

P2X₇ 受体对缺氧诱发小鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响

郝旭红, 裴涌, 孙晓楠

基金项目:辽宁省自然科学基金(No. 2014020184)

作者单位:(110031)中国辽宁省沈阳市第四人民医院眼科

作者简介:郝旭红,主任医师,硕士研究生导师,病房副主任,研究方向:眼底病、青光眼、神经眼科。

通讯作者:郝旭红. syyhkh@163.com

收稿日期:2015-11-16 修回日期:2016-03-18

Effect of P2X₇ purinoceptor on hypoxia-induced apoptosis of retinal ganglion cells

Xu-Hong Hao, Yong Pei, Xiao-Nan Sun

Foundation item: Natural Science Foundation of Liaoning (No. 2014020184)

Department of Ophthalmology, Shenyang the Fourth Hospital of People, Shenyang 110031, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xu-Hong Hao. Department of Ophthalmology, Shenyang the Fourth Hospital of People, Shenyang 110031, Liaoning Province, China. syyhkh@163.com

Received: 2015-11-16 Accepted: 2016-03-18

Abstract

• AIM: To investigate the effect of P2X₇ on hypoxia-induced apoptosis of retinal ganglion cells in mice.

• METHODS: According to the different factors, retinal ganglion cells of the mouse were randomly divided into four groups: control group (G1), hypoxia group (G2), hypoxia + agonist (BzATP) group (G3), hypoxia + antagonistic agent (BBG) group (G4). Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to detect the survival rate of cells; the rate of cell apoptosis was determined by Annexin V/PI staining flow cytometry; Western Blot analysis was employed to detect the protein expression levels of cleave-caspase-3 and cleave-PARP.

• RESULTS: Compared with control group, the results significantly indicated the survival rate of cells decreased and the rate of apoptosis increased treated with hypoxia. In addition, the protein levels of cleave-caspase-3 and cleave-PARP were remarkably higher than the control group. BzATP markedly augmented the apoptosis induced by hypoxia, and BBG pretreatment observably decreased the hypoxia-induced apoptosis.

• CONCLUSION: P2X₇ purinoceptor could be activated by hypoxia, and participate in the apoptosis of retinal ganglion cells.

• KEYWORDS: P2X₇ purinoceptor; hypoxia; retinal ganglion cells; apoptosis

Citation: Hao XH, Pei Y, Sun XN. Effect of P2X₇ purinoceptor on hypoxia-induced apoptosis of retinal ganglion cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(4):622-624

摘要

目的:探讨嘌呤受体 P2X₇对缺氧诱发小鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响。

方法:以小鼠视网膜神经节细胞株 RGC-5 为研究对象,按照不同处理因素将细胞随机分为 4 组:正常对照组(G1)、缺氧组(G2)、缺氧+激动剂(BzATP)组(G3)、缺氧+拮抗剂(BBG)组(G4);采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞的存活率;用 Annexin V/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率;Western Blot 检测细胞内 cleave-caspase-3 和 cleave-PARP 蛋白的表达。

结果:与正常对照组相比,RGC-5 细胞经缺氧处理后,细胞存活率明显降低;凋亡率显著升高;细胞内 cleave-caspase-3 和 cleave-PARP 蛋白表达增加;P2X₇受体激动剂 BzATP 能明显加重缺氧诱发的细胞凋亡,而 BBG 预处理可以显著拮抗缺氧所致的细胞凋亡。

结论:缺氧能激活视网膜神经节细胞嘌呤受体 P2X₇,并参与视网膜神经节细胞的凋亡。

关键词:嘌呤受体 P2X₇;缺氧;视网膜神经节细胞;细胞凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.4.08

引用:郝旭红,裴涌,孙晓楠. P2X₇受体对缺氧诱发小鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志 2016;16(4):622-624

