

# Exenatide 对高糖培养的视网膜神经节细胞的保护作用

匡洪宇<sup>1</sup>, 刘余<sup>1</sup>, 郝明<sup>1</sup>, 傅铮<sup>1</sup>, 马丽丽<sup>2</sup>

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30873392)

作者单位: <sup>1</sup>(150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科; <sup>2</sup>(150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 黑龙江省第二医院内分泌科

作者简介: 匡洪宇, 博士, 教授, 主任医师, 行政主任, 硕士研究生导师, 中华医学会糖尿病学会委员, 黑龙江省糖尿病学会副主任委员, 哈尔滨市内分泌学会副主任委员, 承担国家自然科学基金、国家中医管理局基金等国家级、省级、市级、院级课题十余项, 发表相关学术论文五十余篇, 获省厅级科技进步奖共八项, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。

通讯作者: 匡洪宇. kuangzou2010@yahoo. com. cn

收稿日期: 2011-05-23 修回日期: 2011-07-19

## Protective effect of Exenatide for retinal ganglion cells cultured with high glucose concentrations

Hong-Yu Kuang<sup>1</sup>, Yu Liu<sup>1</sup>, Ming Hao<sup>1</sup>, Zheng Fu<sup>1</sup>, Li-Li Ma<sup>2</sup>

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30873392)

<sup>1</sup>Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China;

<sup>2</sup>Department of Endocrinology, the Second Hospital of Heilongjiang Province, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Hong-Yu Kuang. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. kuangzou2010@yahoo. com. cn

Received: 2011-05-23 Accepted: 2011-07-19

## Abstract

• AIM: In present study, we evaluate the neuroprotective effect of Exenatide, and further investigate the underlying mechanism of Exenatide-induced retinal ganglion cells (RGCs) protection.

• METHODS: *In vitro*, expression of glucagon-like peptide -1 receptor (GLP-1R) in RGCs cells was detected by immunofluorescence and apoptotic models was built by using high-glucose as cell apoptotic inducer. Different concentrations of Exenatide as the intervention was added to medium and cell survival rate was evaluated by CCK-8 test.

• RESULTS: Immunofluorescence results showed that RGCs expressed GLP-1R. CCK-8 test results indicated that 0.5-1μg/L concentration of Exenatide could promote the

survival of RGCs, and 0.5μg/L concentration of Exenatide which was the low concentration had favourable effect to protect RGCs ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: Exenatide protects RGCs from survival inhibition induced by high-glucose. The protection may depend on GLP-1R induced cell protective mechanism.

• KEYWORDS: retinal ganglion cells; Exenatide; cell protection

Kuang HY, Liu Y, Hao M, *et al.* Protective effect of Exenatide for retinal ganglion cells cultured with high glucose concentrations. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(9):1521-1524

## 摘要

目的: 评价 Exenatide 对视神经保护作用, 并初步探索其对视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的保护机制。

方法: 体外培养 RGCs, 免疫荧光检测 RGCs 是否表达胰升糖素样肽-1 受体 (glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R), 采用高糖作为细胞凋亡诱导剂建立 RGCs 凋亡模型, 并用不同浓度 Exenatide 加入细胞培养基中进行干预, 用 CCK-8 检测细胞存活率。

结果: 免疫荧光结果显示, RGCs 存在 GLP-1R 的表达。CCK-8 检测结果显示终浓度为 0.5 ~ 1μg/L 时 Exenatide 均可促进 RGCs 存活, 其中 0.5μg/L 浓度较低且已有明显保护作用 ( $P < 0.05$ )。

