doi:10.11659/jjssx.06E020053

·基础研究·

视网膜 Müller 细胞中谷氨酸受体 2 的表达分析

杨 梅[1],胡秋梅[2],黄艳明[1] (1.陆军军医大学第二附属医院眼科,重庆 400037;2.陆军军医大学大坪医院眼科,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 明确谷氨酸受体 2(GluR2)在大鼠视网膜 Müller 细胞中的表达情况,为视网膜胶质细胞的神经保护作用提供新的研究靶点。**方法** 采用新生(1~2 d)的 SD 大鼠视网膜组织原代培养 Müller 细胞,通过免疫荧光染色 Vimentin 鉴定传代培养的 Müller 细胞纯度;取新生(1~2 d)的 SD 大鼠大脑皮质作为阳性对照组,Müller 细胞作为实验组。采用 Real-Time PCR 和 Western blot 检测 2 组中 GluR2 mRNA 和蛋白表达情况。**结果** 传代培养到第 3 代的 Müller 细胞纯度达 95%;阳性对照组 GluR2 的 mRNA 表达水平为(100±17.34)%,蛋白表达水平为(100±14.28)%;实验组 GluR2 的 mRNA 表达水平为(86.47±19.23)%,蛋白表达水平为(82.82±11.34)%。**结论** 体外培养的视网膜 Müller 细胞中有 GluR2 的 mRNA 和蛋白表达。

[关键词] 视网膜;神经保护;谷氨酸;神经元;Müller 细胞

[中图分类号] R774 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-06-12

Expression of glutamate receptor 2 in retinal Müller cells

YANG Mei[1],HU Qiu-mei[2],HUANG Yan-ming[1] (1. Department of Ophthalmology,Second Affliated Hospital of Army Medical University,Chongqing 400037, China; 2. Department of Ophthalmology, Daping Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400042,China)

Abstract: Objective To explore the expression of Glutamate receptors 2 (GluR2) in the Müller cells of the rat retina,providing a new research target for the neuroprotective effect of retinal glial cells. **Methods** Retinal tissues of Sprague Dawley (SD) rats born 1 to 2 days were used for the primary cell culture of Müller cells and Immunofluorescence staining was used to identify the purity of subcultured Müller cells with Vimentin. The cerebral cortices of SD rats born 1 to 2 days were taken as the positive control group,and Müller cells were taken as the experimental group. Real-Time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot were used to detect the expression levels of GluR2 mRNA and its protein. **Results** The purity of the tertiary-culture Müller cells was 95%. GluR2 mRNA and protein in the positive control group were (100±17.34)% and (100±14.28)%,these in the experimental group were (86.47±19.23)% and (82.82±11.34)% respectively. **Conclusion** GluR2 mRNA and protein were detected in in-vitro cultured retinal Müller cells.

Keywords: retina;neuroprotection;glutamate;neurons;Müller cell

α-氨基-3 羧基-5 甲基-4 异恶唑丙酸受体(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor,AMPAR)是一类离子型谷氨酸受体(Glutamate receptors,GluR),由谷氨酸受体 GluR1、GluR2、GluR3、GluR4 4 个亚单位组成,在细胞的粗面内质网中形成[1]。其中,GluR2 有阻止钙离子通道开放的作用,在基因表达、RNA 编辑、AMPAR 的合成和运输方面均起到重要的调控作用[2-3]。有研究认为,如果神经元的 GluR2 表达下降,其更容易受到谷氨酸神经毒性的损伤[3]。因此,GluR2 是神经保护的重要调节靶点,已经成为了该领域研究的热点。研究显示,在视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell,RGC)、无长突细胞、双极细胞等神经元中均有GluR2的表达,且其在神经元树突棘的形成、突触的形成及神经元的存活中均发挥着重要的病理生理作用[4-6]。除了神经元外,视网膜中还有大量的神经胶质细胞,包括小胶质细胞、星型胶质细胞、Müller 细胞等,对维持视网膜的结构和功能也起着重要的作用。其中,Müller 细胞是视网膜中数量最多的胶质细胞,是连接 RGC 与微环境之间的桥梁,对 RGC 有重要的营养支持和神经保护作用[7-8]。但关于 Müller 细胞中有无 GluR2 表达尚未可知。本研究主要探讨 GluR2 在 Müller 细胞中的表达情况,旨在为视网膜胶质细胞的神经保护功能提供新的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

