·实验研究·

嘌呤受体 $P2X_7$ 对视网膜毛细血管周细胞凋亡的影响

左 炜,祝芸芸,于洪涛,利焕廉,周金文,王 恒

基金项目:深圳市科技项目(No. 201103172)
作者单位:(518033)中国广东省深圳市第四人民医院眼科
作者简介:左炜,副主任医师,研究方向:眼底病、角膜病。
通讯作者:左炜. zuowei716@163. com
收稿日期: 2013-12-07 修回日期: 2014-03-14

Effect of purine receptor $P2X_7$ in pericyte of retinal microvascular apoptosis

Wei Zuo, Yun-Yun Zhu, Hong-Tao Yu, Huan-Lian Li, Jin-Wen Zhou, Heng Wang

Foundation item: Science and Technology Program of Shenzhen (No. 201103172)
Department of Ophthalmology, Fourth People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China
Correspondence to: Wei Zuo. Department of Ophthalmology, Fourth People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China. zuowei716@163. com
Received:2013-12-07 Accepted:2014-03-14

Abstract

• AIM: To discuss the functional significance of purine receptor $P2X_7$ in retinal capillary pericytes rats.

• METHODS: The TUNEL test was applied to observe the survival rate of normal retinal capillary pericytes and diabetic retinal capillary pericytes which were affected by $P2X_7$ agonist BzATP and antagonist OxATP in microscopy.

• RESULTS: Activation of $P2X_7$ receptors caused occurence of apoptosis in retinal capillary pericytes. Compared with normal retinal capillary pericytes, when they were at the same concentration or time, the diabetic retinal capillary pericytes caused much more apoptosis than normal retinal capillary pericytes. The antagonist OxATP could significantly reduce the toxic effects activated by BzATP, and then increased the livability of retinal capillary pericytes.

• CONCLUSION: The activity of $P2X_7$ receptor plays a regulatory role on RPC apoptosis.

• KEYWORDS: $P2X_7$ receptor; pericyte of retinal microvascular; diabetic retinopathy; apoptosis

Citation: Zuo W, Zhu YY, Yu HT, *et al*. Effect of purine receptor $P2X_7$ in pericyte of retinal microvascular apoptosis. *Guoji Yanke Zazhi*(*Int Eye Sci*) 2014;14(4):603-605

摘要

目的:探讨嘌呤受体 $P2X_7$ 在体外培养大鼠视网膜毛细血管周细胞上的功能意义。

方法:利用显微镜下观察结合 TUNEL 计数法分别测定 $P2X_7$ 激动剂 BzATP 和拮抗剂 OxATP 对体外培养的正常视网膜毛细血管周细胞以及糖尿病大鼠视网膜毛细血管周细胞存活率的影响。

结果:$P2X_7$ 受体激动后可介导视网膜毛细血管周细胞死亡,糖尿病大鼠视网膜毛细血管周细胞较正常视网膜毛细血管周细胞,在同等激动剂浓度下或在同样的时间点,能引起更多的细胞凋亡。而拮抗剂 OxATP 可以明显减轻 BzATP 对视网膜毛细血管周细胞的毒性作用,提高其存活率。

结论:$P2X_7$ 受体活性对视网膜毛细血管周细胞凋亡有一定调控作用。

关键词:$P2X_7$ 受体;视网膜微血管周细胞;糖尿病视网膜病变;凋亡
DOI:10.3980/j. issn. 1672-5123. 2014. 04. 07

引用:左炜,祝芸芸,于洪涛,等. 嘌呤受体 $P2X_7$ 对视网膜毛细血管周细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志 2014;14(4):603-605

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic ratinopathy, DR)是糖尿病最常见和严重的并发症之一,严重者可导致失明。DR 最早期的特征性病理特征是视网膜血管周细胞丧失。周细胞的丢失和凋亡被认为是 DR 最早的病理形态学改变,被认为是糖尿病性视网膜病变的始发机制[1,2],然而其具体凋亡机制却未完全明了。