结论: Exenatide 注射液对高糖引起的 RGCs 生存抑制有一定保护作用, 这种保护作用很可能通过 GLP-1R 介导的细胞内保护机制产生。

关键词: 视网膜神经节细胞; Exenatide; 细胞保护

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.09.008

匡洪宇, 刘余, 郝明, 等. Exenatide 对高糖培养的视网膜神经节细胞的保护作用. 国际眼科杂志 2011;11(9):1521-1524

## 0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 最常见的微血管并发症之一, 是主要的致盲疾病。而近来研究发现, 视网膜的神经病变早于微血管病变, 且发现保护视网膜神经细胞会延缓 DR 的发生<sup>[1]</sup>。视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 是视网膜中分化最早的神经元, 也是视网膜中形成视觉的主要细胞, RGCs 的进行性死亡是视功能不可逆性损害的主要原因。Exenatide 是一种降糖的新药, 主要成分 exendin-4 是合成肽类, 具有肠促胰岛素分泌激素类似物效应。现已证实 Exenatide 是一种 GLP-1R 激动剂, 它可在

体内外与 GLP-1R 结合并激活该受体,进而引起一系列的细胞内的反应。近期大量的研究表明, GLP-1R 激动剂对神经细胞存在有效的保护作用<sup>[2,3]</sup>,但尚无 Exenatide 对 RGCs 的保护作用的研究。本实验是为了研究 Exenatide 是否对视神经也有相似的保护作用,为临床提供 DR 预防和治疗的新思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 超净操作台(Healforce, HFsafe1500/C), 细胞培养箱(Healforce, HF90), 荧光倒置显微镜(Nikon, TE2000-U), 酶标仪(Bio-Rad 550), Exenatide 注射剂(美国 Baxter Pharmaceutical Solutions LLC), Exendin (9-39) (Sigma, E7269), 胎牛血清(FBS)、DMEM 培养液、青霉素-链霉素双抗、2.5g/L 胰蛋白酶(Hyclone), 神经细胞培养基、B-27 (10889)为 Invitrogen 公司产品, 谷氨酰胺(Sigma), 重组人脑源性神经生长因子(Human BDNF, 450-02)、重组鼠睫状神经生长因子(Rat CNTF, 450-50)为 PeproTech 产品, 层粘连蛋白(Sigma), 多聚赖氨酸(Sciencell, 0403), Triton X-100(Sigma), 细胞计数试剂盒-8(CCK-8, 日本同仁), Thy1.1/CD90 抗体(Abcam, ab225), 巨噬细胞标志物抗体(sc-66204)、GLP-1R 抗体(sc-66911)为 Santa Cruz 产品, 羊抗鼠 IgG (Jackson), FITC 标记山羊抗兔 IgG 和 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (北京中杉), 正常山羊血清(武汉博士德)。

## 1.2 方法

**1.2.1 RGCs 细胞培养及凋亡造模** 出生 1~3d 的 Wistar 乳鼠置于 750mL/L 乙醇浸泡 5min, 显微镜下无菌取出眼球, 眼球于含 100U/mL 青霉素、50 $\mu$ g/mL 链霉素冷 D-hank's 液中冲洗 3 次后, 放于冰浴培养皿中; 将视网膜完整的分离出, 并用无菌冷 D-hank's 液冲洗 3 次。在超净台内将分离出的视网膜以 2.5g/L 胰蛋白酶消化, 并以吸管进行反复吹打, 混匀成悬液后, 以含 100mL/L FBS 的 DMEM 培养基进行中和, 经滤网过滤, 1200r/min 离心 5min。100mL/L FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞。RGCs 的纯化依照一直被国外 RGCs 研究所采用 Barres 等<sup>[4]</sup>方法进行。首先重悬细胞液内加入巨噬细胞标志物抗体(稀释浓度为 1:100), 轻轻混匀, 并置于羊抗鼠 IgG 包被的培养皿中 37 $^{\circ}$ C 孵育, 去除巨噬细胞; 吸取非黏附细胞悬液置于 Thy1.1 抗体包被的培养皿中, 37 $^{\circ}$ C 孵育; 轻轻吸掉未黏附的细胞悬液, PBS 轻洗培养皿 3 次, 进一步纯化 RGCs; 用含 1.25g/L 胰酶的 PBS 液轻轻冲洗培养皿壁, 黏附于培养皿壁细胞脱落后, 含 100mL/L FBS 的 DMEM 培养液终止消化; 1000r/min 离心 3min。无血清培养基(神经细胞培养基, 1:50 稀释的 B27, 25mmol/L 葡萄糖, 2mmol/L 谷氨酰胺, 50 $\mu$ g/L CNTF, 40 $\mu$ g/L BDNF, 1 $\times$ 10<sup>5</sup>U/L 青霉素, 50 $\mu$ g/L 链霉素)重悬; 将细胞悬液于相差显微镜下计数, 以 1 $\times$ 10<sup>8</sup>/L 细胞种植密度接种于包被好的 6 孔培养板中。培养 RGCs 24h 后换液, 高糖损伤组更换为含 55mmol/L 的培养基。

