

引文格式: 马殿伟, 谢学军, 张梅, 万李. 补肾活血剂对高糖和(或)缺氧状态下共同培养视网膜神经节细胞和 Müller 细胞谷氨酸代谢的影响[J]. 眼科新进展, 2015, 35(5): 419-423. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0114

【实验研究】

# 补肾活血剂对高糖和(或)缺氧状态下共同培养视网膜神经节细胞和 Müller 细胞谷氨酸代谢的影响<sup>△</sup>

马殿伟 谢学军 张梅 万李

作者简介: 马殿伟, 男, 1975年4月出生, 博士, 主治医师。联系电话: 18908099898; E-mail: dr\_madianwei@163.com

About MA Dian-Wei: Male, born in April, 1975. MD. Tel: 18908099898; E-mail: dr\_madianwei@163.com

收稿日期: 2014-11-30

修回日期: 2015-01-10

本文编辑: 方红玲

△基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 81072485)

作者单位: 610041 四川省成都市, 武警四川总队医院成都分院五官科(马殿伟); 610075 四川省成都市, 成都中医药大学临床医学院眼科(谢学军); 610075 四川省成都市, 成都中医药大学临床药学院(张梅); 610075 四川省成都市, 成都中医药大学临床医学院(万李)

通讯作者: 谢学军, E-mail: xxj8848@163.com

Received date: Nov 30, 2014

Accepted date: Jan 10, 2015

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81072485)

From the Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Chengdu Hospital of Sichuan PAPF (MA Dian-Wei), Chengdu 610041, Sichuan Province, China; Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM (XIE Xue-Jun), Chengdu 610075, Sichuan Province, China; College of Pharmacy, Chengdu University of TCM (ZHANG Mei), Chengdu 610075, Sichuan Province, China; School of Clinical Medicine, Chengdu University of TCM (WAN Li), Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Responsible author: XIE Xue-Jun, E-mail: xxj8848@163.com

## Effects of BuShenSuoXue decoction on glutamate metabolism in retinal ganglion cells and Müller cells co-cultured in high glucose concentration or (and) hypoxic conditions

MA Dian-Wei, XIE Xue-Jun, ZHANG Mei, WAN Li

【Key words】 diabetic retinopathy; BuShenHuoXue; retinal Müller cells; retinal ganglion cells

【Abstract】 Objective To discuss the effects of BuShenSuoXue (BSHX) decoction on glutamate (Glu) metabolism in retinal ganglion cells and Müller cells co-cultured in vitro in high glucose concentration or (and) hypoxic conditions using serum pharmacology. Methods Serum with BSHX decoction was obtained by the serum pharmacology method of traditional Chinese medicine, Glu intake of the co-cultured cells was determined with intracellular [<sup>3</sup>H] labeled D, L-Glu concentration by isotopic techniques. The content of Glu in the extracellular fluid was detected with a full-automatic biochemical analyzer. Results The release of Glu of co-cultured cells in the hypoxic group and the combination of high glucose and hypoxic group were increased significantly in comparison to the control group at 48 hours (all  $P < 0.05$ ), and the release of Glu from co-cultured cells in the high glucose group was decreased significantly compared with the control group at 48 hours ( $P < 0.05$ ); The serum of BSHX decoction could therefore significantly decrease the release of Glu of co-cultured cells in the control group (at 24 hours, 48 hours and 72 hours), hypoxic group and high glucose and hypoxic group at 24 hours, 48 hours and 72 hours) (all  $P < 0.05$ ). The Glu intake of co-cultured cells in the hypoxic group, and the high glucose and hypoxic group were significantly reduced compared with the control group at 24 hours, 48 hours and 72 hours (all  $P < 0.05$ ), the Glu intake of co-cultured cells in the high glucose group strengthened compared with the control group at 24 hours and 72 hours (all  $P < 0.05$ ), but was lower than the control group at 48 hours ( $P < 0.05$ ); The serum of BSHX decoction could remarkably increase the Glu intake of co-cultured cells in the control group and hypoxic group at 24 hours and 48 hours, the high glucose concentration group at 48 hours and the high glucose and hypoxia group at 72 hours (all  $P < 0.05$ ). Conclusion The high glucose or (and) hypoxia can cause Glu metabolism dysfunction in the co-cultured retinal ganglion cells and Müller cells, this may be one of the protection mechanisms of BSHX to the retinal ganglion cells under high glucose concentration or (and) hypoxic conditions.

