论著

文章编号:1000-5404(2006)22-2240-03

RGCs缺氧条件下钙离子水平动态变化及与TNF-α及脂质过氧化反应的关系研究

陈 鹏,贺翔鸽 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨体外培养大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs),在缺氧条件下细胞质内游离钙离子水平动态变化规律及与培养液中TNF-α含量及脂质过氧化反应的关系。**方法** 正常对照组RGCs在常规条件下培养、缺氧组在1%氧浓度下培养1、3、12、24 h。采用激光扫描共聚焦技术检测RGCs细胞质游离钙离子水平、黄嘌呤氧化酶法和硫代戊巴比妥酸法检测培养液SOD活性和MDA含量、TNF-α水平检测采用酶标双抗夹心免疫吸附法(ELISA)。**结果** 正常对照组RGCs细胞质钙离子水平无显著变化,缺氧组RGCs细胞质内游离钙离子荧光强度急剧升高,缺氧12 h达平台期,较正常对照组显著升高($P<0.01$)。缺氧组细胞培养液SOD活性随缺氧时间延长显著降低,MDA含量及TNF-α含量显著升高($P<0.01$)。**结论** 体外培养RGCs在缺氧条件下其细胞细胞质内游离钙离子水平呈上升趋势,其表达变化与缺氧时培养液中脂质过氧化反应逐渐增强、TNF-α水平上升及RGCs抗氧化能力降低有关。

关键词: 视网膜神经节细胞;钙离子;超氧化物歧化酶;丙二醛;TNF-α

中图法分类号: R322.91;R329.26;R364.4 **文献标识码:** A

Dynamic changes of calcium ions in retinal ganglion cells exposed to hypoxia and their relationship with TNF-α and lipid peroxidation

CHEN Peng, HE Xiang-ge (Department of Ophthalmology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of retinal ganglion cells (RGCs) exposed to hypoxia and the mechanism. **Methods** RGCs were isolated from the retina of neonatal Long Evans rats aged 1 day and cultured, then divided into normal control group and hypoxia group (cultured in incubator containing 1% O_2, 5% CO_2 and 94% N_2). At 1, 3, 12 and 24 h after incubation, the calcium ion level by laser scanning confocal fluorescence microimaging system, the activity of SOD and the content of MDA by biochemistry technology, TNF-α by ELISA were detected. **Results** No changes of calcium ion level in RGCs were observed in normal control group. The calcium ion level increased significantly in the hypoxia group ($P<0.01$). The activity of SOD decreased dramatically and the content of MDA, TNF-α increased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** Exposed to hypoxia, the calcium ion level of RGCs increased dramatically, which had close relationship with the increased lipid peroxidation, the increased TNF-α and the decreased anti-oxidation of RGCs.

Key words: RGCs; calcium ions; SOD; MDA; TNF-α

视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)是视网膜内层的主要组成部分,RGCs轴突形成轴索穿出眼球组成视神经,由视神经将RGCs感受到的光刺激信息传递至大脑枕叶完成视功能,因此,RGCs在视觉系统中具有特殊的意义[1]。RGCs对缺氧十分敏感,即使缺氧时间很短也会造成损伤[2]。本研究采用激光扫描共聚焦技术、生物化学法及ELISA法检测缺氧时RGCs细胞质游离钙离子水平、培养液中TNF-α含量及脂质过氧化反应的变化,探讨钙离子在RGCs缺氧中的变化及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Flu-3/AM钙离子指示剂、胎牛血清、Hanks液、DMEM/F12培养基(美国Gibco公司),多聚赖氨酸(美国Sigma公司),SOD活性检测试剂盒、MDA含量检测试剂盒(南京建成生物工程研

作者简介:陈 鹏(1977-),男,云南省昆明市人,硕士,住院医师,主要从事青光眼及糖尿病视网膜病变预防和治疗方面的研究。电话:(023)66717835, E-mail: chpeng163@163.com