**1.2.2 免疫荧光法鉴定 RGCs 及检测 GLP-1R 的表达** 经纯化培养第 3d 的 RGCs, 用 Thy-1.1 抗体进行 RGCs 鉴定并用 GLP-1R 抗体进行 GLP-1R 的表达检测。步骤如下: 6 孔培养板预先置入无菌的盖玻片, 用多聚赖氨酸及

层粘连蛋白包被盖玻片; 将纯化的 RGCs 细胞置于其中培养 3d; 取出培养细胞的盖玻片, PBS 冲洗 3 次; 滴加 40g/L 多聚甲醛于盖玻片上, 室温固定 30min, PBS 洗净; 3mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温封闭 15min; 含 10mL/L BSA 和 0.1mL/L Triton X-100 的 PBS 缓冲液孵育 20min; 含 100mL/L 正常羊血清的 PBS 缓冲液孵育 20min; 加 Thy1.1 抗体(1:300, PBS 稀释)或 GLP-1R 抗体(1:200, PBS 稀释), 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS 冲洗, FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:50, 0.01mol/L PBS 液稀释)或 FITC 标记的山羊抗兔 IgG (1:50, 0.01mol/L PBS 液稀释)室温避光孵育 1h; 200mL/L 甘油封片(0.01mol/L PBS 中含 200mL/L 甘油); 荧光显微镜观察并照相。

**1.2.3 CCK-8 检测细胞活性** 纯化的 RGCs 种植于 96 孔培养板内, 每孔加入 100 $\mu$ L 10000 个细胞, 37 $^{\circ}$ C 孵育; 24h 细胞贴壁后, 对照组(25mmol/L 葡萄糖)以无血清培养基培养, 高糖组(55mmol/L 葡萄糖)以无血清培养基加入葡萄糖调整, 每 24h 换液 1 次; 于 RGCs 培养 24, 48 和 72h 时每孔 100 $\mu$ L 培养基加入 10 $\mu$ L 的 CCK-8 试剂; 在细胞培养箱内继续孵育 3h, 用酶标仪检测, 450nm 测定吸光度(A), 并计算出细胞的存活率, 得出最佳造模的培养时间。为检测 Exenatide 药物效果, 再次纯化培养 RGCs, 24h 后细胞按下列分组更换培养液: 对照组(25mmol/L 葡萄糖), 高糖组(55mmol/L 葡萄糖), Exenatide 用药 1 组(55mmol/L 葡萄糖, 0.1mg/L Exenatide), Exenatide 用药 2 组(55mmol/L 葡萄糖, Exenatide 0.5mg/L), Exenatide 用药 3 组(55mmol/L 葡萄糖, 1mg/L Exenatide), 阻断剂 1 组[55mmol/L 葡萄糖, 0.1mg/L Exenatide, 1 $\mu$ mol/L Exendin (9-39)], 阻断剂 2 组[55mmol/L 葡萄糖, 0.5mg/L Exenatide, 1 $\mu$ mol/L Exendin (9-39)], 阻断剂 3 组[55mmol/L 葡萄糖, 1mg/L Exenatide, 1 $\mu$ mol/L Exendin (9-39)]。按最佳造模时间培养后, 按以上步骤测算出细胞存活率。

