

热休克蛋白 70 在视网膜神经元和 Müller 细胞中的诱导及其保护作用

白海青 王铮华 王大博 李树宁 张蕊石

【摘要】 目的 评价大鼠视网膜神经元(RNs)和 Müller 细胞中热休克蛋白(HSP)70 的诱导表达,及其对低糖和谷氨酸损伤的视网膜神经元的保护作用。方法 大鼠 RNs 和 Müller 细胞体外培养体系分别经过热休克处理(42℃下 1 h)及免疫细胞化学法检测 HSP70 表达的时间经过;并对 RNs 进行低糖(0.56 mmol/L 葡萄糖,作用 6 h)和谷氨酸(100 μmol/L,作用 6 h)兴奋毒性损伤,四唑盐(MTT)比色法评价细胞存活能力,同时用 HSP70 抗体阻断其表达。结果 热休克后大鼠 RNs 和 Müller 细胞中 HSP70 高效表达;经热休克预处理,RNs 在低糖和谷氨酸盐损伤后的细胞活力明显提高,该现象可被 HSP70 抗体阻断。结论 热休克能够诱导 RNs 和 Müller 细胞高效表达 HSP70,从而增强 RNs 对低糖和谷氨酸兴奋毒性损伤的耐受能力。

【关键词】 热休克蛋白质类/分析; 视网膜神经节细胞; Müller 细胞; 免疫组织化学; 谷氨酸
中图分类号:R774.6 R446.62

Expression and protective effect of induced heat shock protein 70 in retinal neurons and Müller cells BAI Hai-qing, WANG Jing-hua, WANG Da-bo, et al. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China

Corresponding author: BAI Hai-qing, Email: haiqing_bai@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of induced heat shock protein (HSP) 70 in rat's retinal neurons (RNs) and Müller cells, and evaluate the protective effect of HSP 70 on RNs injured with glucose deprivation and glutamate. **Methods** Rat's RNs and Müller cells cultured in vitro were treated with heat shock (42°C for 1 hour), and duration of the expression of HSP70 was detected by immunocytochemical techniques. Viability of the cells was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) chromatometry after incitant toxic injury with glucose deprivation (0.56 mmol/L glucose for 6 hours) and glutamate (100 μmol/L for 6 hours). Simultaneously, the expression was interdicted by HSP70. **Results** Hypereffective expression of HSP70 was found in cultured RNs and Müller cells after heat shock. The viability of RNs pretreated by heat shock after injured with glucose deprivation and glutamate significantly increased which could be interdicted by HSP70 antibody. **Conclusion** Hypereffective expression of HSP 70 may be induced by heat shock, which enhances the ability of tolerance of RNs to the incitant toxic injury by glucose deprivation and exitotoxicity.

【Key words】 Heat-shock proteins/analysis; Retinal ganglion cells; Müller cells; Immunohistochemistry; Glutamic acid

视网膜神经元(RNs)的损伤或死亡是许多眼科疾病的共同病理过程,而成熟 RNs 不具有再生能力,因此提高 RNs 对损伤的耐受能力成为近来研究的热点。最近的研究表明,RNs 经过亚致死量预刺激后,可以提高其对随后的致死量损伤的耐受力,该现象与热休克蛋白 70(HSP70)的诱导表达有关^[1,2]。上述资料提示我们一种新的治疗神经元损伤,或提高其对损伤耐受力的方法。我们利用 RNs 和 Müller 细胞体外培养体系,诱导 HSP70 在这两种细胞中的表达,评价 RNs

对低糖或谷氨酸盐兴奋毒性损伤的耐受情况及其与 HSP70 的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

1.1.1 视网膜 Müller 细胞的培养、传代和鉴定 根据 Hick-Courtois'法^[3],取出生 6 d 的 Wistar 大鼠 4 只,剥出眼球,置于改良 Eagle 培养液(DMEM)(美国 Gibco 公司,12100)中,室温暗处放置 6 h,在 D-hanks 溶液中分离视网膜神经上皮层,0.1%胰蛋白酶消化 20 min,加少许培养液终止消化,尼龙筛网(孔径 30 μm)过滤,收集单细胞悬液,以离心半径 15 cm、