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 补肾活血剂; 视网膜 Müller 细胞; 视网膜神经节细胞

【摘要】 目的 应用中药血清药理学方法探讨补肾活血中药复方对体外共同培养的视网膜神经节细胞和 Müller 细胞谷氨酸 (glutamate, Glu) 代谢的影响。方法 氨基酸分析仪检测共同培养细胞外液中 Glu 释放量, [<sup>3</sup>H] 标记的 D, L-Glu 摄入量判断共同培养细胞的 Glu 摄取功能测定中药血清干预高糖和(或)缺氧状态下体外共同培养细胞外液中 Glu 的释放量和摄入量。结果 在 48 h 时段, 缺氧组及高糖缺氧组共同培养细胞的 Glu 释放量均比正常对照组明显增加(均为  $P < 0.05$ ), 而高糖组 Glu 释放量比正常对照组明显减少( $P < 0.05$ ); 补肾活血中药血清能明显降低正常条件下(24 h, 48 h, 72 h)、缺氧及高糖缺氧条件下(48 h, 72 h)共同培养细胞的释放量(均为  $P < 0.05$ )。在 24 h, 48 h, 72 h 时段缺氧组及高糖缺氧组共同培养细胞的 Glu 摄入量均比正常对照组明显降低(均为  $P < 0.05$ ); 高糖组共同培养细胞的 Glu 摄取功能在 24 h 和 72 h 时段均比正常对照组增强(均为  $P < 0.05$ ), 但 48 h 时段 Glu 摄入量比正常对照组降低( $P < 0.05$ ); 补肾

活血中药血清能明显提高正常及缺氧条件下 24 h、48 h 时段、高糖条件下 48 h 时段以及高糖和(或)缺氧条件下 72 h 时段共同培养细胞的 Glu 摄入量(均为  $P < 0.05$ )。结论 高糖和(或)缺氧能够引起体外共同培养的视网膜神经节细胞和视网膜 Müller 细胞的 Glu 代谢障碍,这可能是补肾活血法对高糖和(或)缺氧状态下视网膜神经节细胞的保护作用机制之一。

早在 20 世纪 90 年代,已有学者认为视网膜的神经元和(或)神经胶质细胞可能对长期的高血糖影响特别敏感,并使其功能异常导致血-视网膜屏障完整性的破坏,微血管损害就成为其代谢紊乱的继发结果。谷氨酸 (glutamate, Glu) 作为视网膜光感受器、双极细胞和神经节细胞的主要神经递质,介导视网膜神经细胞间的信息传递,行使重要的生理功能。Glu 功能的正常行使有赖于视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGC) Glu 释放量的严格调节。过量或超时作用都会导致兴奋性毒性作用而触发神经细胞损伤级联反应,并被认为是神经元损伤或死亡的最后通路。所以血管改变和神经元改变两者互相影响、互相促进失代偿,形成恶性循环,最终导致视网膜神经元和微血管均发生病变并逐渐加重<sup>[1]</sup>。如何防止或减轻在糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 发生发展过程中 RGC 的 Glu 损伤应为 DR 研究中的一个重要部分。为此,我们应用中药血清药理学方法,研究补肾活血中药含药血清对高糖和(或)缺氧状态下体外共同培养的 RGC 和视网膜 Müller 细胞 Glu 释放及摄入量的影响,并结合前期研究的结果<sup>[2]</sup>,探讨相关作用机制,为中医药治疗 DR 提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及实验材料** 标准实验用 Sprague-Dawley (SD) 新生 7 d 大鼠 (纯化培养视网膜 Müller 细胞) 及 1 d 大鼠 (纯化培养 RGC) 各 30 只,雌雄不限,均由成都中医药大学动物实验中心提供,标准号为清洁级。SIRP (克隆号: OX-41)、Thy-1.1 (克隆号: OX-7) 均购自 Chemicon 公司 (美国);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程公司); $[^3\text{H}]-\text{D}$ 、L-Glu (中国科学院上海应用物理研究所)。