0 引言

视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)是位于视网膜最终段的神经细胞,其轴索为视神经纤维。缺血、缺氧导致 RGC 的凋亡,甚至死亡,是许多视网膜和视神经疾病发展到最后的必经之路,如糖尿病视网膜病变、青光眼、视网膜中央动脉阻塞等,因此研究缺氧诱发的 RGC 凋亡机制有可能找到治疗和预防视网膜和视神经疾病新的治疗方法,从而避免更多人丧失宝贵的视力。近年来,嘌呤和嘌呤受体作为重要的信号分子备受关注。P2X₇属于核苷酸 P2X 受体家族,P2X₇受体通道开放,可引起胞外信号的传导、引起相应的生物学效应,包括炎症反应、细胞凋亡和增殖等。研究表明,RGC 层中有 P2X₇受体的表达。本实验通过建立视网膜神经节细胞 RGC-5 缺氧模型,观察并探讨嘌呤受体 P2X₇对缺氧诱发 RGC 凋亡的影响,希望为预防和治疗 RGC 缺血、缺氧诱发的细胞凋亡提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠视网膜神经节细胞株 RGC-5,购自 ATCC。胎牛血清、DMEM 购自 Invitrogen 公司;BzATP、BBG、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、碱性磷酸酶标记的抗小鼠 IgG 购自 Sigma 公司;cleave-caspase-3、cleave-PARP、 β -actin 一抗购自 Santa Cruz 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 用 DMEM 培养基(含 10%

胎牛血清、青霉素、链霉素 100U/mL), 在 37°C、5% CO₂ 孵育箱内培养小鼠视网膜神经节细胞株 RGC-5, 3~4d 传代 1 次。将细胞随机分为 4 组, 正常对照组 (G1)、缺氧组 (G2)、缺氧+激动剂 (BzATP) 组 (G3)、缺氧+拮抗剂 (BBG) 组 (G4); 其中缺氧模式为将培养基更换为经缺氧处理(预先用氮气饱和)无糖、无血清培养基, 然后放入 37°C、95% N₂、5% CO₂ 三气培养箱中 6h, 之后更换含糖、含血清培养基, 置于 37°C、5% CO₂ 孵育箱内继续培养 4h。G3 组在缺氧处理的同时给予 100μmol/L BzATP; G4 组先给予 100nmol/L BBG 预处理 30min 后, 再给予缺氧处理。

1.2.2 MTT 法检测各组小鼠 RGC 细胞存活率 将细胞以 5×10³/孔接种到 96 孔细胞培养板中, 培养 24h 后, 按上述各分组处理方法处理细胞后, 终止培养, 每孔加入 MTT 20μL (浓度为 5g/L), 继续避光培养 4h, 终止培养, 小心弃上清, 加入 200μL DMSO 溶解 MTT, 在酶联免疫检测仪上测定波长为 490nm 处各孔的吸光度。

1.2.3 流式细胞仪检测各组小鼠 RGC 细胞凋亡情况 收集各组细胞, 调整细胞浓度为 1×10⁵/mL, 加入试剂盒中结合缓冲液 (Binding Buffer) 500μL 悬浮细胞。加入 5μL 的 Annexin V-FITC 染色液, 轻轻混匀, 于冰上避光条件孵育 15min, 然后加入 10μL PI 染色液后孵育 15min, 采用流式细胞仪计数 1×10⁴ 个细胞, 结果使用双变量流式细胞仪的散点图表示, 同时计算凋亡细胞率。

1.2.4 Western Blot 检测各组小鼠 RGC 中 cleave-PARP 和 cleave-caspase-3 蛋白的表达 细胞裂解液裂解细胞, 收集细胞, 超声处理, 离心, 上清液置于 -80°C 保存备用。应用 BCA 方法测定蛋白浓度。凝胶电泳, 转膜并采用特异性抗体进行 Western Blot 分析, cleave-PARP 和 cleave-caspase-3 (1:1000), β-actin (1:1000)。二抗: 碱性磷酸酶标记的抗小鼠 IgG (1:1000)。采用凝胶成像分析系统分析和计算蛋白的灰度值, 以目的条带与内参 β-actin 的平均灰度值的比值表示蛋白水平, 进行半定量分析。

统计学分析: 应用 Graphpad Prism 5 统计软件进行统计学分析。所有数据用平均值±标准误表示。组间比较采用单因素方差分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。
2 结果

2.1 各组小鼠 RGC 细胞存活率 应用 MTT 法检测 RGC-5 细胞存活率, 各组细胞存活百分率分别为: G1 组 (100.00±2.13)%、G2 组 (57.14±3.07)%、G3 组 (42.16±2.61)%、G4 组 (74.56±2.98)%。与 G1 组相比, G2、G3 和 G4 组的 RGC-5 细胞存活率显著降低 (P<0.05); 经 100μmol/L BzATP 与缺氧共同处理 RGC-5 细胞后, 与 G2 组相比, 细胞存活率明显降低 (P<0.05); 而 100nmol/L BBG 预处理细胞后, 与 G2 组相比, 细胞 RGC-5 存活率显著提高 (P<0.05, 图 1)。