1 000 r/m 离心 3 min, 弃除上清液。用钝头吸管反复轻轻吹打细胞团块, 使之重新成为单细胞悬液, 接种到 35 ml 的细胞培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 16000) 的 DMEM, 其中含 HEPES (美国 Amresco 公司, 05288) 20 mmol/L、青霉素及链霉素各 100 U/ml。调节培养液 pH 值为 7.00~7.20。细胞置于 37°C 恒温、5% CO₂ 和 95% 空气、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中, 每 3 天换液 1 次。7 d 左右细胞融合后, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。第 4~6 代细胞接种到内置 1 cm×1 cm 玻片的 75 mm 培养皿中, 并进行免疫细胞化学鉴定。

1.1.2 RNs 的原代混合培养

取出生 2 d 的 Wistar 大鼠 4 只, 剜出其眼球, 分离视网膜神经上皮层, 胰蛋白酶消化法获得视网膜神经细胞的单细胞悬液 (其中大多数细胞是视网膜各级神经元, 还有少量胶质细胞), 计数, 调整细胞悬液的密度至 $1.2 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^6$ 个/ml, 迅速接种到预先用鼠尾胶原包被的 24 孔或 96 孔细胞培养板中, 24 孔板内置 1 cm×1 cm 的玻片, 接种密度为 4×10^5 个/cm²。培养方法同参考文献 [4]。

1.2 HSP70 的诱导及二步法免疫细胞化学检测

第 4~6 代培养至第 3 天的 Müller 细胞和原代培养第 2 天的 RNs 置于 42°C 水育箱中, 热休克处理 1 h, 分别于热休克后 0、15、30 min、1、2、6、12、24 和 48 h 将带有细胞的玻片取出, 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.1 mol/L, pH 值 7.4) 洗 2 次, 每次 3 min, 4% 多聚甲醛-PBS 室温固定 30 min, 0.05% Triton-X100-PBS 洗 20 min; PBS 洗 5 min, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 非免疫血清室温孵育 10 min, 兔抗大鼠 HSP70 多克隆抗体 (1:100, 抗体稀释液稀释, NeoMarkers) 4°C 下过夜, 对照组不加一抗, 加 PBS; PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min; 滴加抗小鼠 IgG 二抗 (美国 Elivision 公司, Kit-9804), 室温孵育 30 min; 氨基乙基咔唑 (AEC) 显色, 室温孵育 8 min, 双蒸水洗, 水溶性封片剂封片。每个时间段均设未进行热休克处理的平行对照组。对 Müller 细胞中 HSP70 染色阳性的细胞进行计数, 并计算各时间段 HSP70 在 Müller 细胞中的表达率。

1.3 RNs 的低糖和兴奋性谷氨酸盐损伤及细胞存活能力的评价

原代培养 2 d 的 RNs 置于 42°C 水育箱中, 热休克处理 1 h, 放回 CO₂ 培养箱中, 再培养 2 h, 更换含 10% 胎牛血清的无糖型 DMEM (美国 Gibco 公司, 11966) 培养液 (因 10% 胎牛血清含 5.6 mmol/L 葡萄糖, 所以培养液中葡萄糖含量为 0.56 mmol/L) 或更换加入

100 μmol/L 谷氨酸钠的普通培养液, 继续培养 6 h, 再次更换普通培养液, 四唑盐 (MTT) 比色, 酶标仪检测细胞存活能力。同时设立未经热休克预处理, 直接给予低糖和兴奋毒性损伤的平行对照组, 并设立在热休克处理前加入 HSP70 抗体 (1:500) 的对照组。

1.4 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计分析软件对各组间细胞活力差别进行独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 HSP70 在 Müller 细胞的表达

对传代至第 4~6 代的细胞进行免疫细胞化学鉴定结果显示, 80% 以上的细胞对胶质细胞原纤维蛋白 (GFAP) 反应阴性, 谷氨酰胺合成酶 (GS) 反应阳性, 具有 Müller 细胞的特性 [3]。

仅有少量 (0.5%, $n=10$ 个玻片) 未经热休克处理的 Müller 细胞表达 HSP70 (图 1, 2), 且免疫活性仅存在于细胞核中。热休克后 1 h, Müller 细胞对 HSP70 的表达增高, 达到 7.2% ($n=3$ 个玻片); Müller 细胞表达 HSP70 的高峰时刻为热休克处理后 6~12 h, 分别为 68.3% ($n=3$ 个玻片) 和 85.6% ($n=3$ 个玻片), 此时, HSP70 的免疫活性不仅存在于细胞核中, 细胞核周围的细胞浆中也可检测到阳性染色, 且染色明显增强 (图 3); 热休克处理后 24 h 阳性表达率降至 12.2% ($n=3$ 个玻片); 48 h 后仍有少量细胞的细胞核有阳性染色。