收稿日期:2005-12-08;修回日期:2006-06-28

究所），TNF-α 检测试剂盒（深圳晶美生物工程有限公司）。

1.2　实验动物

采用出生 1 d 内的清洁级 Long Evans 新生大鼠，雌雄不拘，购于第三军医大学大坪医院实验动物中心。

1.3　实验方法

1.3.1　视网膜 RGCs 的分离和培养　　将新生幼鼠浸泡于 75% 乙醇中处死，立即摘除眼球置于含 500 U/ml 青霉素的 Hanks 液中漂洗 3～5 次，在解剖显微镜下钝性分离法取得视网膜神经上皮层，置入含 0.125% 胰蛋白酶的 PBS 液中，37 ℃消化 20 min，加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清液后再加入适量 DMEM/F12 培养液，用钝头吸管轻轻吹打细胞团块，调整细胞悬液密度以 4×10^5 个/孔的密度接种于含 20 mm×20 mm 盖玻片（预先 10% 多聚赖氨酸包被）的 6 孔培养板中，放入常规 CO_2 培养箱中培养，24 h 后加入 10 μmol/L 阿糖胞苷的培养液以抑制非神经细胞增殖，作用 24 h 后换半量培养液，然后进行缺氧实验及正常对照实验。

1.3.2　分组及方法　　RGCs 缺氧处理：将同时取材相同处理、细胞贴壁良好的 6 孔培养板 8 个分为正常对照组 4 个和缺氧组 4 个。正常对照组 4 个 6 孔培养板放入 CO_2 培养箱继续培养，不加干扰因素，观察时相点分别为 1、3、12、24 h。缺氧组 4 个 6 孔培养板分别放入 4 个含密封胶圈的缺氧实验盒中，将针头插入位于进气口的密封橡皮塞，实验盒另一端出气口密封橡皮塞插入另一针头作为出气孔，通过进气针头向实验盒内充入含 1% O_2、5% CO_2 和 94% N_2 的混合气体（重庆三峡气体厂），持续 10 min，使实验盒内达到相对缺氧状态。先拔出气针头，然后拔进气针头，将缺氧实验盒放入 CO_2 细胞孵箱保持温度，分别在 1、3、12、24 h 后收获正常对照组及缺氧组神经节细胞及培养液，进行指标检测，每组每观察点为 1 个培养板 6 孔检测取均值。

1.4　观察指标

1.4.1　RGCs 形态学观察　　分别在倒置显微镜下进行正常对照组和缺氧组 RGCs 的形态学变化观察。

1.4.2　RGCs 细胞质内游离钙离子水平检测　　将在细胞爬片上贴壁培养的神经节细胞经 0.01 mol/L PBS 缓冲液冲洗 3 次，于 37 ℃条件下用 Fluo-3/AM（终浓度 10 μmol/l）负载 30 min，PBS 冲洗 3 次后将培养皿置于 ACAS570 载物台上，在 Leica TCS NT 激光共聚焦显微镜（激发波长 568 nm，发射波长 590 nm）下观察并摄像。共聚焦系统由 Bio-Rad 公司 MRC-1024 提供的 Time-Course/Ratiometric 软件控制，每细胞爬片选 5 个视野，每视野取细胞 6 个，以平均荧光强度变化反映每时相点细胞质内游离钙离子水平。

1.4.3　培养液 SOD 活性、MDA 含量及 TNF-α 含量检测　　检测标本为各组培养液上清，黄嘌呤氧化酶法测 SOD 活性，硫代戊巴比妥酸法测 MDA 含量，按试剂盒说明书操作。TNF-α 检测采用双抗体夹心酶联免疫吸附法（ELISA），用抗人 TNF-α 单抗包被于酶标板上，标准品和样品中的 TNF-α 与单抗结合，加入生物素化的抗人 TNF-α 抗体，形成免疫复合物连接在板上，SABC 与生物素结合，酶底物 OPD 显色，浓硫酸终止，492 nm 测吸光度，与标准曲线对比测出标本 TNF-α 含量。

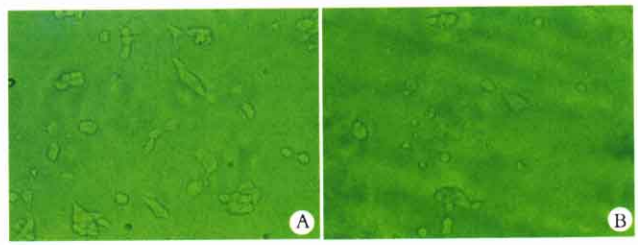
1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SSPS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　RGCs 缺氧后形态学变化观察结果