**1.2 RGC 的纯化及与视网膜 Müller 细胞的共同培养** RGC 的纯化及与视网膜 Müller 细胞的共同培养参考文献<sup>[3-7]</sup>:将 P2 视网膜 Müller 细胞接种在 96 孔培养板中,密度为  $10^9 \text{ L}^{-1}$ ,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,共 3 板;置于含体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱中继续培养 24 h。用于纯化 RGC 的培养板的处理:用 OX-41 抗体 (1:100, PBS 稀释) 包被 6 孔板,室温 2 h,4  $^\circ\text{C}$  过夜, PBS 轻漂备用。用 OX-7 抗体 (1:300, PBS 稀释) 包被 6 孔板及 96 孔板,室温孵育 2 h,4  $^\circ\text{C}$  过夜, PBS 轻洗 3 次,  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  BSA 孵育 0.5 h, PBS 轻漂备用。RGC 的纯化:将出生后 1 d 的 SD 大鼠使用体积分数 75% 乙醇浸泡 15 min 溺死,无菌取眼球,用含  $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  青霉素、 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素的 PBS 冲洗 3 次,于解剖显微镜下剥离视网膜神经纤

维层,置于  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白酶中,37  $^\circ\text{C}$  孵育 20 min,充分吹打。含血清培养基终止消化,200 目不锈钢网过滤。800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,含体积分数 20% 胎牛血清的 DF12 液重悬细胞。将细胞悬液置于 OX-41 包被的培养板中,37  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min,每 10 min 轻晃一次。轻轻吸掉未黏附的细胞悬液置于 OX-7 包被 6 孔培养板中,室温孵育 30 min。吸掉细胞悬液, PBS 冲洗 3 次,用含  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白酶的无血清培养基轻轻冲洗 6 孔板,黏附于 6 孔板的细胞脱落于培养基中,含血清的培养基终止消化。800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,含血清培养基重悬细胞,以  $40 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$  的细胞密度种植于包被好视网膜 Müller 细胞的 96 孔板,加入含体积分数 20% 胎牛血清的 DF12 液置于含体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养 24 h 后进行实验干预分组。

**1.3 补肾活血中药血清的制备** 补肾活血中药血清的制备参考文献<sup>[8]</sup>:将体质量 120 ~ 150 g 的 7 d SD 大鼠 20 只随机分为两组,分别为补肾活血 (BSHX) 中药血清组、空白对照组。BSHX 中药血清组的给药剂量为  $11.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,每天灌胃 1 次,连续 7 d。空白对照组每天给予等体积的生理盐水。在末次给药后 1 h,腹主动脉采血,采集的血液 4  $^\circ\text{C}$  静置 24 h,3000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,分离血清;分离的血清以 56  $^\circ\text{C}$  30 min 灭活处理,直径 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌,5 mL 分装, -20  $^\circ\text{C}$  保存备用。

**1.4 实验分组** 将按比例 (1:25) 共同培养好的细胞置于含体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养 24 h 后,将含有体积分数 20% 胎牛血清的 DF12 液弃掉,换用无血清的 DF12 培养液,孵育 24 h 后再弃掉无血清的培养液,按下列分组情况换含有不同培养条件的培养液,将三板细胞随机分为 24 h 组、48 h 组、72 h 组放入培养箱继续培养,分别于 24 h、48 h、72 h 后进行实验指标测定。正常对照组:含体积分数 20% 空白血清的 DF12 液。中药干预正常组:含体积分数 20% 中药含药血清的 DF12 液。高糖组:含体积分数 20% 空白血清的 DF12 液及终浓度  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖。中药干预高糖组:含体积分数 20% 中药含药血清的 DF12 液和终浓度  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖。缺氧组:含体积分数 20% 空白血清的 DF12 液及终浓度  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  连二亚硫酸钠。中药干预缺氧组:含体积分数 20% 中药含药血清的 DF12 液和终浓度  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  连二亚硫酸钠。高糖缺氧组:含体积分数 20% 空白血清的 DF12 液、终浓度  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖和终浓度  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  连二亚硫酸钠。中药干预高糖缺氧组:含体积分数 20% 中药含药血清的 DF12 液、终浓度  $1.0$