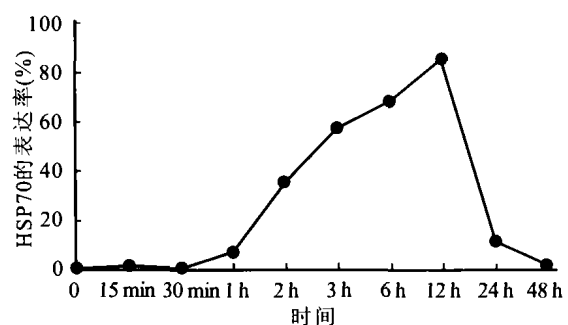


图 1 热处理后不同时间体外培养的 Müller 细胞中 HSP70 表达曲线图

Fig. 1 Curve of expression of HSP70 in Müller cells cultured in vitro at different time points after heat shock

2.2 HSP70 在 RNs 的表达

未经热休克处理的混合培养 RNs 对 HSP70 的表达量较低 (图 4); 经过热休克处理后 30 min, 大多数 RNs 开始表达 HSP70; 1 h 后其表达达高峰, 阳性染色见于神经元的细胞体、轴突和树突 (图 5); 2 h 后染色强度迅速降低。

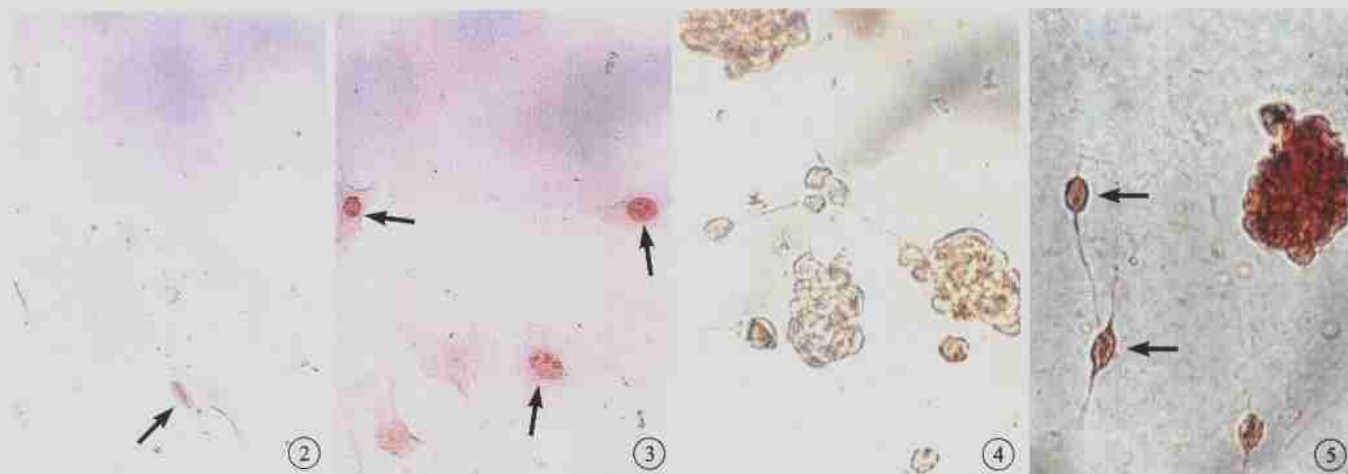


图 2 热休克前 Müller 细胞中 HSP70 抗体免疫组织化学染色像。细胞核或细胞浆红色为阳性反应细胞(黑箭),细胞核蓝色为阴性反应细胞(白箭)。仅有少数 Müller 细胞细胞核表达 HSP70。AEC $\times 200$ 图 3 热休克后 12 h Müller 细胞中 HSP70 抗体免疫组织化学染色像。HSP70 表达达到高峰,阳性反应细胞多(黑箭),染色强度增高。仅有少数阴性细胞(白箭)。AEC $\times 200$ 图 4 热休克前 RNs 中 HSP70 抗体免疫组织化学染色像。细胞体、轴突和树突不着色为阴性反应细胞(白箭)。AEC $\times 200$ 图 5 热休克后 1 h RNs 中 HSP70 抗体免疫组织化学染色像。HSP70 表达达高峰,染色强度最高(黑箭)。AEC $\times 200$

