

体外培养视网膜 Müller 细胞损伤后早期的反应性改变

李传旭¹, 梁林晖², 景连喜², 项道满¹, 谢伯林³

作者单位:¹(510623)中国广东省广州市妇女儿童医疗中心眼科;²(510080)中国广东省广州市军区机关门诊部;³(650032)中国云南省昆明市,成都军区昆明总医院眼科

作者简介:李传旭,医学博士,主治医师,研究方向:小儿眼科。
通讯作者:谢伯林,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病. bolin_xie@tom.com

收稿日期:2012-05-22 修回日期:2012-07-03

Study on earlier pathological changes after injury of *in vitro* cultured retinal Müller cell

Chuan-Xu Li¹, Lin-Hui Liang², Lian-Xi Jing²,
Dao-Man Xiang¹, Bo-Lin Xie³

¹Department of Ophthalmology, Guangzhou Women and Children Medical Center, Guangzhou 510623, Guangdong Province, China;

²Department of Ophthalmology, Outpatient of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China;

³Department of Ophthalmology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Bo-Lin Xie. Department of Ophthalmology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, Yunnan Province, China. bolin_xie@tom.com

Received:2012-05-22 Accepted:2012-07-03

Abstract

• AIM: To investigate the earlier period pathology changes after high air pressure wave traumatic injury in cultured retinal Müller cell.

• METHODS: A model of high air pressure wave traumatic injury in cultured retinal Müller cell was established, the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after cell injury was tested by immunohistochemistry. The change of lactate dehydrogenase (LDH) activity and cell apoptosis rate after cell injury were observed.

• RESULTS: Increased expression of GFAP changes was observed 3 hours after injury. Then it maintained high level of expression within 24 hours, the results were related with injury degree ($P < 0.05$). LDH release increased within 30 minutes after injury. The apoptosis rate had non-significant difference within 30 minutes after injury ($P > 0.05$). The percentage of apoptotic cells increased 3 hours after injury and reached the highest 6 hours after injury.

• CONCLUSION: The changes of Müller cell shape and the permeability of cell membrane maybe one of factors to trigger the increasing expression of GFAP.

• KEYWORDS: Müller cell; cell culture; *in vitro* model of trauma; glial fibrillary acidic protein; apoptosis

Citation: Li CX, Liang LH, Jing LX, et al. Study on earlier pathological changes after injury of *in vitro* cultured retinal Müller cell. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(8):1455-1458

摘要

目的:研究体外培养 Müller 细胞致伤后早期细胞发生的一系列损伤性变化和发生反应性胶质化的规律。

方法:新生 SD 大鼠视网膜进行体外 Müller 细胞的培养并建立高压气体冲击损伤模型,检测细胞致伤后早期胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达变化,以及乳酸脱氢酶(LDH)的释放量和细胞凋亡率的变化。

结果:致伤后 3h 左右 GFAP 的表达量明显增强,以后 24h 内持续性高表达,并与损伤强度呈正比($P < 0.05$);LDH 的释放增加主要出现在损伤后 30min 内;损伤后 30min 各组致伤细胞凋亡率呈非显著性差异($P > 0.05$),3h 后细胞凋亡率增高,6h 后细胞凋亡率最高。

结论:Müller 细胞形态的改变和细胞膜通透性的改变可能是触发 GFAP 表达增强的因素之一。

关键词:Müller 细胞;细胞培养;体外创伤模型;胶质纤维酸性蛋白;细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.08.08

引用:李传旭,梁林晖,景连喜,等.体外培养视网膜 Müller 细胞损伤后早期的反应性改变.国际眼科杂志 2012;12(8):1455-1458

0 引言

研究发现,Müller 细胞在视网膜损伤后的修复和再生中起关键作用^[1,2]。视网膜损伤后,Müller 细胞出现反应性星形胶质细胞增生,是重要的组织病理学标志,其特征性表现为胶质细胞纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic, GFAP)表达的明显上调^[3]。然而 Müller 细胞在损伤后发生 GFAP 变化的规律和作用并不清楚。本研究采用体外高压气体冲击模型对培养的 Müller 细胞致伤,动态观察致伤后细胞早期的反应性改变及 GFAP 表达的变化,分析 GFAP 表达变化的规律及其与各因素的相关性,探讨 Müller 细胞反应性星形胶质化的始动因素及其在视网膜创伤与修复中的作用。