倒置相差显微镜下观察见正常对照组 RGCs 形态正常，细胞轴突伸展，数目较多，粗细长短不等，交织呈网状。缺氧组 RGCs 轴突生长缓慢，随缺氧时间延长，可见轴突消失及断裂，细胞胞体变圆皱缩，贴壁细胞脱落，缺氧 24 h 时可见细胞碎片，细胞数量明显减少。见图 1。



A：正常组；B：缺氧组

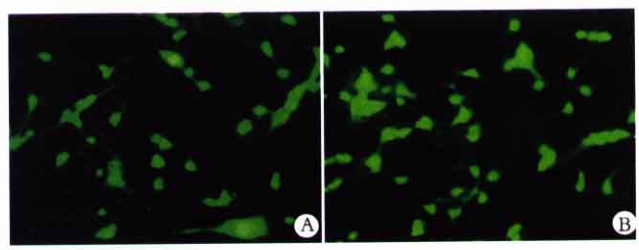
图 1　2 组大鼠 24 h 后 RGCs 形态观察　（倒置相差显微镜×200）

2.2　RGCs 游离钙离子水平检测结果

正常对照组培养 1、3、12、24 h 时细胞质钙离子水平无显著变化。缺氧组 RGCs 缺氧培养 1 h 后细胞质内游离钙离子荧光强度即出现升高，这种增高在缺氧培养 3 h 就已变得甚为明显，此后持续升高，缺氧 12 h 达到平台期。见图 2、表 1。

2.3　培养液 SOD 活性、MDA 含量及 TNF-α 含量检测结果

正常对照组 1 h 培养液 SOD 活性为（74.3±6.7）mU/L，MDA 含量为（1.46±0.11）μmol/L，此后无显著变化。缺氧组随缺氧时间延长 SOD 活性显著降低，MDA 含量显著升高（$P<0.01$）。正常对照组 1 h 时 TNF-α 含量为（0.387±0.031）μg/L，此后变化不显著，缺氧组 TNF-α 含量随缺氧时间延长显著升高。见表 1。



A：正常组；B：缺氧组

图 2　2 组大鼠 RGCs 12 h 钙离子水平激光共聚焦检测结果　（×200）

表1 RGCs细胞质内游离钙离子荧光强度及培养液检测指标变化（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	钙离子荧光强度	SOD活性（mU/L）	MDA含量（μmol/L）	TNF-α含量（μg/L）
正常对照组1 h	0.432±0.042	74.3±6.7	1.46±0.11	0.387±0.031
缺氧组1 h	0.562±0.052[a]	68.5±7.3[a]	1.81±0.15[a]	0.436±0.044[a]
正常对照组3 h	0.443±0.052	76.2±8.3	1.51±0.15	0.405±0.045
缺氧组3 h	0.713±0.067[b]	55.4±6.2[b]	2.47±0.29[b]	0.547±0.055[b]
正常对照组12 h	0.421±0.033	75.9±8.8	1.44±0.18	0.411±0.051
缺氧组12 h	0.914±0.081[b]	44.5±5.1[b]	3.77±0.39[b]	0.678±0.104[b]
正常对照组24 h	0.440±0.041	77.2±5.9	1.49±0.09	0.382±0.029
缺氧组24 h	0.982±0.095[b]	37.8±3.7[b]	4.45±0.42[b]	0.805±0.111[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，和正常对照组比较

3 讨论

钙离子是重要的细胞内信使，其作用的分子基础是与钙调素（CaM）结合形成Ca-CaM复合物，激活其靶酶[3]。钙离子被称为神经生理学家的“DNA”，作为细胞内的重要信使，参与神经递质的合成与释放、神经兴奋性的维持、突触的可塑性及多种酶的活动[4]。有实验表明，在体实验缺氧早期RGCs的膜变化和Ca^{2+}内流主要由L型钙通道开放有关[5]。本实验中，培养RGCs缺氧处理后1 h可见神经节细胞细胞质Ca^{2+}的明显升高，而正常对照组并未发现Ca^{2+}有明显的升高，推测其Ca^{2+}的升高主要也是来自L型钙通道的钙释放所致。有实验证明L型钙通道继发性损伤是导致RGCs死亡或凋亡的重要原因，在目前公认的损伤因子（乙酰胆碱、Ca^{2+}、儿茶酚胺、兴奋性氨基酸、内源性阿片肽、氧自由基、缓激肽、5-经色胺）中，Ca^{2+}是最受重视的一个内源性脑损伤因子[4]。