2.2 各组小鼠 RGC 细胞凋亡情况 应用流式细胞仪检测 RGC-5 细胞凋亡率, 各组细胞凋亡率分别为: G1 组 (12.25±2.50)%、G2 组 (48.00±4.55)%、G3 组 (59.05±2.10)%、G4 组 (37.5±5.20)%。与正常对照组相比, G2、G3 和 G4 组的 RGC-5 细胞均出现明显的细胞凋亡 (P<0.05); 其中缺氧+激动剂组的细胞凋亡率最高, 与缺氧组相比, 有统计学差异 (P<0.05); 缺氧+拮抗剂组的细胞凋亡率, 与单纯缺氧组相比, 明显下降 (P<0.05), 但仍高于正常对照组 (图 2~3)。

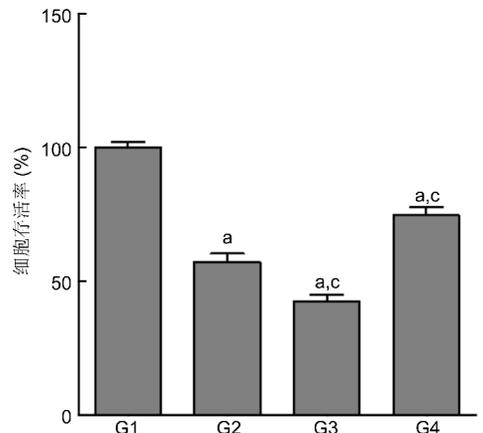


图 1 各组小鼠视网膜神经节细胞 RGC-5 存活率情况 ^aP<0.05 vs G1 组; ^cP<0.05 vs G2 组; G1: 正常对照组; G2: 缺氧组; G3: 缺氧+激动剂 (BzATP) 组; G4: 缺氧+拮抗剂 (BBG) 组。

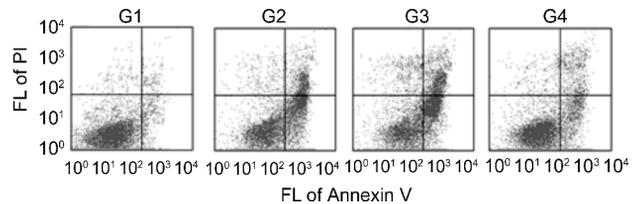


图 2 各组小鼠视网膜神经节细胞 RGC-5 凋亡情况 G1: 正常对照组; G2: 缺氧组; G3: 缺氧+激动剂 (BzATP) 组; G4: 缺氧+拮抗剂 (BBG) 组。

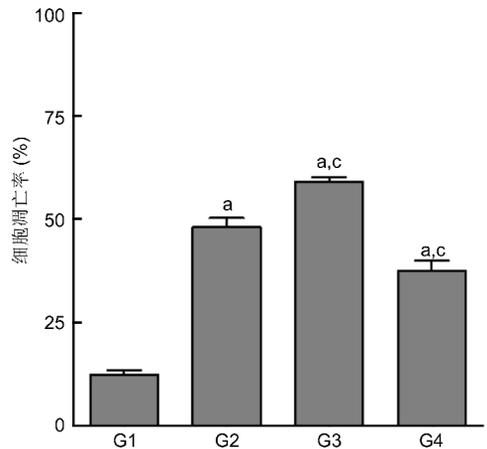


图 3 各组小鼠视网膜神经节细胞 RGC-5 凋亡率 ^aP<0.05 vs G1 组; ^cP<0.05 vs G2 组; G1: 正常对照组; G2: 缺氧组; G3: 缺氧+激动剂 (BzATP) 组; G4: 缺氧+拮抗剂 (BBG) 组。