mmol · L<sup>-1</sup>连二亚硫酸钠和终浓度 50 mmol · L<sup>-1</sup>葡萄糖。

**1.5 细胞 Glu 释放量的检测方法** 收集细胞培养液上清液,氨基酸分析仪检测细胞外液 Glu 含量,原理:游离的氨基酸经氨基酸分析仪的离子交换柱分离后,与茚三酮溶液产生颜色反应,再通过分光光度计比色测定 Glu 含量,单位 mg · L<sup>-1</sup>。氨基酸标准由 Hitachi High-Technologies 公司提供。

**1.6 细胞 Glu 摄入量的检测方法** 在细胞培养液中加入 [<sup>3</sup>H]D,L-Glu(终浓度 1 μmol · L<sup>-1</sup>) 共同孵育 15 min 后用冰冷的生理盐水溶液终止反应并洗涤,再用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH 裂解细胞,最后离心收集上清液,用 β 液闪仪测定细胞对 [<sup>3</sup>H]D,L-Glu 的摄取量。单位:[<sup>3</sup>H]D,L-Glu/10<sup>-10</sup> mmol · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> pro。样本均做复管。细胞蛋白质含量采用考马斯亮兰法测定。

**1.7 统计学方法** 本研究数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计处理,多组间比较用多因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Glu 释放量测定** Glu 释放量测定结果见表 1。

**表 1 Glu 释放量测定结果**

**Table 1 Glu release in different groups ( $\bar{x} \pm s, \rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )**

Group	n	24 hours	48 hours	72 hours
Control	6	7.39 ± 1.24 *	8.82 ± 1.61 *	14.30 ± 2.84 *
Serum with drug	6	5.46 ± 1.26	6.75 ± 1.62	12.90 ± 2.31
High glucose	6	7.23 ± 1.69 *	7.19 ± 1.62 **	9.71 ± 2.31 **
Serum with drug + high glucose	6	4.95 ± 1.44	4.97 ± 1.12	4.94 ± 1.30
Hypoxia	6	7.52 ± 1.18 *	12.80 ± 1.64 **	10.48 ± 1.45 **
Serum with drug + hypoxia	6	5.90 ± 1.22	9.67 ± 1.54	8.86 ± 1.48
High glucose + hypoxia	6	8.29 ± 1.25#	10.50 ± 1.51 **	9.87 ± 1.26 **
Serum with drug + high glucose + hypoxia	6	8.22 ± 1.30	8.29 ± 1.23	7.80 ± 2.80 *

Note: Compared with control group at same time, # $P < 0.05$ ; Compared with serum with drug group at same time, \* $P < 0.05$

由表 1 可见高糖和(或)缺氧干预结果:(1)24 h 时段,高糖组、缺氧组与正常对照组比较,Glu 释放量差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ );高糖缺氧组与正常对照组比较,Glu 释放量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );(2)48 h 时段,高糖组与正常对照组比较,Glu 释放量减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );缺氧组及高糖缺氧组与正常对照组比较,Glu 释放量增加,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );(3)72 h 时段,高糖组、缺氧组及高糖缺氧组与正常对照组比较,Glu 释放量减少,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。

中药干预高糖和(或)缺氧状态下结果:24 h、48 h 和 72 h 时段中药干预正常组共同培养细胞 Glu 释放量较正常对照组明显减少,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。中药干预高糖组与高糖组比较:在 24 h、48 h 和 72 h 时段比较,中药干预高糖组共同培养细胞 Glu 释放量均明显减少,其差异均有统计