新生(1~2 d)的 SD 大鼠由陆军军医大学第二附属医院医学中心实验动物中心提供。本实验经陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准,批准号:

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81600758)

[通信作者] 黄艳明,E-mail:huangyanm7@aliyun.com

SCXK(PLA)20120031。主要试剂:高糖 DMEM 培养基(Hyclone 公司,美国),胎牛血清(BI 公司,以色列),0.25% 胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),小鼠抗波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体、兔抗 GluR2 多克隆抗体、小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(Abcom 公司,英国),DAPI(上海碧云天公司,中国),荧光二抗(594)标记羊抗小鼠 IgG(Thermo 公司,英国),RNA 提取及逆转录试剂盒(Promega公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 Müller 细胞原代培养 参考本课题组前期发表的文献进行 SD 新生大鼠视网膜 Müller 细胞原代培养[9]。新生大鼠腹腔注射 4.3% 的水合氯醛麻醉后,断头处死,无菌操作取出眼球后浸泡在高糖 DMEM + 1% 双抗的培养基中,于 37 ℃、5% CO_2 培养过夜。0.25% 胰蛋白酶液消化 1 h,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化,在高倍显微镜下分离视网膜,加入 DMEM 完全培养基(含 1% 双抗、10% 胎牛血清),反复吹打,制成细胞悬液,用 70 μm 滤网过滤,调整细胞密度按 3×10^5/mL 接种于培养瓶中,于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养,第 2 天换液,继续培养 6 ~ 8 d,细胞密度达到 80% 时予以传代,细胞传至 3 ~ 4 代可进行后续实验。

1.2.2 免疫荧光染色 Vimentin 鉴定 Müller 细胞纯度[9-10] 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;0.1% Triton 打孔15 min,PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;10% 山羊血清封闭 30 min。加入一抗(小鼠抗 Vimentin 单克隆抗体、兔抗 GluR2 多克隆抗体),4 ℃过夜,PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;加入荧光二抗(1∶300),室温避光孵育 1 h,PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min,DAPI 染色 15 min。Vimentin是 Müller 细胞的特异性蛋白,Vimentin 阳性表达的细胞即为 Müller 细胞,Müller 细胞纯度 = Vimentin 阳性细胞数/DAPI 总数 ×100%。

1.2.3 Real-Time PCR 检测 GluR2 mRNA 表达 参照文献[11]提取 RNA,按 Takara 试剂盒(RR047A,日本)说明书逆转录成 cDNA。依次加入无核酸酶、高纯水 2 μL,Mix 5 μL,oligol$(dT)_{18}$引物,上下游引物各 0.5 μL,cDNA 2 μL,GAPDH 作为内参。GluR2 上游引物序列:AATCTCCTCCTACACGGCTAACTT,下游引物序列:GACTCTGGCTACTCCTTCTGC;GAPDH 上游引物序列:GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC,下游引物序列:TGTCATTGAGAGGACCTGCCAGC,所有引物购于重庆擎科生物技术有限公司。qPCR 反应条件:预变性95 ℃、10 min,变性 95 ℃、15 s,循环 39 次,退火 57 ℃、1 min,延伸 65 ℃、5 min,Bio-RAD CFX Maestro 软件(美国)对 Real-Time PCR 结果进行相对定量。

1.2.4 Western blot 检测 GluR2 蛋白表达 文献报道大鼠的脑皮质有 GluR2 mRNA 和蛋白表达[12-13],因此本研究将其作为阳性对照组,传代培养到第 3 代的 Müller 细胞作为实验组。具体方法参考文献[14],配制 8% SDS-PAGE 胶,以 40 μg/μL 的蛋白浓度上样电泳,转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,分别加入一抗(兔抗 GluR2 多克隆抗体 1∶5 000,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 1∶5 000),4 ℃摇床孵育过夜。分别加入二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 5 min,ECL 显色,Omega Lum G 凝胶成像仪曝光,GAPDH 作为内参,分别用 Image J 软件测量 GluR2 条带和 GAPDH 条带的灰度值,GluR2 蛋白表达 OD 值 = GluR2 条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