嘌呤信号转导是近年来研究的热点和重点之一。经过长期的研究发展,人们认为嘌呤及其受体在神经传递、免疫调节、炎症、血小板凝聚、疼痛反应以及外分泌、内分泌方面都有广泛的参与。研究证实,嘌呤及其受体在眼部各结构的生理和病理生理学变化中也扮演着重要角色[3,4]。$P2X_7$ 受体是近年来发现的、有独特特点的嘌呤受体家族中的一员。研究发现,$P2X_7$ 是一种重要的凋亡受体。在低浓度 ATP 等激动剂刺激下可以引起选择性阳离子通道打开,允许钾、钠、钙等阳离子跨膜流动,而对二价阳离子表现出相对强的选择性,在低二价阳离子重复或者延长刺激使该通道形成孔洞,可以使大的有机分子通过,造成细胞凋亡[5]。

已有研究证实,视网膜毛细血管周细胞上有嘌呤受体 $P2X_7$ 的表达[6],且它的激活能引起周细胞收缩。在早期的糖尿病视网膜病变进程中,$P2X_7$ 受体起到了加速视网膜微血管循环障碍的作用[7]。在此基础上,我们设想,$P2X_7$ 受体是否在糖尿病视网膜病变周细胞的凋亡上起了一定作用? 本文通过探讨调节 $P2X_7$ 受体对糖尿病视网膜病变新生血管的发生发展是否起调控作用,将嘌呤调节引入糖尿病视网膜病变中研究,为治疗糖尿病视网膜病变提供了新的思路与途径。

1 材料和方法

1.1 材料　选择清洁型雄性 SD 大鼠 60 只，体质量 200 ~ 250g，由长沙市天勤生物技术有限公司提供，动物生产许可证号为[SCXK(湘)2009-0012]。所有大鼠均饲养在标准化动物中心，单笼标准饲料喂养，自由进食和饮水，室温 18℃ ~22℃。随机分为对照组(CON 组)及糖尿病 5mo 组(DM 组，实验组)，每组大鼠 15 只。

1.2 方法　大鼠糖尿病模型的建立：实验组大鼠先以高脂饮食喂养 1mo，然后禁食 12h，经腹腔一次性注射 STZ 柠檬酸溶液 50mg/kg(用 0.001mmol/L 柠檬酸盐缓冲液配成 10g/L 的 STZ)。分别于喂养的第 48h 和 72h 采尾静脉血测空腹血糖，用尿糖试纸测尿糖，若血糖>16.65mmol/L，尿糖>(+++)以上，则 DM 大鼠造模成功。空腹血糖<16.65mmol/L 的大鼠禁食 12h 后再次以同样剂量 STZ 注射累加成模。同上述方法测空腹血糖和尿糖筛选出 DM 大鼠。模型建立后观察 1wk，然后开始计算 DM 病程。正常对照组大鼠腹腔注射同样剂量的柠檬酸盐缓冲液。每月检测一次大鼠体质量和空腹血糖。于观察期末摘除大鼠的眼球视网膜[8,9]。