统计学分析: 采用 SPSS 13.0 统计分析软件包进行数据分析。实验数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 根据数据特征各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行分析, 两两比较采用 Student-Newman-Keul (SNK-q)法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RGCs 的鉴定和 GLP-1R 的表达** 用大鼠 RGCs 的特异标记物 Thy-1.1 的单克隆抗体标记培养 72h 的 RGCs, 荧光显微镜下可见多数细胞膜及突起均有明显绿色荧光染色, 细胞核区染色较淡, 细胞形态清晰(图 1A)。RGCs 周边被抗 Thy-1 荧光染色的效果更加明显。荧光显微镜下可见绿色荧光染色显示于细胞膜及神经轴突, 细胞核区无染色, 可见 GLP-1R 表达于 RGCs(图 1B)。

**2.2 高糖对 RGCs 存活率的影响** 对照组为参照细胞存活率(%)。CCK-8 测定 RGCs 对照组(25mmol/L)和高糖组(55mmol/L)不同培养时间的细胞生长抑制率, 结果显示对照组、高糖 24, 48, 72h 细胞存活率分别为(100.0 $\pm$ 16.19)%, (95.12 $\pm$ 9.219)%, (56.39 $\pm$ 8.710)%, (47.20 $\pm$ 5.492)%。统计学处理显示对照组与高糖组(高糖 48, 72h)间数据比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 高糖对 RGCs 呈时间相关性抑制其生长, 其最佳造模的培养时间为 48h。

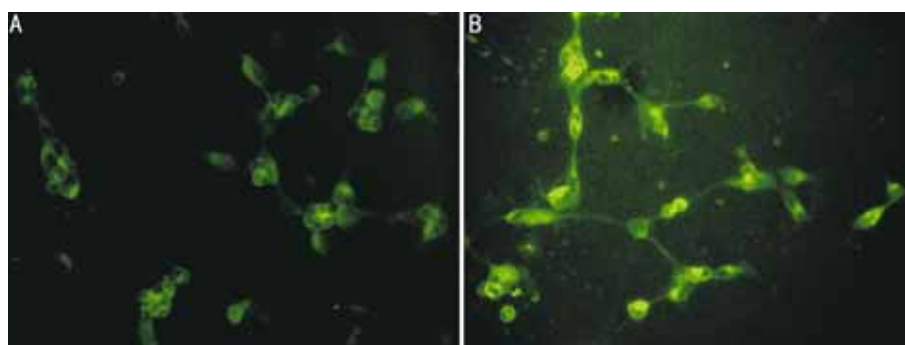


图1 大鼠 RGCs 的免疫荧光检测(免疫荧光染色 ×400) A:RGCs 的 Thy-1;B:RGCs 的 GLP-1R。

表1 Exenatide 对 RGCs 的保护作用

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

	对照组	高糖组	Exenatide 1 组	Exenatide 2 组	Exenatide 3 组	阻断剂 1 组	阻断剂 2 组	阻断剂 3 组
存活率	184.1 ± 29.03 <sup>a</sup>	100.0 ± 29.75	111.4 ± 43.73	151.0 ± 35.30 <sup>a</sup>	138.3 ± 43.87 <sup>a</sup>	90.81 ± 29.49	85.21 ± 25.21	100.5 ± 26.73