Fig. 2 Photograph of immunohistochemical staining of HSP70 in Müller cells before heat shock. Red karyon or cytoplasm in positive cells (black arrow) and blue karyon in negative cells (white arrow). Expression of HSP70 in the karyon only in a few Müller cells. AEC $\times 200$ Fig. 3 Photograph of immunohistochemical staining of HSP70 in Müller cells 12 hours after heat shock. Most of the cells are positive stained (black arrows) with enhanced staining intensity, and only a few negative cells can be seen (white arrow). AEC $\times 200$

Fig. 4 Photograph of immunohistochemical staining of HSP70 in RNs before heat shock. The cell body, axone, and dendrite without pigmentation (white arrows). AEC $\times 200$ Fig. 5 Photograph of immunohistochemical staining of HSP70 in RNs 1 hour after heat shock. Expression of HSP70 reaches the peak with the highest staining intensity (black arrows). AEC $\times 200$

2.3 RNs 存活能力

热休克 1 h 后,混合培养的 RNs 活力下降,但与未进行热休克处理的对照组相比,差异无统计学意义($t=0.854, P>0.05$)。经过 6 h 低糖和谷氨酸兴奋毒性损伤, RNs 活力明显下降。经热休克预处理后,细胞对低糖和兴奋毒性损伤的耐受能力明显提高,表现为细胞活力比未经热休克预处理组明显高,其差异有统计学意义(低糖组 $t=2.019, P<0.05$; 谷氨酸钠组 $t=2.031, P<0.05$)。但当培养液中加入 HSP70 抗体时,细胞对损伤的耐受力与未加热组相比,未见明显提高(低糖组 $t=1.725, P>0.05$; 谷氨酸钠组 $t=1.269, P>0.05$)。

3 讨论

HSP 家族是一类在遗传上高度保守的蛋白质分子,其中研究较多的 HSP70 广泛分布于脑、肝脏和肾脏中^[3],以两种形式存在:固有型(constitutive, HSP73/HSC73)和诱导型(inducible, HSP72),前者存在于未受刺激的细胞中,而后者仅存在于受刺激的细胞中。当细胞受到热休克(39.0~43.5℃)或低氧等损伤后,二者的表达均增高^[4,5],尤其 HSP72 呈高效表达,阳性表达区在神经元分布于细胞体、轴突和树突内^[7]。

经热休克处理后, Müller 细胞高效表达 HSP70,表达时间较 RNs 更为持久。Müller 细胞是视网膜各级

神经元各种生理生化过程的重要伴随和参与细胞,因此能够显著和持久的表达 HSP70,而且 HSPs 可由胶质细胞转运给神经元^[8],这可能是 RNs 对刺激的耐受力提高的重要原因。本研究 RNs 对 HSP70 的短暂表达与 Caprioli 等^[9]提出的视网膜神经节细胞对 HSP72 的表达经过相似。

一般认为,低糖引起的细胞能量代谢障碍直接抑制 Na⁺ 和 K⁺ 泵活性,促使兴奋性氨基酸(如谷氨酸)的大量释放,激活 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体, Ca²⁺ 大量内流,最终导致神经元死亡^[10],即低糖最终通过兴奋毒性引起神经元损伤。我们的研究发现热休克预处理提高了 RNs 在低糖损伤或谷氨酸兴奋毒性损伤后的细胞活力,这也提示两种损伤可能存在共同机制。

热休克后 HSP70 可在 Müller 细胞和 RNs 中高效表达,同时 RNs 对低糖和兴奋毒性损伤的抵抗力提高,但加入 HSP70 阻断剂——HSP70 抗体后,该保护作用消失了。这提示 HSP70 的表达对细胞有直接保护作用。HSP70 抗体对热休克细胞存活能力的抑制作用最早由 Riabowol 等^[11]提出。