视网膜血管消化铺片：20g/L 戊巴比妥钠(50mg/kg)过量麻醉处死大鼠，摘除眼球，将左眼置于 40g/L 多聚甲醛中 24h。自角膜缘后 0.5mm 处剪开眼球，去除眼前节和玻璃体，以视乳头为中心将视网膜均匀分成 3 等份，用蒸馏水漂洗数次，轻轻剥离视网膜，用 0.01mol/L 的 PBS 液体 4℃浸泡 3 ~4h，装入人 30g/L 胰蛋白酶溶液内，37℃温箱内消化 2h，再用蒸馏水漂洗数次，用吸管定向轻吹打乳白色区域，使血管网与残存组织分离开，消化好的血管网应呈透明状。将吹打成透明状的血管网吸取放在洁静的载玻片上，自然干燥备染[10,11]。实验分组与处理：每次随机选取 5 只大鼠，按上诉方法按上诉方法制成视网膜血管铺片。共分为两组，正常对照组和 DM 组，DM 组为糖尿病建模 5mo 大鼠组，两组均用同样的处理方法：(1)仅加入激动剂 BzATP；(2)仅加入拮抗剂 OxATP；(3)先加入拮抗剂 OxATP，再加入激动剂 BzATP。(具体时间及浓度见第二项检测方法第 3 点)。检测方法：(1)视网膜血管铺片染色：视网膜血管铺片浸入新配制的 schiff 试剂染色 20min，100g/L 偏重亚硫酸钠液洗 3 次，每次洗 5min。Mayer 氏苏木素复染细胞核 2min，流水冲洗 5min，脱水，透明，封片。(2)细胞凋亡检测：采用末端标记技术 TUNEL 法检测凋亡的细胞。判断标准：细胞核染成棕黄色者为阳性细胞，即凋亡细胞。显微镜下观察并拍照，随机取 7 个高倍视野(400 倍)，记数 200 个细胞中的阳性细胞数，计算出凋亡细胞率，对凋亡细胞的进行半定量比较。(3)检测 $P2X_7$受体加入激动剂和拮抗剂后两组大鼠 RMP 活性测定：1)分别取正常及 DM 组大鼠视网膜，室温孵育 2h，再按上诉方法行视网膜血管铺片及 TUNEL 法凋亡检测，分别在倒置荧光显微镜下及电镜下观察，照相，行凋亡细胞计数。2)分别取正常及 DM 组大鼠视网膜，加入不同浓度激动剂 BzATP(0，1，10，100，1000μmol/L)室温孵育 2h，行凋亡细胞计数。3)分别取正常及 DM 组大鼠视网膜，加入拮抗剂 OxATP(300μmol/L)室温孵育 2h，行凋亡细胞计数。4)分别取正常及 DM 组大鼠视网膜，先加入拮抗剂 OxATP(300μmol/L)室温孵育 2h，再加入激动剂 BzATP(100μmol/L)，行凋亡细胞计数。

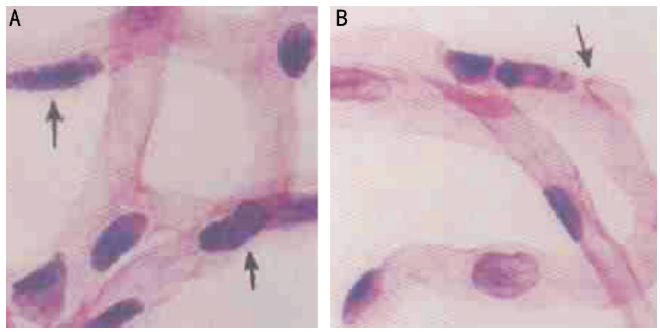

图 1　两组视网膜毛细血管周细胞铺片染色结果(×100)　箭头：A：正常细胞核；B：异常细胞核。

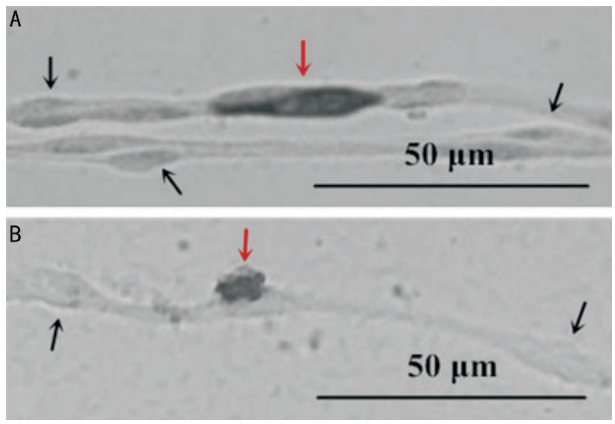

图 2　加入 BzATP 后两组 RPC 形态变化　A：正常大鼠视网膜毛细血管周细胞；B：糖尿病大鼠视网膜毛细血管周细胞；黑箭头：活性视网膜毛细血管周细胞；红箭头：凋亡视网膜毛细血管周细胞。