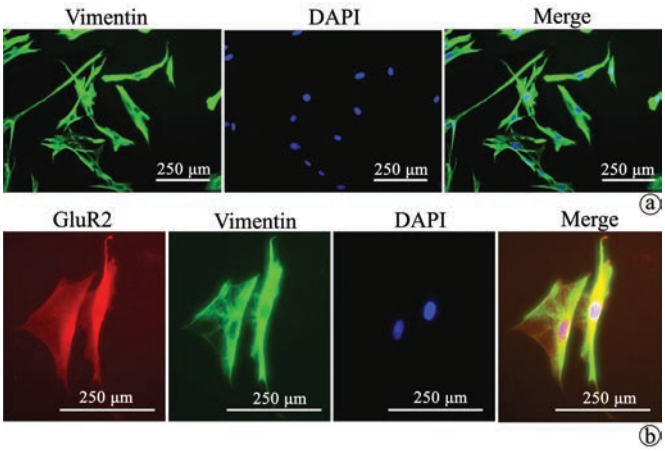
1.3 统计学分析

用 SPSS 19.0 对数据进行处理,*Kolmogorov-Smimov* 检测数据是否呈正态分布,经 *Levene* 检验方差齐性。方差齐、呈正态分布数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验,否则用非参数检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,$P<0.01$ 表示差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 传代培养的 Müller 细胞中 GluR2 免疫荧光表达

Müller 细胞免疫荧光纯度鉴定结果显示,原代培养的 Müller 细胞传至 3 代后,95% 以上的细胞可表达 Müller 细胞的特异性蛋白 Vimentin,细胞纯度 >95%,见图 1a。Müller 细胞免疫荧光双染色结果显示,同一细胞中有 Vimentin 和 GluR2 2 种荧光阳性表达,GluR2 的荧光主要表达在细胞膜及胞浆中(图 1b)。

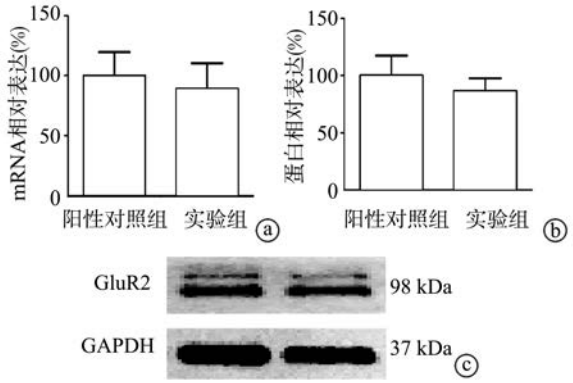


a:Müller 细胞纯度鉴定;b:Müller 细胞的 Vimentin 和 GluR2 共染色 绿色:Vimentin;红色:GluR2;DAPI:核(蓝色)

图 1 Müller 细胞免疫荧光染色

2.2 Müller 细胞中 GluR2 mRNA 和蛋白表达

Real-Time PCR 结果显示,阳性对照组 GluR2 mRNA 相对表达量为(100 ± 17.34)%,实验组为(86.47 ± 19.23)%,2 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2a。Western blot 结果显示,阳性对照组 GluR2 蛋白相对表达量为(100 ± 14.28)%,实验组为(82.82 ± 11.34)%,2 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2b、c。



a:GluR2 mRNA 表达;b 和 c:GluR2 蛋白表达

图 2 Müller 细胞中 GluR2 mRNA 和蛋白表达水平

3 讨论

视网膜中主要有 3 种神经胶质细胞,即小胶质细胞、星型胶质细胞和 Müller 细胞,其中,Müller 细胞数量最多,也是视网膜中特有的,具有重要的病理、生理作用的细胞,一直是视网膜、视神经等疾病研究的热点。Müller 细胞横跨整个视网膜组织,维持着视网膜的基本结构,是视网膜整个内环境的重要组成部分,可以调控细胞外谷氨酸的浓度及 pH,维持 RGC 所处视网膜的整个微环境平衡[15]。Müller 细胞分泌的神经生长因子,如脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子、胰岛素样生长因子等,对视网膜中的神经元具有重要的神经保护和促进再生作用[16]。而 Müller 细胞的过度胶质激活又会形成胶质瘢痕,从而进一步损伤与之密切接触的视网膜神经元,造成 RGC 等细胞的死亡、轴突再生困难等。

GluR1、GluR2、GluR3、GluR4 的跨膜区和胞外结构非常相似,但是胞质侧的 C 端却不完全相同,由于 C 端可以和不同的蛋白相互作用,因此这 4 种亚单位所发挥的作用也不同[17]。有研究表明,GluR2 具有较低的钙离子通透性,而 GluR1、GluR3、GluR4 则具有较高的钙离子通透性[18]。而在一些视网膜疾病中,这 4 种亚单位表达也有差异。有研究在糖尿病视网膜病变动物模型中发现,内外丛状层 GluR2 的表达增加,而 GluR1 的表达没有明显变化[19]。以上结果说明,GluR2 在某些视网膜疾病中是一个特殊的病理角色,进一步研究其病理机制具有重要的意义。