学意义(均为  $P < 0.05$ ),此结果和中药干预缺氧组与缺氧组比较结果一致。中药干预高糖缺氧组与高糖缺氧组比较:24 h 时段两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),48 h、72 h 时段中药干预高糖缺氧组共同培养细胞 Glu 释放量明显减少,其差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。

**2.2 Glu 摄入量测定** Glu 摄入量测定结果见表 2。

**表 2 Glu 摄入量测定结果**

**Table 2 Glu intake in different groups**

Group	n	([ <sup>3</sup> H]D,L-Glu/10 <sup>-10</sup> mmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> pro)		
		24 hours	48 hours	72 hours
Control	6	3122.57 ± 71.77 *	9079.52 ± 38.96 *	10 146.49 ± 124.53
Serum with drug	6	4135.08 ± 99.59	9725.20 ± 91.23	9925.46 ± 315.98
High glucose	6	3360.79 ± 92.92#	7387.06 ± 61.35 *	16 202.13 ± 145.34 **
Serum with drug + high glucose	6	3490.19 ± 22.75	8856.11 ± 91.23	10 957.38 ± 315.98
Hypoxia	6	701.96 ± 24.25 **	4559.79 ± 99.79 **	6213.83 ± 326.49#
Serum with drug + hypoxia	6	1263.46 ± 29.86	5727.30 ± 148.22	6631.39 ± 152.93
High glucose + hypoxia	6	1176.88 ± 39.67 **	7314.62 ± 200.07#	6995.22 ± 104.35 **
Serum with drug + high glucose + hypoxia	6	733.31 ± 24.45	7591.28 ± 102.99	8155.66 ± 125.87

Note: Compared with Control group at same time, # $P < 0.05$ ; Compared with serum with drug group at same time, \* $P < 0.05$

由表 2 可见高糖和(或)缺氧干预结果:(1)24 h 时段,高糖组与正常对照组比较,Glu 摄入量增多,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );缺氧组和高糖缺氧组与正常对照组比较,Glu 摄入量减少,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );(2)48 h 时段,高糖组、缺氧组及高糖缺氧组与正常对照组比较,Glu 摄入量减少,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );(3)72 h 时段,高糖组与正常对照组比较,Glu 摄入量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );缺氧组和高糖缺氧组与正常对照组比较,Glu 摄入量减少,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。

中药干预高糖和(或)缺氧状态下结果:24 h 和 48 h 时段中药干预正常组细胞 Glu 摄入量较正常对照组明显增多,其差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。中药干预高糖组与高糖组比较:24 h 时段细胞 Glu 摄入量比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),48 h 时段中药干预高糖组细胞 Glu 摄入量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),72 h 时段中药干预高糖组细胞 Glu 摄入量减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。中药干预缺氧组与缺氧组比较:24 h、48 h 时段中药干预缺氧组细胞 Glu 摄入量增加,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ),72 h 时段两组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );中药干预缺氧高糖组与高糖缺氧组比较:24 h 时段中药干预缺氧高糖组细胞 Glu 摄入量减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );48 h 时段两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),72 h 时段中药干预缺氧高糖组细胞 Glu 摄入量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

早期研究表明,糖尿病早期视网膜中 Glu 含量

明显增多,可过度激活其相应受体导致兴奋性毒性作用而触发神经细胞损伤级联反应,并被认为是神经元损伤或死亡的最后通路,最终使 RGC 受损,并加重视网膜的缺血缺氧<sup>[9]</sup>。因此,视网膜缺血缺氧与高血糖一样也是 DR 的主要发病机制之一<sup>[10]</sup>。及时清除细胞间隙中多余的 Glu 对维持视网膜内环境稳定和 RGC 免受 Glu 兴奋性神经毒性损害具有重要意义。视网膜中 Müller 细胞是 RGC 中 Glu 的唯一来源<sup>[11]</sup>,因此利用体外共同培养视网膜 Müller 细胞和 RGC,并以 BSHX 中药复方含药血清进行干预,旨在研究模拟高糖和(或)缺氧环境下共同培养的视网膜 Müller 细胞和 RGC 的 Glu 释放量的变化,从 Glu 代谢角度探讨 BSHX 中药复方血清对高糖和(或)缺氧状态下 RGC 的保护作用机理,为 BSHX 中药防治 DR 的药物干预途径提供新的思路。

