚硫酸钠；缺氧2组：加入含20%空白血清的DMEM液及终浓度为1mmol/L的连二亚硫酸钠；中药干预缺氧2组：加入含20%中药含药血清的DMEM液及终浓度为1mmol/L的连二亚硫酸钠。

2.5 Glu摄取量的测定 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，于5%$CO_2$37℃培养箱中培养24h；24h后移除含血清培养液，加入无血清培养液，5%$CO_2$37℃培养箱培养24h后弃培养液，更换为各实验组培养条件培养液，5%$CO_2$37℃培养箱中继续培养48h，加[^{3}H]D,L-Glu(终浓度1μml/L)至培养液，孵育15min，冰冷生理盐水反复洗涤终止反应，再用0.1mol/L NaOH裂解细胞，离心收集上清液，用β液闪仪测定细胞对[^{3}H]D,L-Glu的摄取量。单位：10^{-10}mmol·min^{-1}·mg^{-1}pro。样本做复管，考马斯亮蓝法测定细胞蛋白质含量。[9]

2.6 统计学方法 采用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($\bar{x}\pm s$)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 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质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 各组体外纯化培养视网膜Müller细胞Glu摄取功能比较 与正常对照组比较，缺氧条件下视网膜Müller细胞Glu摄取功能明显下降，差异有统计学意义($P<0.05$)；通窍活血中药复方含药血清可明显改善缺氧条件下视网膜Müller细胞Glu摄取功能，与同剂量缺氧组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表1。

表1 各组体外纯化培养视网膜Müller细胞Glu摄取功能比较 10^{-10}mmol·min^{-1}·mg^{-1}pro

组别	样本数	Glu摄取量
正常对照组	6	3.12±0.76
正常中药干预组	6	3.07±0.92*
缺氧1组	6	1.22±0.63*
中药干预缺氧1组	6	2.89±0.79※
缺氧2组	6	1.17±0.32*
中药干预缺氧2组	6	2.67±0.83#

注：与正常对照组比较，*$P<0.05$；与缺氧1组比较，※$P<0.05$；与缺氧2组比较，#$P<0.05$。

4 讨论

青光眼属中医学五风(青风、绿风、黄风、乌风、黑风)内障范畴。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。"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。王清任《医林改错·脑髓论》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，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。方中石菖蒲芳香通窍，宁心安神；当归补血活血；川芎为血中之气药，行气活血；郁金凉血活血，行气开郁；丹参凉血活血，养血安神。全方行血而不破血，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等[8]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Müllller细胞增殖，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，本试验将首次培养液换液时间定为72h，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。2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。谷氨酰胺合成酶(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[9]。本研究结果提示，本实验P1代与P2代视网膜Müller细胞85%以上GS染色阳性，达到体外细胞纯化培养要求。

本研究结果表明，缺氧条件下视网膜Müller细胞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缺氧条件下视网膜Müller细胞Glu摄取功能($P<0.05$)，表明通窍活血中药复方可减少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药物干预途径之一。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缺氧状态下视网膜Müller对Glu的摄取功能的，我们将在今后做进一步的研究。

参考文献

[1] 葛坚.眼科学[M].2版.北京：人民卫生出版社，2010：245.

[2] KAWASAKI A，OTORI Y，BARNSTABLE C J.Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity [J].Invest Ophthalmol Vis Sci，2000，41(11)：3444.

[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Müller细胞[J].眼科研究，2005，23(2)：155.

[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.

[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.

[7] 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)：20.

[8] HICKS D，COURTOIS Y. The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro 1. An improved method for isolation and culture[J].Exp Eye Res，1990，51(2)：119

[9] 王芳，赛音·贺西格，余振珏，等.大鼠Mlüler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.

第一作者：秦伟(1979—)，男，医学博士，副主任医师，研究方向为眼底病防治。

通讯作者：杨宇琦，医学博士，主治医师。1472859179@qq.com

收稿日期：2015-09-09

编辑：吴　宁