2.3 各组小鼠 RGC 中 cleave-PARP 和 cleave-caspase-3 蛋白的表达 Western Blot 检测视网膜神经节 RGC-5 细胞内 cleaved-PARP 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达, 各组 cleaved-PARP/β-actin 相对灰度值分别为: G1 组 0.20±0.03, G2 组 0.62±0.03, G3 组 0.78±0.02, G4 组 0.46±0.05; 各组 cleaved-caspase-3/β-actin 相对灰度值分别为: G1 组 0.21±0.03, G2 组 0.49±0.04, G3 组 0.66±0.04, G4 组 0.36±0.06。与 G1 组相比, G2、G3 和 G4 组的 cleaved-PARP 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达均显著升高 (P<0.05); 其中 G3 组 cleaved-PARP 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达最多, 而 G4 组在 P2X₇ 拮抗剂的作用下, 使 cleaved-PARP 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达明显低于 G2 组 (P<0.05), 但仍高于 G1 组 (图 4~6)。

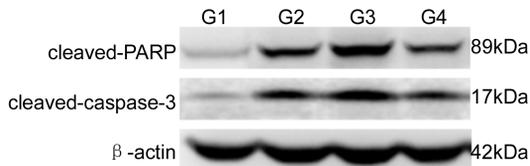


图4 各组小鼠视网膜神经节细胞 RGC-5 中 cleaved-PARP 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达 G1: 正常对照组; G2: 缺氧组; G3: 缺氧+激动剂 (BzATP) 组; G4: 缺氧+拮抗剂 (BBG) 组。

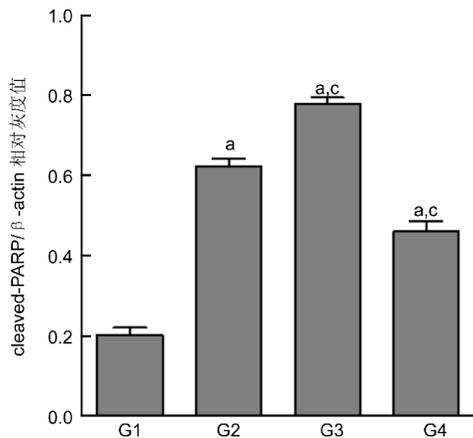


图5 各组小鼠视网膜神经节细胞 RGC-5 中 cleaved-PARP 蛋白表达 ^a*P*<0.05 vs G1 组; ^c*P*<0.05 vs G2 组。

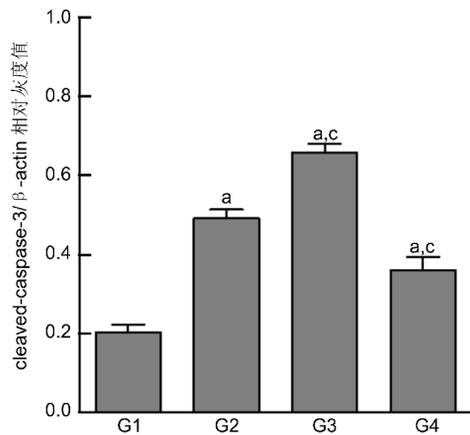


图6 各组小鼠视网膜神经节细胞 RGC-5 中 cleaved-caspase-3 蛋白表达 ^a*P*<0.05 vs G1 组; ^c*P*<0.05 vs G2 组。

3 讨论

嘌呤受体 (purinoceptor, P 受体) 分为 P1 和 P2 两类。其中 P2 受体主要由核苷酸激活, 包括 P2X 和 P2Y 两大家族。P2X 家族属配体门控离子通道, 包括 7 种亚型, 即 P2X₁₋₇。其中 P2X₇ 受体与其它 P2X 受体亚型显著不同, 在低浓度激动剂刺激下可以引起非选择性单价和多价阳离子通道开放, 允许 K⁺、Na⁺、Ca²⁺ 等阳离子跨膜流动, 而 Ca²⁺ 大量内流可引发细胞的凋亡; 在重复或者长时间 P2X₇ 激活时, P2X₇ 受体通道逐渐扩大, 可增至 3nm 孔洞, 对各种阳离子包括分子质量达 900Da 的有机阳离子通透, 从而导致细胞凋亡^[1], 因此 P2X₇ 是一种重要的凋亡受体。P2X₇ 受体在体内的分布极为广泛, 视网膜内、外层神经元有多种类型 P2X 受体表达, 其中 P2X₇ 受体主要分布在 RGCs 层^[2-3]。近年来研究发现 P2X₇ 受体与视网膜的功能密切相关, 例如在玻璃体视网膜病变中, P2X₇ 受体的表达增加; 受体的激活可引起视网膜周细胞收缩等^[4-5]。ATP 是 P2X₇ 受体的天然激动剂, 但与 P2X₇ 受体亲和力比较低。2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) 是 P2X₇ 受