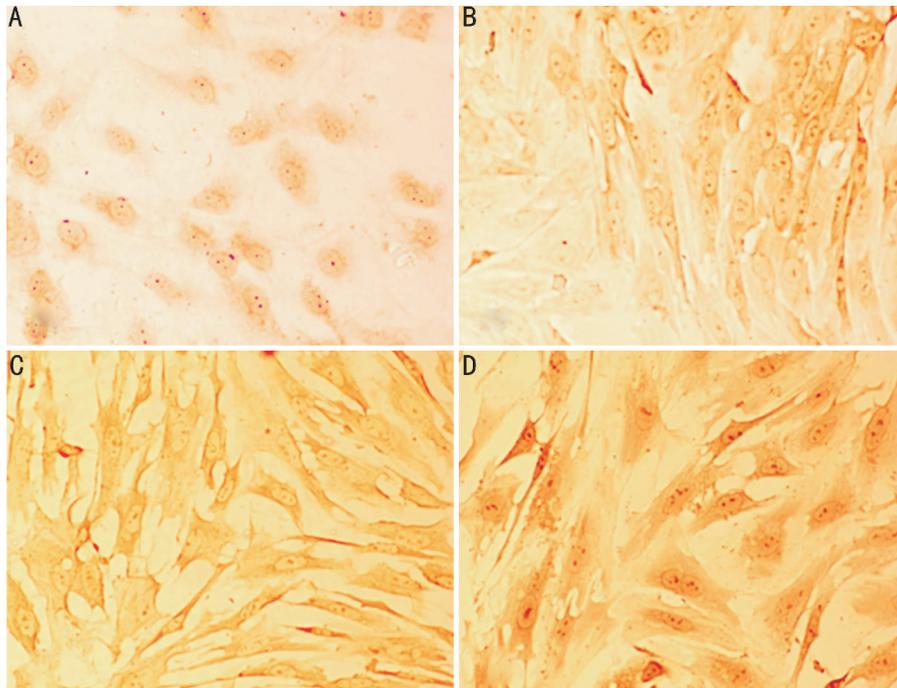


图1 不同驱动力致伤后24h Müller细胞GFAP的表达(DAB×400) A:对照组;B:50kPa驱动力组;C:100kPa驱动力组;D:200kPa驱动力组。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM/F₁₂培养基(Hyclone),小牛血清(Hyclone),台盼蓝(Sigma),LDH测试盒(南京建成),兔抗大鼠胶原纤维酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体(北京中山公司),免疫组织化学试剂盒(北京中山公司),6孔培养板(Nicon)。健康的1周龄SD大鼠30只,雌雄不限,体质量约50g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。高压气体损伤装置,由第三军医大学野战外科研究所四室研制。

1.2 方法

1.2.1 模型建立与分组 无菌操作下摘除SD大鼠眼球,按文献方法^[4]培养视网膜Müller细胞并经过纯化鉴定后,传代接种于6孔培养板中,随机分为致伤组和对照组,生长7d左右待细胞融合后进行实验。按照文献方法^[5]制作体外培养Müller细胞高压气体冲击模型,其中致伤组,按冲击气体驱动压力值分为50kPa组、100kPa组和200kPa组(每组6孔),并依据冲击损伤后不同时间分别取样(每个不同的时间点6孔)。对照组在相同的条件和时间下培养,不做致伤($n=6$)。

1.2.2 免疫组织化学检测Müller细胞中GFAP的表达 取样后0.01mol/L PBS洗2次,常规20mL/L戊二醛固定。一抗滴加1:100的兔抗大鼠GFAP单克隆抗体,空白对照加PBS,4℃过夜,二抗滴加生物素化山羊抗兔IgG,SABC法免疫组织化学染色,DAB室温下显色。光学显微镜下观察结果,棕黄色为阳性染色。通过与电脑相连的显微镜将采集到的免疫组织化学图像存入电脑,用Tiger920图像分析软件分析,半定量测定GFAP染色的积分光密度值和平均光密度值。

1.2.3 LDH释放量的检测 按文献方法^[5]检测不同驱动力下(50kPa, 100kPa, 200kPa),致伤后15,30min; 1,6h细胞LDH的释放量。

1.2.4 细胞凋亡原位检测细胞凋亡率 不同驱动力下(50kPa, 100kPa, 200kPa)致伤细胞的凋亡原位检测,分别取伤后30min; 3,6,8h共4个时相点。采用Roche公司TUNEL试剂盒检测,DAB显色,棕黄色为阳性染色,以Label solution作阴性对照。随机取5个高倍视野计数,阳性细胞/总细胞记为细胞凋亡率。