本实验结果显示:48 h、72 h 时段,高糖组与正常对照组比较,高糖组共同培养细胞的 Glu 释放量减少,表明 RGC 本身为嗜高糖环境细胞,短时间内(24 h)单纯稳定高糖条件对共同培养细胞的 Glu 释放量并未发生明显影响。大量研究表明 RGC 对缺氧十分敏感,即使缺氧时间很短也会造成损伤。在细胞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,超氧化物歧化酶大量因消耗和破坏而减少,必然对 RGC 的抗氧化能力产生一定的损伤<sup>[12]</sup>。有研究报道,通常血浆中含有  $100 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Glu,在 DR 早期,血-视网膜屏障就会受到损害,从而使 Glu 渗漏到细胞间质,而只要  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Glu 就可以对 RGC 产生严重的损害,如不去除过多的 Glu, RGC 就会凋亡<sup>[13]</sup>。本实验结果显示:短期缺氧(48 h)共同培养细胞外液中 Glu 增加,我们推测主要可能有以下原因:(1)由于能量耗竭造成 Glu 依赖性重摄取系统的功能逆转,Glu 反向运输到细胞外液,使细胞外液中 Glu 含量增高;(2)缺氧时 ATP 合成不足,Glu 灭活减弱,也可使细胞外 Glu 含量增加;(3)缺氧后细胞膜受损,Glu 通过非特异性膜渗漏顺浓度梯度排到细胞外。本实验还观察到:单纯模拟缺氧条件下共同培养细胞的 Glu 释放量先增加(48 h),然后减少(72 h),可能是由于缺氧持续一段时间后细胞自身调节或其他因素影响 Glu 释放量逐渐下降。中药血清干预缺氧组共同培养细胞的 Glu 释放量在 24 h、48 h、72 h 三个时段均较缺氧组明显减少(均为  $P < 0.05$ );高糖缺氧组共同培养细胞的 Glu 释放量在 24 h、48 h 时段均比正常对照组增加(均为  $P < 0.05$ ),而 72 h 时段则比正常对照组降低,其变化规律与缺氧组相似。中药血清干预高糖缺氧组共同培养细胞 Glu 释放量在 48 h、72 h 时段均较高糖缺氧组减少(均为  $P < 0.05$ ),表明 BSHX 中药血清在防止缺氧以及高糖缺氧状态下细胞外 Glu 的蓄积,从而避免产生神经兴奋性毒性均具有积极的干预作用,这也

可能是 BSHX 中药复方防治 DR 的一个重要的药物干预途径。

有文献发现 DR 时视网膜 Müller 细胞将 Glu 转化为谷氨酰胺(glutamine, Gln)的能力下降 65%,随着视网膜 Müller 细胞转化 Glu 能力的下降,视网膜内 Glu 水平可上升 1.6 倍,视网膜 Müller 细胞作为视网膜中 Glu 浓度的调节单元,对 Glu 的高亲和性是视网膜中 Glu 降解的主要途径<sup>[14]</sup>。Glu 在 Müller 细胞内合成后,通过胞膜上谷氨酸转运蛋白调节,主要是 Glu 转运蛋白 1,在 GS(谷氨酸合成酶)的作用下,转变为 Gln,被 Müller 细胞释放到胞外,Gln 是一种无神经毒性的物质,神经细胞将 Gln 摄取,经过谷氨酰胺酶脱氨成 Glu,然后被储存,完成一个循环。视网膜 Müller 细胞对 Glu 摄取及代谢在维持细胞外 Glu 浓度保护 RGC 免受 Glu 兴奋性神经毒性、维持视网膜内环境稳定及保持正常的生理功能中起着重要的作用。