统计学分析：所有数据均用 EXCEL 软件建立数据库并作图分析，数据以均值±标准误表示，采用 t 检验统计分析，$P<0.05$ 即为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠视网膜血管铺片染色鉴定结果　高倍镜下可见 CON 组毛细血管由周细胞及内皮细胞组成，周细胞核小呈圆型，有的呈三角形帽状，核染色质致密，多位于毛细血管一侧(黑色箭头)；内皮细胞核较大，呈椭圆型或不规则型，长轴与毛细血管平行，核染色质疏松，一般位于毛细血管中央部位，没有见到有闭塞的毛细血管(图 1A)。DM 组毛细血管网分布尚均匀，但周细胞核染色较正常淡，略肿大，数量较正常组减少(黑色箭头，图 1B)。TUNEL 法检测两组 RPC 凋亡(图 2)。

2.2 $P2X_7$受体激动剂和拮抗剂对 RMP 存活率的影响　BzATP 激动 $P2X_7$受体引起的致凋亡作用为剂量依赖性，随着 BzATP 浓度增加，凋亡细胞的数目也相应增加。在浓度为约 500μmol/L 时，正常视网膜毛细血管周细胞达到了 50% 的死亡率，而促使 DRPC 达到同一死亡率的 BzATP 浓度仅为约 2μmol/L。另外，在同一浓度激动剂情况下，BzATP 致糖尿病大鼠视网膜毛细血管周细胞的死亡率明显高于正常视网膜毛细血管周细胞，这说明，通过 $P2X_7$受体介导，糖尿病大鼠视网膜毛细血管周细胞较正常视网膜毛细血管周细胞，在更低的激动剂浓度下或在更早的时间点，就能引起同等数量的细胞凋亡(图 3)。

在另一组数据中发现，应用拮抗剂 OxATP(300μmol/L)预处理 2h，再与 100μmol/L BzATP 共同作用 2h，结果大大减少了视网膜毛细血管周细胞死亡数目。正常视网膜毛

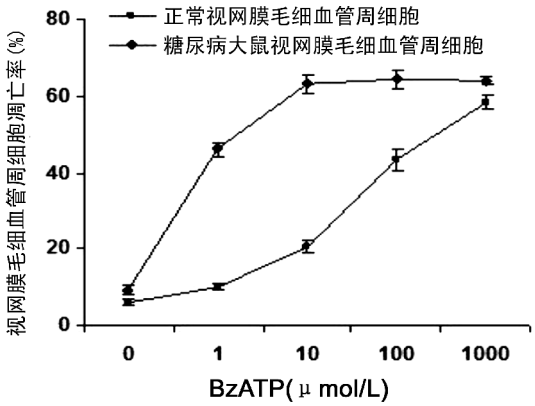

图3 加入不同浓度 $P2X_7$ 受体激动剂 BzATP 后两组视网膜毛细血管周细胞凋亡计数。

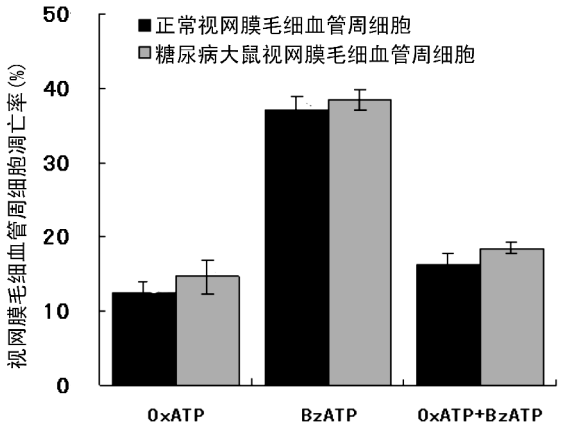

图4 加入 $P2X_7$ 受体拮抗剂 OxATP 和激动剂 OxATP 对两组视网膜毛细血管周细胞存活率的影响。

细血管周细胞和糖尿病大鼠视网膜毛细血管周细胞的细胞死亡率分别由 37% ±1. 72% 和 38% ±1. 36% 下降至 16% ±1. 47% 和 18% ±1. 02%,结果在两种细胞中都有统计学意义($P<0.05$),但两者相比没有明显差异($P>0.05$),见图4。

3 讨论

近几年,人们对 DR 发病机制的研究在有很大进步,尤其是在对 DR 本质的看法上不同于以往。随着对 DR 认识的深入,人们认识到周细胞在 DR 发病中的重要作用。由于周细胞的丢失和凋亡是 DR 的始动机制,如何阻断这一始动机制成为了现在 DR 研究的一个热点。