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs 高糖组。

**2.3 Exenatide 对 RGCs 的保护作用** 以单纯高糖组为参照细胞存活率(%)。高糖培养细胞的存活率较对照组明显下降( $P < 0.05$ )。而加用 Exenatide 后随着药物的浓度的提高细胞存活率也逐渐提高,用药组(0.1, 0.5 和 1mg/L 的 Exenatide) 细胞存活率分别为(111.4 ± 43.73)%, (151.0 ± 35.30)%, (138.3 ± 43.87)%。0.5mg/L 和 1mg/L 与单纯高糖组相比有显著统计学差异( $P < 0.05$ ), 但用药浓度达到 0.5mg/L 时继续提高用药浓度时细胞存活率差异不明显(表 1)。应用阻断剂组可以看出 Exendin (9-39) 基本可以阻断 0.5mg/L Exenatide 所起的药效。

### 3 讨论

视网膜是由血管和神经元组成的复杂结构,随着研究不断的深入,研究者发现神经视网膜病变是发生在血管病变之前,即在眼底血管病变出现之前,糖尿病患者即已出现视觉功能、视网膜电图异常及神经元凋亡等改变<sup>[5-7]</sup>;有实验结果表明,患糖尿病 2d 的大鼠可出现视网膜电图的异常<sup>[8]</sup>。

视网膜中,RGCs 是分化最早的神经元,占视网膜神经组织的大部分,RGCs 在视觉信号的感受、加工处理和传导过程中起重要作用。由于 RGCs 的轴突特别长(图 1),所以在很多疾病中其很容易受到损伤。RGCs 损伤是 DR 及青光眼为代表的视网膜病变中的重要环节,保护视网膜神经细胞会延缓 DR 的发生<sup>[1,9]</sup>。

本实验选用的药物为 Exenatide,它是一种降糖的新药,主要成分为 Exendin-4,具有肠促胰岛素分泌激素类似物效应。现已证实 Exendin-4 是一种 GLP-1 受体激动剂,它可在体内外与 GLP-1R 结合并激活该受体,进而引起一系列的细胞内反应,促进胰腺 β 细胞葡萄糖依赖性分泌胰岛素、抑制胰高血糖素的过量分泌并且能够延缓胃排空等。近期大量的研究表明,GLP-1R 不仅分布于胰腺,在神经系统也广泛表达并起到保护作用。已经有实验证明了 Exendin-4 对多种神经组织的保护作用,并且 Exendin 很稳定并能通过血-脑屏障。在维生素 B<sub>6</sub> 损害周围神经的实验中,Perry 等<sup>[10]</sup>证实了 Exendin-4 呈剂量依赖性地改善了大鼠功能(行为)损害,并维持坐骨神经纤维和背根神经节胞体的形态,维持神经纤维的完整性。研究还发现

Exendin-4 可以完全抑制谷氨酸盐所引起的海马神经细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。脑梗的模型中,Li 等<sup>[3]</sup>发现 Exendin-4 能减小梗死灶和改善运动功能,并保护由 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6 四氢吡啶诱导的帕金森病模型中的多巴胺能细胞。这些也充分证明了 Exendin-4 作为一种神经保护剂的价值。

虽然有研究发现,视网膜内层上存在 GLP-1 受体,Exendin-4 可以防止糖尿病大鼠的视网膜细胞的损失和维持正常视网膜的厚度<sup>[12]</sup>。张茸等<sup>[13]</sup>研究发现,玻璃体内植入 GLP-1 缓释珠对视神经夹伤的大鼠 RGCs 具有保护作用,提高了 RGCs 存活率。但并没有体外实验支持,也未证实 GLP-1R 表达于 RGCs。GLP-1R 是 GLP-1R 激动剂的作用靶点,是研究的关键。

本实验应用免疫荧光证明了 RGCs 表达 GLP-1R(图 1B),并应用高糖作为细胞凋亡诱导剂建立 RGCs 凋亡模型,验证了 Exenatide 对 RGCs 的保护作用(表 1)。且 Exenatide 可促进 RGCs 的存活,并且在高糖培养下随着药物浓度的提高细胞存活率也逐渐提高。而这种对 RGCs 的保护作用与 GLP-1 对其它神经组织的保护作用的机制可能是类似的。GLP-1R 激动剂与神经细胞膜上的受体结合,其胞内效应是增加了细胞内环磷酸腺苷(cAMP)并维持了细胞内钙离子的稳定<sup>[11,14]</sup>。这也符合许多内源性神经细胞保护物质的共同通路——通过影响激活 cAMP 相关蛋白的磷酸化激活。