本实验结果显示:在单纯高糖条件下,共同培养细胞的 Glu 摄取功能在 24 h 和 72 h 时段均比正常对照组明显增强(均为  $P < 0.05$ )。这种反应与 Glu 堆积的量与时间密切相关,而 48 h 时段高糖组 Glu 摄入又比正常对照组降低。本实验中,仅有缺氧干预条件下,缺氧组在 24 h、48 h、72 h 时段共同培养细胞的 Glu 摄取功能比正常对照组明显降低,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ),这可能是由于 RGC 在缺血缺氧损伤后,其细胞内的 Glu 会释放到细胞外,使胞外的 Glu 浓度明显增加<sup>[15]</sup>。当胞外的 Glu 浓度升高到一定程度后,则会加重细胞的损伤,使细胞特别是视网膜 Müller 细胞对 Glu 摄取功能下降;而细胞对 Glu 摄取功能的下降又会进一步加剧胞外的 Glu 聚集,如此形成恶性循环。本实验结果显示:24 h、48 h 段 BSHX 中药干预正常组共同培养细胞的 Glu 摄取功能比正常对照组明显增高( $P < 0.05$ ),表明 BSHX 中药血清能明显提高正常条件下共同培养细胞的 Glu 摄取功能,但有一定时效性,在 72 h 两者比较已无明显差异,这与本实验中药血清干预缺氧组与缺氧组比较结果相一致。但在 24 h 时段 BSHX 中药干预高糖缺氧组共同培养细胞 Glu 的摄入量较高糖缺氧组减少( $P < 0.05$ ),48 h 时段两者比较无明显差异,72 h 时段中药干预高糖缺氧组 Glu 的摄入量与高糖缺氧组比较明显增高( $P < 0.05$ )。虽然 BSHX 中药血清能明显提高正常条件下共同培养细胞的 Glu 摄取功能,但是对于高糖和缺氧同时存在条件下共同培养细胞的 Glu 摄取功能可能在不同条件或时间作用下发挥双向调节作用,其机理有待进一步研究。

综上所述,高糖和(或)缺氧能够引起体外共同培养的 RGC 和视网膜 Müller 细胞的 Glu 代谢障碍,主要表现为 GS 的活性降低,Glu 的释放增加,而 Glu 的摄取减少;补肾活血中药血清能减少细胞释放

Glu、增强视网膜 Müller 细胞 GS 活性,增加细胞对 Glu 的摄入及转化,减少细胞外 Glu 的堆积,从而减轻谷氨酸的神经兴奋性毒性,这可能是补肾活血法对高糖/缺氧状态下 RGC 的保护作用机制之一。

### 参考文献

- 1 王月欣,陈松. 糖尿病视网膜病变神经损伤的发病机制和保护防治研究进展[J]. 中华眼底病杂志,2014,30(2):209-211.
- 2 万李,谢学军,马荣. 补肾活血中药血清对缺氧条件下纯化培养视网膜神经节细胞的保护作用及其机制[J]. 中华实验眼科杂志,2014,32(3):211-215.
- 3 胡昕倩,柯敏,钱志刚. 花色苷对高糖、高胰岛素下 Müller 细胞合成 VEGF 的影响[J]. 眼科新进展,2011,31(2):115-118.
- 4 苟琳,张作明,许汉鹏,吴玉梅,晏楠,郭守一. 恒温摇动法纯化培养大鼠视网膜 Müller 细胞的技术研究[J]. 眼科研究,2002,20(5):411-413.
- 5 郝明,匡洪宇,傅铮,高昕媛,李月,陈萍,等. 黄芪甲苷对高糖培养下视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 中华医学杂志,2012,92(30):2104-2107.
- 6 许红霞,糜漫天,黄国荣,陈卡. 无血清神经基质培养基培养纯化的视网膜神经节细胞[J]. 中华眼底病杂志,2006,22(3):200-203.