本研究首次发现原代培养的视网膜 Müller 细胞有 GluR2 的表达,虽然其表达水平较脑皮质组织水平稍低,但鉴于 Müller 细胞在视网膜中的重要地位,我们推测,Müller 细胞的 GluR2 可能也具有十分重要的病理、生理作用,但需要进一步从分子机制、信号通路、物质交换等多层面研究探讨。

[参考文献]

[1] Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology[J]. Psychopharmacology (Berl), 2005, 179(1):4-29. doi:10.1007/s00213-005-2200-z.

[2] Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity[J]. Neuron, 2007, 54(6): 859-871. doi:10.1016/j.neuron.2007.06.001.

[3] Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, et al. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca^{2+}-permeable AMPA receptors in neurological disoders[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(10):464-470. doi:10.1016/s0166-2236(97)01100-4.

[4] Luo XG, Chiu K, Lau FH, et al. The selective vulnerability of retinal ganglion cells in rat chronic ocular hypertension model at early phase [J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(8):1143-1151. doi:10.1007/s10571-009-9407-1.

[5] Liu LL, Alessio EJ, Spix NJ, et al. Expression of GluA2-containing calcium-impermeable AMPA receptors on dopaminergic amacrine cells in the mouse retina[J]. Mol Vis, 2019, 25:780-790.

[6] Semkova I, Huemmeke M, Ho MS, et al. Retinal localization of the glutamate receptor GluR2 and GluR2-regulating proteins in diabetic rats [J]. Exp Eye Res, 2010, 90(2):244-253. doi:10.1016/j.exer.2009.10.012.

[7] Ruzafa N, Pereiro X, Lepper MF, et al. A proteomics approach to identify candidate proteins secreted by Müller glia that protect ganglion cells in the retina[J]. Proteomics, 2018, 18(11):e1700321. doi:10.1002/pmic.201700321.

[8] Katharina L, Joachim W. Activating the regenerative potential of Müller glia cells in a regeneration-deficient retina[J]. Elife, 2018, 7:e32319. doi:10.7554/eLife.32319.

[9] 杨 梅,范 围,黄 瑶,等. 一种改良的 Sprague Dawley 新生大鼠视网膜 Müller 细胞培养方法[J]. 新乡医学院学报,2019,36(9):815-818. doi:10.7683/xxyxb.2019.09.003.

[10] Lindenau W, Kuhrt H, Ulbricht E, et al. Cone-to-Müller cell ratio in the mammalian retina: a survey of seven mammals with different lifestyle[J]. Exp Eye Res, 2019, 181:38-48. doi:10.1016/j.exer.2019.01.012.

[11] Xiao Y, Zhao L, Kuang SX, et al. Inhibited expression of α4β2 nicotinic acetylcholine receptor in blood leukocytes of Chinese patients with vascular dementia and in blood leukocytes as well as the hippocampus of brain from Ischemic rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(8): 1377-1387. doi:10.1007/s10571-016-0337-4.

[12] 米 青. GluR2/GAPDH 干扰肽对氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠海马保护作用和机制的研究[D]. 济南:山东大学,2018.