缺氧引起细胞质内钙超载的具体原因目前仍不十分清楚，但普遍认为与Na^{+}/Ca^{2+}交换系统的激活、促使自由基生成，膜损伤后的钙漏流以及ATP的耗竭、钙泵活动的减弱等有密切关系。钙离子水平的上升使细胞膜中的蛋白质代谢障碍、细胞核固缩、细胞变形，钙超载还激活钙依赖性磷脂酶、蛋白激酶和内切酶，促进膜磷脂分解，自由基大量生成使DNA裂解，诱导细胞凋亡。可见胞内钙超载是细胞骨架破坏、细胞脂质膜受损、细胞肿胀甚至死亡/凋亡的主要原因[6]。此外，神经细胞的钙超载将触发细胞内一系列特异反应：激活磷脂酶A_2，降解磷脂，导致花生四烯酸生成增多，进一步代谢为前列腺素、血栓烷、白三烯，促使氧自由基形成，启动膜脂质过氧化。如此不仅造成RGCs的非特异性损伤，还促使兴奋性氨基酸的释放。游离钙与钙调蛋白结合后激活蛋白酶和核酸内切酶，导致神经丝降解、微管解聚、细胞骨架破坏[6]。此外，钙离子与胞内线粒体膜结合后，能阻断线粒体电子转递，从而阻断ATP能量产生。这些反应都将直接或间接造成RGCs的损伤，细胞所处环境恶化，营养物资供应不足及多种炎性因子水平上升。导致细胞内平衡紊乱，脂质过氧化反应增强，抗氧化酶系保护作用减弱，最终导致RGCs不可逆损伤。

本实验中，体外培养RGCs在正常培养条件下钙离子水平稳定，在缺氧条件下，RGCs细胞质内游离钙离子水平强烈上升，缺氧12 h即达平台期。而且RGCs受长时间缺氧刺激后，部分细胞变性、凋亡或坏死，释放出细胞内各种炎性因子，更导致培养环境急剧恶化，因此，在较长时间的缺氧后钙离子超载与细胞所处环境恶化，营养物资供应不足及多种炎性因子水平上升有关，如TNF-α水平的上调等，以上变化又导致细胞能量利用率急剧降低，生物合成减缓或终止。RGCs缺氧损伤后自由基水平增加，脂质过氧化物反应水平增强，细胞本身防御机制遭到破坏，超氧化物歧酶大量因消耗和破坏而减少，必然对RGCs的抗氧化能力产生一定的损伤[7]，因此可以推测脂质过氧化反应的加强与钙离子迅速达平台期有一定关系。

参考文献：

[1] 姚 静，徐格致. 视网膜神经节细胞的保护和修复[J]. 眼科研究，2004，22(6)：662－665.

[2] 潘晓晶，王传富. 青光眼视网膜神经节细胞损伤的研究进展[J]. 中国实用眼科杂志，2002，20(1)：11－15.

[3] YARAEI K，CAMPBELL L A，ZHU X，*et al*. Chlamydia pneumoniae augments the oxidized low-density lipoprotein-induced death of mouse macrophages by a caspase-independent pathway[J]. Infect Immun，2005，73(7)：4315－4322.

[4] SCHUSTER C，WILLIAMS L M，MORRIS A，*et al*. The human MT1 melatonin receptor stimulates cAMP production in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells *via* a calcium-calmodulin signal transduction pathway[J]. J Neuroendocrinol，2005，17(3)：170－178.

[5] GRUOL D L，NETZEBAND J G，QUINA L A，*et al*. Contribution of L-type channels to Ca^{2+} regulation of neuronal properties in early developing purkinje neurons[J]. Cerebellum，2005，4(2)：128－139.

[6] MISHRA J P，MISHRA S，GEE K，*et al*. Differential involvement of calmodulin-dependent protein kinase II-activated AP-1 and c-Jun N-terminal kinase-activated EGR-1 signaling pathways in tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced CD44 expression in human monocytic cells[J]. J Biol Chem，2005，280(29)：26825－26837.

[7] LIOU S F，WU J R，LAI W T，*et al*. The vasorelaxing action of labedipinedilol-A involves endothelial cell-derived NO and eNOS expression caused by calcium influx[J]. J Cardiovasc Pharmacol，2005，45(3)：232－240.

（编辑 周 芳）