

染料木素对体外培养的牛眼小梁细胞[Ca²⁺]_i的影响

陆慧琴¹, 马强¹, 张德秀², 梁厚成¹

作者单位:¹(710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科;
²(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学第一医院眼科
作者简介:陆慧琴, 眼科硕士, 主治医师, 研究方向:青光眼、白内障。

通讯作者:陆慧琴. 189159@sina. com. cn

收稿日期:2011-02-22 修回日期:2011-05-03

Influence of genistein on [Ca²⁺]_i in cultured bovine trabecular meshwork cells *in vitro*

Hui-Qin Lu¹, Qiang Ma¹, De-Xiu Zhang², Hou-Cheng Liang¹

¹Department of Ophthalmology, First Hospital of Xi'an, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hui-Qin Lu. Department of Ophthalmology, First Hospital of Xi'an, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. 189159@sina. com. cn

Received:2011-02-22 Accepted:2011-05-03

Abstract

• AIM: To determine the change of intracellular free Ca²⁺ in trabecular meshwork cells (TMC) under the influence of genistein (Gen) through laser scanning confocal microscopy (LSCM).

• METHODS: TMC were obtained through the method of tissue cultured. Loaded with Fluo-3/AM, the value of [Ca²⁺]_i was obtained by dynamically scanning changes of intracellular fluorescent intensity after application of genistein with different density.

• RESULTS: The application of genistein (10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ mol/L, final concentration) led to an decrease in [Ca²⁺]_i and especially 10⁻⁵ mol/L genistein led to a significant decrease in [Ca²⁺]_i: from 328.62 ± 16.77 to 309.69 ± 16.57 (n = 8, P < 0.05).

• CONCLUSION: Genistein with a certain density may decrease the resistance to the outflow of aqueous by relaxing TMC and lead to an decrease of IOP.

• KEYWORDS: trabecular meshwork cells; genistein; [Ca²⁺]_i; LSCM

Lu HQ, Ma Q, Zhang DX, *et al.* Influence of genistein on [Ca²⁺]_i in cultured bovine trabecular meshwork cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(6):964-965

摘要

目的:在激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)下测定小梁细胞经染料木素(genistein, Gen)作用后钙离子浓度([Ca²⁺]_i)的变化。

方法:运用组织块培养法获得三代牛眼小梁细胞,Fluo-3/AM负载后,于LSCM下动态扫描不同浓度Gen作用后胞内荧光强度变化,得出[Ca²⁺]_i值。

结果:10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ mol/L Gen可使小梁细胞[Ca²⁺]_i呈剂量依赖性降低,其中10⁻⁵ mol/L Gen可使小梁细胞[Ca²⁺]_i由328.62 ± 16.77 nmol/L减少至309.69 ± 16.57 nmol/L (n = 8, P < 0.05)。

结论:Gen可通过松弛小梁网而致房水流出阻力减小、眼压下降。

关键词:小梁细胞;染料木素;胞内钙离子浓度;激光扫描共聚焦显微镜

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.06.008

陆慧琴,马强,张德秀,等.染料木素对体外培养的牛眼小梁细胞[Ca²⁺]_i的影响.国际眼科杂志2011;11(6):964-965

0 引言

染料木素(genistein, Gen)是来源于豆类植物的异黄酮类化合物,化学名为4,5,7-三羟基异黄酮,是一种广谱的蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)抑制剂,PTK可能通过调节电压依赖性Ca²⁺通道而参与收缩功能的调节^[1]。Gen作为其非特异性的抑制剂而发挥抑制平滑肌收缩的作用。研究表明Gen可将卡巴可对小梁细胞的收缩作用减弱约50%^[2],而国内尚未见有关Gen在青光眼方面作用的报道。我们运用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)测定Gen作用前后小梁细胞内钙离子浓度([Ca²⁺]_i)的变化,以了解Gen对体外培养的牛眼小梁细胞内[Ca²⁺]_i的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM高糖培养基(Gibco),Gen(Sigma),小牛血清(杭州四季清),Fluo-3/AM,LSCM,Bio-Rad Mrc-1024由第四军医大学电镜室提供。从屠宰场取新鲜小牛眼(牛龄<24mo),置于盛有冰袋的保温盒中迅速运回实验室。显微镜下分离小梁组织,用含150mL/L小牛血清的DMEM培养液进行组织块培养,待原代细胞多处融合时进行传代,对传三代细胞行免疫组化特性检验。实验所培养细胞神经特异性烯醇化酶(NSE)表达阳性,表达波形蛋白(Vimentin),不表达第VIII因子相关抗原(VIII:Ag),证实所培养小梁细胞的神经嵴间充质起源。结合所培养细胞的生长过程、形态学观察证明,本实验所培养细胞为眼小梁细胞。