近年来,嘌呤和嘌呤受体作为重要的信号分子备受关注[12-15]。研究证实,嘌呤及其受体在眼部各结构的生理和病理生理学变化中也扮演着重要角色。如腺苷受体 A_1 激活后,可引起小梁网细胞分泌基质基金蛋白酶-2(MMP-2)增加,减少细胞外基质(ECM)堆积,眼内压降低[10]。

$P2X_7$ 受体属嘌呤受体家族的一员,是近年来发现的、一种有其独特特点的门控离子通道,ATP 是其天然的激动剂,$P2X_7$ 受体在 ATP 作用下受体通道开放。研究证实,它可引起胞外信号的传导、引起相应的生物学效应,包括可引起细胞凋亡,参与视网膜疾病的发生、发展。

本研究采用 TUNEL 法结合显微镜下细胞计数,证实 $P2X_7$ 受体激动剂 BzATP 可诱导视网膜毛细血管周细胞凋亡,而且,不论是正常视网膜毛细血管周细胞还是糖尿病大鼠视网膜毛细血管周细胞,凋亡细胞数目都和浓度成正比。两组相比,糖尿病大鼠视网膜毛细血管周细胞比正常视网膜毛细血管周细胞在更早的时间段就已经发生凋亡,且凋亡数量更高;同样地,也比正常视网膜毛细血管周细胞在更低的激动剂浓度下就可以达到同等数目的细胞死亡。另一方面,加入拮抗剂 OxATP 后,能够对 BzATP 诱导的视网膜毛细血管周细胞凋亡起到较明显的抑制作用,这也提示我们 $P2X_7$ 受体在周细胞凋亡方面的一个可调控作用。

然而,我们的实验只是证明 $P2X_7$ 在体外培养视网膜毛细血管周细胞上的凋亡作用及其调控机制,在人体内 P2X7 如何介导周细胞凋亡,过程是否和体外一致,还需要进一步研究。$P2X_7$ 受体、视网膜血管周细胞凋亡和 DR 的病理生理过程,三者之间很可能存在着一定的相互联系,但这一设想尚需进一步研究证实。证实 $P2X_7$ 受体对周细胞的凋亡有一定调控作用,为我们以后的研究奠定了一个良好的基础。

参考文献

1 陈百华,姜德咏. 周细胞与糖尿病视网膜病变. 眼科新进展 2002;22(4):133-135

2 Beltramo E, Porta M. Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem* 2013;20(26):3218-3225

3 Shearer TW, Crosson CE. Adenosine A1 receptor modulation of MMP-2 Secretion by trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(9):3016-3020

4 Crosson CE, Yates PW, Bhat AN, *et al*. Evidence for multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309(2): 484-489

5 Zhang XL, Zhang M, Mitchell CH, *et al*. Stimulation of $P2X_7$ receptor elevated Ca^{2+} and kills retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(6): 2183-2191

6 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(3):787-799

7 Liao SD, Puro DG. NAD+-induced vasotoxicity in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina: effect of diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 ;47(11):5032-5038

8 孟旭霞, 牛膺筠, 曲虹,等. 大鼠糖尿病视网膜病变模型建立及超微结构观察. 青岛大学医学院学报 2007;43 (6):216-220

9 宋鄂, 吕成芳, 齐晓同,等. 糖尿病大鼠视网膜病理模型的建立. 吉林大学学报(医学版)2003;29: 286-288

10 Avila MY, Stone RA, Civan MM. A(1)-, A(2A)- and A(3)-subtype adenosine receptors modulate intraocular pressure in the mouse. *Br J Pharmacol* 2001;134(2):241-245

11 崔彦,许迅,顾青. 改良的视网膜血管消化铺片联合共聚焦显微镜观察-视网膜血管的三维检查方法. 眼科 2006;15:138-141

12 Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(7):575-590

13 Holmsen H, Storm E, Day HJ. Determination of ATP and ADP in blood platelets: a modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal Biochem* 1972;46(2):489-501

14 Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, *et al*. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97(3):587-600

15 Newman EA. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci* 2001; 21(7):2215-2223