统计学分析:所得数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用SPSS 12.0软件进行,组间采用单因素方差分析进行检验,两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Müller细胞损伤后早期的形态变化 倒置显微镜下观察:对照组Müller细胞胞体较大呈长圆型或不规则形状,其细胞质丰富,折光性较强,细胞核大呈椭圆型,位于细胞中央,带有粗大突起,细胞胞体相互连接紧密、细胞之间界限不清。不同驱动力冲击作用下,当压力达到50kPa时本融合的Müller细胞间出现间隙,损伤中心区域的细胞折光性暗,随着驱动压力的增大,细胞间的间隙也随之增大,但压力达到200kPa时,细胞仍附着于培养皿并不脱落。随着时间的改变,损伤中心区域部分细胞形态丧失、脱壁,其余细胞明显肿胀变性,细胞内可见颗粒增多。

2.2 Müller细胞损伤后早期GFAP表达的变化 免疫组织化学观察:对照组Müller细胞,有少量GFAP的表达,染色均匀,阳性染色颗粒位于细胞胞浆,呈浅棕黄色。GFAP的表达在致伤后即时到损伤后1h内并不明显升高,各致伤组与对照组比较无统计学差异($P > 0.05$)。至致伤后3h GFAP的表达明显增高,与对照组比较存在显著性差异($P < 0.05$),之后在24h内呈逐渐增高趋势,且GFAP的表达与细胞损伤的严重程度有关(图1),200kPa组在3,6,

表1 Müller 细胞冲击损伤后 GFAP 的表达

 $\bar{x} \pm s$

分组	对照组	伤后					
		30min	1h	3h	6h	12h	24h
积分光密度值							
50kPa	18.26±1.03	20.70±2.75	21.24±3.20	30.57±3.10 ^a	36.99±3.09 ^a	41.58±2.90 ^a	48.91±2.79 ^a
100kPa	18.05±2.81	21.49±2.09	21.96±3.95	32.74±3.96 ^a	41.40±1.34 ^a	45.91±2.71 ^a	55.86±1.38 ^a
200kPa	18.49±1.74	22.64±1.73	23.29±1.20 ^a	37.26±1.99 ^{a,c}	43.85±1.56 ^{a,c}	50.44±2.25 ^{a,c}	58.24±1.90 ^{a,c}
平均光密度值							
50kPa	1.53±0.13	1.68±0.04	2.02±0.27	3.50±0.29 ^a	4.06±0.20 ^a	4.87±0.44 ^a	5.48±0.18 ^a
100kPa	1.56±0.14	1.62±0.16	2.52±0.16	4.11±0.29 ^a	4.56±0.20 ^a	5.05±0.12 ^a	6.10±0.09 ^a
200kPa	1.51±0.18	1.90±0.14	2.86±0.19	4.47±0.12 ^{a,c}	4.76±0.13 ^{a,c}	5.46±0.20 ^{a,c}	6.78±0.26 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 50kPa 组。

表2 致伤后 Müller 细胞 LDH 的释放量

 $(\bar{x} \pm s, U/L)$

分组	对照组	伤后			
		15min	30min	1h	6h
50kPa	13.14±1.27	18.33±1.17 ^a	21.18±1.41 ^a	17.57±1.57 ^a	15.17±1.23 ^a
100kPa	12.99±1.45	23.40±1.80 ^a	22.80±1.33 ^a	19.08±1.41 ^a	16.62±2.19 ^a
200kPa	12.71±1.66	34.67±1.49 ^a	48.36±2.16 ^a	25.71±2.59 ^a	18.14±1.42 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表3 致伤后 Müller 细胞凋亡率

 $(\bar{x} \pm s, \%)$

分组	对照组	伤后			
		30min	3h	6h	8h
50kPa	0.77±0.31	1.21±0.20	3.25±0.57 ^a	8.09±0.24 ^a	8.99±0.08 ^a
100kPa	1.01±0.13	1.20±0.07	4.70±0.81 ^a	13.31±0.63 ^{a,c}	14.93±1.39 ^{a,c}
200kPa	1.28±0.20	1.10±0.20	5.67±0.56 ^a	20.32±1.94 ^{a,c}	22.00±0.11 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 50kPa 组。

12,24h 各时间点与 50kPa 组相同时间点比较均存在统计学差异 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.3 致伤后 Müller 细胞 LDH 的释放量 损伤后 15min 即可检测到细胞 LDH 释放量增多,各致伤组 LDH 的释放量均显著高于对照组 ($P < 0.05$),随着驱动力的增加,LDH 的释放也呈上升趋势,释放高峰在 30min 以内(表 2)。

2.4 致伤后 Müller 细胞的凋亡率 TUNEL 法测定致伤后 30min; 3,6,8h 细胞的凋亡率,结果显示损伤后 30min 各组细胞凋亡率无显著性差异 ($P > 0.05$),3h 后细胞凋亡率增高,6h 达到最大值,与对照组相比有统计学差异 ($P < 0.05$),6h 后细胞凋亡率在 100kPa 和 200kPa 组与 50kPa 组相同时间点比较均存在统计学差异 ($P < 0.05$),表明损伤细胞的凋亡率随损伤强度的增加而明显增加(表 3)。