体最强的激动剂, 与 P2X₇ 受体的亲和力是 ATP 的 10 ~ 100 倍^[6]; P2X₇ 受体拮抗剂包括 Brilliant Blue G (BBG)、oxidized ATP (oxATP)、A-438079 等, 其中 BBG 在 nmol/L 浓度水平即选择性拮抗 P2X₇ 受体^[7-8]。RGC 是视网膜最终端的神经元, 在视觉信息的整合和传递中至关重要。缺血、缺氧会导致 RGC 损伤、变性和凋亡, 最终引起视觉功能丧失^[9-10], 是许多视网膜和视神经疾病发展到最后的必经之路, 如糖尿病视网膜病变、青光眼、视网膜中央动脉阻塞等, 因此研究缺氧诱发的 RGC 细胞凋亡机制有可能找到治疗预防视网膜和视神经疾病新的治疗方法, 从而避免更多人丧失宝贵的视力。基于上述, 我们观察了嘌呤受体 P2X₇ 对缺氧诱发 RGC 凋亡中的影响, 首先, 缺氧处理视网膜神经节细胞株 RGC-5, MTT 检测细胞存活率、流式细胞仪检测细胞的凋亡率及 Western Blot 检测细胞内 cleaved-PARP 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达, 其中 caspase-3 为 caspase 家族重要成员, 是细胞凋亡蛋白级联反应的必经之路, 而 PARP 是 caspase-3 主要底物, 两者在细胞凋亡中起到重要作用。实验结果显示, 与正常对照组相比, 缺氧可以使 RGC-5 细胞的存活率明显降低, 凋亡率显著升高, cleaved-PARP 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达均显著升高 (*P*<0.05), 这些结果表明, 缺氧可以诱发生物膜神经节细胞 RGC-5 发生凋亡。为了进一步检测 P2X₇ 受体是否参与缺氧导致的 RGC-5 细胞凋亡, 分别用受体的激动剂 BzATP 和拮抗剂 BBG 处理细胞, 实验结果表明, P2X₇ 受体激动剂 BzATP 能明显加重缺氧诱发的细胞凋亡, 而 BBG 预处理可以显著拮抗缺氧所致的细胞凋亡。这些实验结果证明缺氧能激活 RGC 嘌呤受体 P2X₇, 并参与 RGC 的凋亡。但 P2X₇ 受体通过何种机制参与 RGC 的凋亡尚需进行下一步实验深入探讨。

参考文献

- 1 Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi E, Hausmann R, et al. Molecular and functional properties of P2X receptors - recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal* 2012;8(3):375-417
- 2 Wheeler-Schilling TH, Marquardt K, Kohler K, et al. Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. *Biomed Brain Res Mol Brain Res* 2001;92(1-2):177-180
- 3 Mitchell CH, Lu W, Hu H, et al. The P2X7 receptor in retinal ganglion cells: A neuronal model of pressure-induced damage and protection by a shifting purinergic balance. *Purinergic Signal* 2009;5(2):241-249
- 4 Bringmann A, Pannicke T, Moll V, et al. Upregulation of P2X (7) receptor currents in Müller glial cells during proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(3):860-867
- 5 Kawamura H, Sugiyama T, Wu DM, et al. ATP: a vasoactive signal in the pericyte - containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol* 2003;551(Pt 3):787-799
- 6 Young MT, Pelegrin P, Surprenant A. Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol* 2007;71(1):92-100
- 7 Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 2007;151(5):571-579
- 8 Michel AD, Chambers LJ, Clay WC, et al. Direct labelling of the human P2X7 receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding. *Br J Pharmacol* 2007;151(1):103-114
- 9 Cao Y, Li X, Wang CJ, et al. Role of NF-E2-related factor 2 in neuroprotective effect of l-carnitine against high glucose-induced oxidative stress in the retinal ganglion cells. *Biomed Pharmacother* 2015;69:345-348
- 10 Chen YJ, Huang YS, Chen JT, et al. Protective effects of glucosamine on oxidative-stress and ischemia/reperfusion-induced retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(3):1506-1516