- 7 苟琳,张作明,许汉鹏,郭群,李莉,郭守一. 视网膜神经节细胞与 Müller 细胞共培养的方法研究[J]. 眼科研究,2003,21(3):264-266.
- 8 马殿伟,谢学军,张梅,万李. 补肾活血剂对高糖或(和)缺氧状态下视网膜神经节细胞活力及谷氨酰胺合成酶活性的影响[J]. 眼科新进展,2014,34(6):510-514.
- 9 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):62.
- 10 Elsherbiny NM, Ahmad S, Naime M, Elsherbini AM, Fulzele S, Al-Gayyar MM, et al. ABT-702, an adenosine kinase inhibitor, attenuates inflammation in diabetic retinopathy [J]. *Life Sci*, 2013,93(2-3):78-88.
- 11 王帅,吴强. Müller 细胞生理功能及其在糖尿病视网膜病变中的变化[J]. 中华眼底病杂志,2014,30(2):219-223.
- 12 梅和珊,王永利. 脑缺血时谷氨酸释放机制[J]. 中国药理学通报,2005,21(4):393-396.
- 13 Li Q, Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2002,43(9):3109-3116.
- 14 Ward MM, Jobling AI, Kalloniatis M, Fletcher EL. Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes[J]. *Diabetologia*,2005,48(2):351-360.
- 15 Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ. Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2000,41(11):3444-3450.

(上接第 418 页)

### 参考文献

- 1 You QS, Wu LJ, Duan JL, Luo YX, Liu LJ, Li X, et al. Prevalence of myopia in school children in greater Beijing: the Beijing Childhood Eye Study [J]. *Acta Ophthalmol*, 2014, 92(5):e398-e406.
- 2 Jung SK, Lee JH, Kakizaki H, Jee D. Prevalence of myopia and its association with body stature and educational level in 19-year-old male conscripts in Seoul, South Korea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(9):5579-5583.
- 3 张清仲,吕宗猷,詹宇坚. 青少年近视眼与中医体质相关性研究 [C]. 第三届世界中西医结合大会论文摘要集,2007:690-691.
- 4 张辽. 近视患者中医体质研究[D]. 济南:山东中医药大学,2011.
- 5 彭耀崧,王幼生,詹敏,黄小瑛. 高度近视辨证分型与眼部病变的关系探要[J]. 中医药学刊,2004,22(12):2233-2234.
- 6 Lu F, Zhou X, Jiang L, Fu Y, Lai X, Xie R, et al. Axial myopia induced by hyperopic defocus in guinea pigs: A detailed assessment on susceptibility and recovery [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(1):101-108.
- 7 李久长. 成人高度近视屈光矫治与并发症分析[J]. 陕西医学杂志,2006,35(6):706-708.

- 8 江鸿,江萍. 近视眼的中医防治探析[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(10):26-27.
- 9 王鸿章,杨芳,谢学军,罗俊雄,陈娟. 儿童近视与中医体质学的相关性分析[J]. 四川中医,2010,28(9):28-31.
- 10 陈英华,孙琪,欧阳轶强,陈嘉,邹移海. 肾虚证动物模型造模方法综述[J]. 中国医药学报,2003,18(6):370-372.
- 11 肖静,王毅兴,高建东,黄迪,邵命海,何立群. 肾虚证的研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2008,22(2):73-77.
- 12 吴启端,熊带水,梁文能. 肾虚动物模型的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2001,7(6):54-56.
- 13 周翔天,瞿佳. 近视研究中动物模型的选择[J]. 中华眼科杂志,2005,41(6):486-497.
- 14 Gwiazda J, Thorn F, Bauer J, Held R. Myopic children show insufficient accommodative response to blur [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(3):690-694.
- 15 Campbell IC, Coudrillier B, Ross-Ethier C. Biomechanics of the posterior eye: A critical role in health and disease [J]. *J Biomech Eng*, 2014, 136(2):021005.
- 16 Heber LU, Mosest K. Mechanisms of drosophila retina imorphogenesis: The virtues of being progressive [J]. *Cell*, 1995, 81(7):987-990.
- 17 Curtin BJ. The posterior staphyloma of pathologic myopia [J]. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1977, 75(1):67-86.