1.2 方法 取传二代小梁细胞经消化离心后接种于LSCM

专用培养皿中,待细胞贴壁伸展开始生长时,选择生长状态良好的细胞准备实验。PBS 液洗涤细胞标本 2 次后,于 37℃ 恒温避光条件下用 Fullo-3/AM (10 μmol/L) 进行负载,30min 后用 PBS 液洗涤细胞 3 次,以去除胞外未负载之残余染料,滴加 PBS 液少许于培养皿中,平衡 10min。将负载后的小梁细胞标本置于 LSCM 镜下,分别加入 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ mol/L 的 Gen, LSCM 下动态扫描细胞内荧光强度变化。激发波长 488nm,发射波长 525nm。荧光强度变化与 [Ca²⁺]_i 呈比例关系,经校准, [Ca²⁺]_i = Kd · [(F-F_{min})/(F_{max}-F)] 得出。其中 Kd 为解离常数(400nmol/L), F_{min} 为无钙时胞内荧光强度, F_{max} 为钙饱和时胞内荧光强度, F 为所测得的荧光强度。测定过程中分别对细胞 [Ca²⁺]_i 变化强度进行照相,并对 [Ca²⁺]_i 变化描绘曲线,作定量分析。

统计学分析:所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分析选择 *t* 检验,取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

各浓度 Gen 作用于小梁细胞后荧光强度较作用前均有降低,且 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ mol/L 的作用渐次增强,说明 Gen 作用后 [Ca²⁺]_i 减少,呈现一定的剂量依赖性(图 1)。[Ca²⁺]_i 由作用前的 328.62 ± 16.77nmol/L 减少至 309.69 ± 16.57nmol/L (n = 8, P < 0.05)。

3 讨论

原发性开角型青光眼(POAG)中导致视神经损伤的主要机制为眼压升高,眼压升高的主要原因为房水排出阻力增加,阻力的主要部位在小梁网,而阻力的形成与小梁细胞的形态与功能密切相关。目前多项研究已证实,小梁网与睫状肌一样具有平滑肌样收缩功能,并且主动参与房水流出与眼压的调节,即小梁网收缩可减少房水流出,而舒张则可使房水流出增加^[3]。以往的研究提示,两类离子通道参与小梁网收缩的调节,即 L-型钙离子通道和超大钾离子通道,前者调节收缩,后者调节松弛^[2]。房水的流出部分通过小梁网的舒张与收缩来调节,小梁网收缩,房水流出下降;小梁网舒张,房水流出增加。此两类通道已成为青光眼药物治疗研究中的主要目标。

Gen 是酪氨酸激酶的非特异性抑制剂,通过抑制酪氨酸的磷酸化而发挥作用。已知酪氨酸可影响 Ca²⁺ 通道的活性,其对 L-型 Ca²⁺ 通道的调节已见报道于上皮细胞和平滑肌细胞。Steinhausen 等^[2]的实验指出,酪氨酸激酶抑制剂作用于小梁网可减弱其 L-型 Ca²⁺ 通道的电流,因此认为酪氨酸激酶可调节小梁细胞的 L-型 Ca²⁺ 通道。Gen 可以使乙酰胆碱对小梁细胞的作用在内向电流的基础上翻转为外向电流,即使钾离子通道内流导致细胞超极化,且其作用具有剂量依赖性。有研究指出,Gen 可松弛小梁网,并可激活超大钾离子通道;在平滑肌细胞,该通道通过钾离子内流使细胞超极化而导致细胞松弛。目前国内有关 Gen 的研究多集中于肿瘤方面,尚未见于对青光眼方面研究的报道。本实验中 Gen 作用于小梁细胞后引起 [Ca²⁺]_i 呈剂量依赖性降低。Ca²⁺ 是体内重要的阳离子之一,普