综上所述,本实验通过体外成功培养、纯化 RGCs,并构造了高糖致 RGCs 损害的细胞模型,结果显示高糖可导致 RGCs 损伤;作为降糖药的 Exenatide 是一种良好的神经保护剂,可以抑制高糖引起的 RGCs 损伤,而这种保护作用可能是通过 RGCs 细胞表达 GLP-1R 来实现的。临床应用 Exenatide 在降糖同时可能对糖尿病视网膜病变有治疗价值。

### 参考文献

- Zhang J, Wu Y, Jin Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(2):732-742
- Cabou C, Campistron G, Marsollier N, et al. Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 2008;57(10):2577-2587

- 3 Li Y, Perry T, Kindy MS, *et al.* GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(4):1285-1290
- 4 Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, *et al.* Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1988;1(9):791-803
- 5 Jackson GR, Barber AJ. Visual dysfunction associated with diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2010;10(5):380-384
- 6 Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(2):1156-1163
- 7 Bearnse MA Jr, Han Y, Schneck ME, *et al.* Local multifocal oscillatory potential abnormalities in diabetes and early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(9):3259-3265
- 8 Phipps JA, Fletcher EL, Vingrys AJ. Paired-flash identification of rod and cone dysfunction in the diabetic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(12):4592-4600
- 9 Zhang Y, Zhang J, Wang Q, *et al.* Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(1):278-285
- 10 Perry T, Holloway HW, Weerasuriya A, *et al.* Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy. *Exp Neurol* 2007;203(2):293-301
- 11 Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, *et al.* Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(3):881-888
- 12 Zhang Y, Wang Q, Zhang J, *et al.* Protection of exendin-4 analogue in early experimental diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(5):699-706
- 13 张茸,徐亮,刘玉军,等. 胰高血糖素类肽-1 缓释珠对大鼠视网膜神经节细胞的保护作用. *眼科* 2009;18(6):414-418
- 14 Gilman CP, Perry T, Furukawa K, *et al.* Glucagon-like peptide 1 modulates calcium responses to glutamate and membrane depolarization in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2003;87(5):1137-1144

## 热烈祝贺《International Journal of Ophthalmology》 与汤森路透正式合作

——采用国际一流的在线投审稿系统 ScholarOne Manuscripts

《International Journal of Ophthalmology》(英文版)为进一步促进国内外眼科界的学术交流及国际化发展,让作者更方便地投稿和跟踪审稿进度,让编委和审稿人更轻松管理审稿任务和决策,采用汤森路透 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿平台。

汤森路透是全球领先的专业信息和在线 workflow 平台提供商,是科学引文索引(SCI)的出版者。汤森路透 ScholarOne Manuscripts 是世界领先的在线投审稿系统,特点包括:

- 作者在线管理投稿,随时在线查询审稿进度,方便获得审稿意见反馈。
- 流畅规范的审稿流程管理和 Web of Science 智能信息支持,提高审稿速度和质量。
- 和 EndNote 参考文献管理和撰稿工具的集成,方便快捷投稿。
- 全球 3000 多种期刊,1300 多万审稿人和作者的选择。
- 历经 10 年多的创新和升级,代表全球科技期刊在线投审稿的最佳实践。

《International Journal of Ophthalmology》(英文版)基于 ScholarOne Manuscripts 的投审稿平台现已正式开通.请访问 <http://mc03.manuscriptcentral.com/ijo> 让您的优秀成果更快发表!

**请注意:此系统只接受全英文文章,欢迎您投稿!**

联系《International Journal of Ophthalmology》  
电话:(+8629)82245172  
期刊主页:www.ijo.cn