3 讨论

本实验主要研究培养的视网膜 Müller 细胞高压气体冲击损伤后早期的反应过程。在细胞形态学方面显示,当压力达到 50kPa 时本融合的 Müller 细胞间即出现间隙,损伤中心区域的细胞折光性暗,随着驱动压力的增大,细胞间的间隙也随之增大,但压力达到 200kPa 时,细胞仍附着于培养皿并不脱落。随着时间的改变,损伤中心区域部分细胞形态丧失,脱壁,其余残存活细胞明显肿胀变性。致伤后 GFAP 表达变化的结果显示,冲击损伤后细胞 GFAP 的表达量在损伤即时并不明显升高,至 3h 时开始急剧升

高,之后在 24h 内呈逐渐增高趋势,并与损伤的严重程度有关。

LDH 是一种胞质酶,是广泛存在于神经原及神经胶质细胞胞浆内的氧化还原酶,正常情况下释放很少,当细胞膜的通透性增高或完整性丧失时,LDH 扩散到胞外介质^[6]。以 LDH 的释放量作为细胞膜损伤的标志,观察 Müller 细胞损伤后细胞膜通透性的变化。本研究中发现,在损伤后 15min 即可检测到 Müller 细胞释放的 LDH 增多,各组 LDH 释放的峰值均发生在损伤后的 30min。

前期实验^[5]中我们发现,致伤组的细胞电镜下出现了明显的细胞核的变化,染色质浓缩呈斑块状,大部分于核的周边凝集;多数细胞线粒体肿大,脊排列疏松,内质网扩张等,于是我们用 TUNEL 法检测了致伤后细胞的凋亡率。结果显示,致伤后 3h 细胞凋亡率开始增加,6h 达到最大值,200kPa 组达 (20.32±1.94)% ,以后慢慢稳定。

故此,我们推断培养 Müller 细胞在冲击损伤后早期的反应过程如下:冲击后导致部分 Müller 细胞的坏死,残存活细胞的细胞膜通透性改变,出现 LDH 的漏出;Na⁺,K⁺,Ca²⁺内流;细胞内水分增多引起细胞肿胀。伴随一些因子的释放,包括释放谷氨酸 (glutamate) 等神经递质^[7],而过量的谷氨酸可以诱导 Müller 细胞内 c-fos 等表达增强并继续以细胞凋亡的方式引起细胞的死亡^[8]。同时过量的 Ca²⁺在细胞内的堆积加重了细胞损伤和细胞凋亡。损伤

后的数小时细胞缺氧继发了应急反应, Müller 细胞的能量代谢转变为糖原的无糖酵解, 乳酸产生增多, 引起细胞内 pH 值下降, 并影响细胞的渗透压, 进一步加重细胞水肿。在这一系列早期反应后面, 多种因素或具体的某几种因子(如 bFGF 等)^[8-10]触发了残存活细胞 GFAP 反应性的增强, Müller 细胞开始表现出肥大和增殖。

综上所述, Müller 细胞在高压气体冲击致伤后早期即时反应为出现细胞肿胀和细胞膜通透性的改变, 发生在损伤后数秒钟至数分钟内, 进而于损伤后数小时内, Müller 细胞的某些特征被改变, 获得了一些新的特征, 其中最显著的改变是 GFAP 的免疫活性增强。

参考文献

- 1 Bringmann A, Wiedemann P. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 2012;227(1):1-19
- 2 Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(4):397-424
- 3 Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a

- comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 2003;230:263-290
- 4 李传旭, 梁林晖, 谢伯林. 新生大鼠视网膜 Müller 细胞体外培养纯化及鉴定. *眼科新进展* 2008;28(4):256-258
- 5 李传旭, 谢伯林, 尹志勇, 等. 体外培养视网膜 Müller 细胞高压气体冲击损伤模型. *眼科研究* 2008;26(9):668-671
- 6 Landis DM. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci* 1994;17(3):133-151
- 7 李树宁, 王净华, 王大博, 等. 压力对体外培养大鼠视网膜 Müller 细胞的影响. *中华眼科杂志* 2005;41(4):325-329
- 8 Cao W, Li F, Steinberg RH, et al. Induction of c-fos and c-jun mRNA expression by basic fibroblast growth factor in cultured rat Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(3):565-573
- 9 Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, et al. Neurotrophic Factors Cause Activation of Intracellular Signaling Pathways in Müller Cells and Other Cells of the Inner Retina, but Not Photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):927-936
- 10 Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, et al. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 2009;28(6):423-451