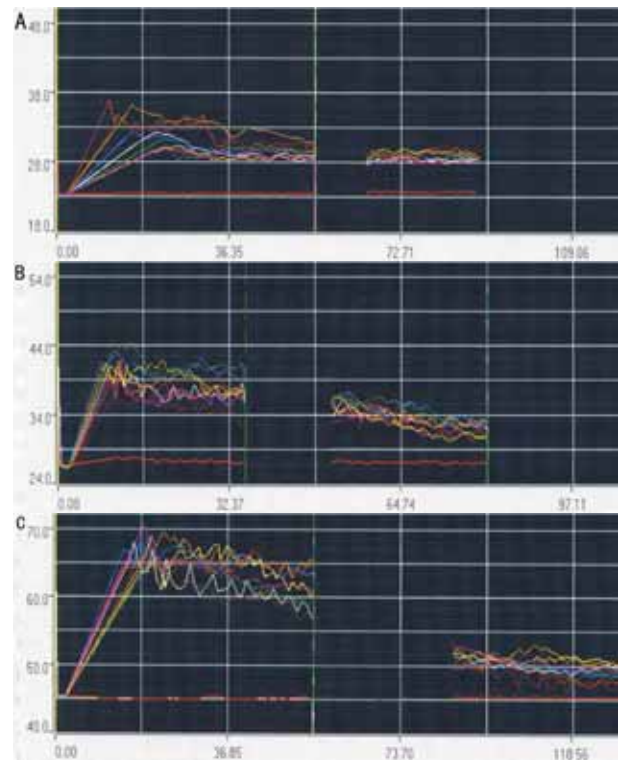


图 1 Gen 作用后荧光强度变化曲线 A:10⁻⁶ mol/L Gen; B:10⁻⁵ mol/L Gen; C:10⁻⁴ mol/L Gen。

遍存在于所有有生命的组织之中,胞内 Ca²⁺ 浓度微小的变化调节着活细胞内大量重要的生理和生化过程。Renieri 等^[4]的研究明确提出, Ca²⁺ 在小梁网中引起的收缩可影响房水引流从而调节眼内压。实验结果证实,Gen 可以降低小梁细胞 [Ca²⁺]_i, 由此认为其可松弛小梁网,促进房水流出,这与国外学者的研究结果和推测相似。既然小梁网的收缩性可部分调节房水的流出率,由此可认为其细胞表面的超大钾离子通道与 L-Ca²⁺ 通道可作为青光眼治疗中的药物作用靶目标。而 Gen 具有激活钾离子通道、抑制 L-Ca²⁺ 通道而舒张小梁网的双重作用,因此,Gen 将不失为将来 POAG 药物治疗的理想选择。

参考文献

- 1 Wijetunge S, Lynn JS, Hughes AD. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on voltage-operated calcium channel currents in vascular smooth muscle cells and pp60 (c-src) kinase activity. *Br J Pharmacol* 2000;129(7):1347-1354
- 2 Steinhausen K, Stumpf F, Strauss O, et al. Influence of muscarinic agonists and tyrosine kinase inhibitors on L-type Ca²⁺ channels in human and bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 2000; 70 (3): 285-293
- 3 Rosenthal R, Choritz L, Schlott S, et al. Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol-and endothelin-1-induced contraction of bovine trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 2005;80(6):837-845
- 4 Renieri G, Choritz L, Rosenthal R, et al. Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular meshwork. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(8):1107-1115