doi:10.11659/jjssx.05E0200169

·基础研究·

ZKSCAN3 介导的自噬在急性镉暴露肝毒性中的作用

陈梦妍,谢 佳,田 丽,皮会丰 (陆军军医大学军事预防医学系军队劳动卫生学教研室/电磁辐射医学防护教育部重点实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨ZKSCAN3介导的自噬在急性镉暴露肝损伤中的作用。**方法** 取16只SPF级雄性小鼠(用于镉暴露实验),随机分成生理盐水组和镉暴露组,每组8只。镉暴露组小鼠腹腔注射氯化镉7 d,染毒剂量为2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot bw^{-1}$,染毒方式为每天腹腔注射1次;生理盐水对照组小鼠每日腹腔注射等量生理盐水1次,连续注射7 d。另取24只SPF级雄性C57BL/6J小鼠(用于AAV-TBG-ZKSCAN3干预实验),随机分为对照组、镉组、镉+ZKSCAN3组,每组8只。对照组尾静脉注射AAV-TBG-control,1周后连续腹腔注射等量生理盐水7 d;镉组尾静脉注射AAV-TBG-control,1周后连续腹腔注射2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot bw^{-1}$氯化镉7 d;镉+ZKSCAN3组尾静脉注射AAV-TBG-ZKSCAN3,1周后连续腹腔注射2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot bw^{-1}$氯化镉7 d。采集小鼠血清并摘取肝,苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肝组织病理变化,生化分析仪检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)含量,RT-PCR检测自噬相关基因及ZKSCAN3基因的表达,Western blot检测ZKSCAN3蛋白细胞质转位情况。**结果** 与对照组比较,急性镉暴露会导致小鼠肝细胞气球样变,炎症细胞浸润、坏死,ALT和AST表达显著增高($P<0.01$),镉暴露后肝组织中自噬溶酶体相关基因Map1lc3b、Rab5a、Atp6v0d1、Lamp1、Ctsb表达增多($P<0.01$),ZKSCAN3基因表达较少($P<0.01$)。镉暴露仅降低了细胞核ZKSCAN3蛋白的表达($P<0.01$),并未引起其细胞质转位($P>0.05$)。与镉组比较,ZKSCAN3过表达可以显著抑制镉暴露诱导的肝细胞自噬及肝细胞损伤($P<0.01$)。**结论** 急性镉暴露显著抑制肝细胞中ZKSCAN3蛋白的表达,从而诱导肝细胞自噬性死亡。

[关键词] 氯化镉;小鼠;肝毒性;ZKSCAN3;细胞自噬;镉暴露肝损伤

[中图分类号] R995 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-05-29

Effect of ZKSCAN3 mediated autophagy in acute cadmium exposure-induced liver injury

CHEN Meng-yan, XIE Jia, TIAN Li, PI Hui-feng (Department of Occupational Health, College of Preventive Medicine/Key Laboratory of Ministry of Education on Electromagnetic Radiation Protection, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ZKSCAN3 mediated autophagy in acute cadmium exposure-induced liver injury. **Methods** Sixteen SPF male mice (for the cadmium exposure experiment) were randomly divided into the normal saline group and cadmium exposure group, with 8 mice in each group. Mice in the cadmium exposure group were given intraperitoneal injection of cadmium chloride once a day for 7 days, with the dose of 2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot bw^{-1}$; while mice in the normal saline group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline once a day for 7 days. Another 24 SPF male C57BL/6J mice (for the AAV-TBG-ZKSCAN3 intervention experiment) were randomly divided into control group, cadmium group, cadmium + ZKSCAN3 group, with 8 mice in each group. The control group received tail vein injection

[基金项目] 国家自然科学基金(81703267)

[通信作者] 皮会丰,E-mail:pihuifeng2010@163.com

[13] 张小琴,侯丽颖,强国芳,等.片仔癀对局灶性脑缺血/再灌注大鼠皮质中NMDAR1和GluR2表达的影响[J].中国药理学通报,2019,35(2):288-292.doi:10.3969/j.issn.1001-1978.2019.02.028.

[14] Zeng Y, Shen YY, Hong L, et al. Effects of single and repeated exposure to a 50-Hz 2-mT electromagnetic field on primary cultured hippocampal neurons[J]. Neurosci Bull, 2017, 33(3):299-306. doi:10.1007/s12264-017-0113-6.

[15] Bringmann A, Wiedemann P. Müller glial cells in retinal disease[J]. Ophthalmologica, 2012, 227(1):1-19. doi:10.1159/000328979.

[16] Cao LH, Yu YC, Zhao JW, et al. Expression of natriuretic peptides in rat Müller cells[J]. Neurosci Lett, 2004, 365(3):176-179. doi:10.1016/j.neulet.2004.04.090.

[17] 张和平,周文霞,张永祥.AMPA受体的代谢[J].军事医学科学院院刊,2004,28(1):74-77.doi:10.3969/j.issn.1674-9960.2004.01.022.

[18] Tzschentke TM. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications-an introduction[J]. Amino Acids, 2002, 23(1-3):147-152. doi:10.1007/s00726-001-0120-8.

[19] Semkova I, Huemmeke M, Ho MS, et al. Retinal localization of the glutamate receptor GluR2 and GluR2-regulating proteins in diabetic rats[J]. Exp Eye Res, 2010, 90(2):244-253. doi:10.1016/j.exer.2009.10.012.

(编辑:左艳芳)