本研究初步证实 HSP70 能够提高 RNs 对低糖和谷氨酸兴奋毒性损伤的耐受能力,而 Müller 细胞在这一过程中发挥重要作用。此外,大鼠青光眼模型中, HSP72 可提高视网膜神经节细胞的存活率^[12]; HSPs 对光诱导性损伤的大鼠视网膜有保护作用^[13];经瞳孔

温热疗法(TTT)可诱导脉络膜血管内皮细胞高效表达 HSP72,是 TTT 改善血视网膜屏障功能的重要机制^[14]。除热休克外,锌和龙牛儿基龙牛儿丙酮(GGA)等也是 HSP72 或 HSP70 的诱导剂^[12, 15]。上述研究结果使我们相信,不久的将来这一保护机制将有望应用于临床视网膜、视神经疾病的预防和治疗。

4 参考文献

- 1 Abe H, Nowak TS Jr. Postischemic temperature as a modulator of the stress response in brain: dissociation of heat shock protein 72 induction from ischemic tolerance after bilateral carotid artery occlusion in the gerbil. *Neurosci Lett*, 2000, 295: 54-58.
- 2 Pringle AK, Thomas SJ, Signorelli F, et al. Ischaemic preconditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res*, 1999, 845:152-154.
- 3 Hicks D, Courtois Y. The growth and behaviour of rat retinal Müller cell in vitro: 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res*, 1990, 51:119-129.
- 4 白海青,王静华,李树宁,等. 维生素 B12 及其衍生物甲钴胺对低糖导致的视网膜神经元损伤的保护作用. *眼科新进展*, 2003, 23: 239-241.
- 5 Ambrosini MV, Mariucci G, Tantucci M, et al. Induction of cerebellar hsp72 in rats learning a two-way active avoidance task. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 70: 164-166.
- 6 Leoni S, Brambilla D, Risuleo G, et al. Effect of different whole body hyperthermic session on the heat shock response in mice liver

- and brain. *Mol Cell Biochem*, 2000, 204: 41-47.
- 7 Sunuki T, Usuda N, Murata S, et al. Presence of molecular chaperones, heat shock cognate(HSC) 70 and heat shock proteins (HSP) 40, in the postsynaptic structures of rat brain. *Brain Res*, 1999, 816: 99-110.
- 8 Tytell M, Greenberg SG, Lasek RJ. Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res*, 1986, 363: 161-164.
- 9 Caprioli J, Kitano S, Morgan JE. Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37: 2376-2381.
- 10 Monyer H, Goldberg WP, Choi DW. Glucose deprivation neuronal injury in cortical culture. *Brain Res*, 1989, 483: 347-354.
- 11 Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against HSP70. *Science*, 1988, 242: 433-436.
- 12 Park KH, Cozier F, Ong OC, et al. Induction of heat shock protein 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *IOVS*, 2001, 42: 1522-1530.
- 13 Barbe M, Tytell M, Gower D, et al. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science*, 1988, 241: 1817-1820.
- 14 Desmettre T, Maurage CA, Serge M. Heat shock protein hyperexpression on chorioretinal layers after transpupillary thermotherapy. *IOVS*, 2001, 42: 2976-2980.
- 15 Ishii Y, Kwong JM, Caprioli J. Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 1982-1992.

(收稿日期:2003-12-29)

(本文编辑:朱敏)

· 消息 ·

第八届全国眼科激光学术会议征文

为进一步交流激光医学在眼科基础和临床应用方面的新进展,推动我国眼科激光医学的发展,经中华医学会激光医学分会批准,全国眼科激光学组拟于 2005 年 9 月中旬在沈阳召开第八届全国眼科激光学术会议。届时大会将组织专题讲座和讨论,内容丰富,会议将给予继续教育学分。

会议征文要求:(1)未在正式刊物上发表的有关激光在眼科基础研究、临床研究和临床经验总结等内容的文章,均可参加本次会议交流;(2)要求论文摘要及全文各一份(格式为目的、方法、结果和结论四部分),写明文章题目、作者姓名、单位、详细地址、邮编及联系电话,A4 纸打印,并按 Word 格式输入软盘,将软盘及打印稿一并寄来。欢迎以电子邮件方式投稿。请在信封及稿件上注明“会议征文”。征文截稿日期为 2005 年 5 月 31 日。

投稿寄沈阳市和平区南京北街 155 号中国医科大学附属第一医院眼科陈蕾收,邮编 110001,Email:leichen51@hotmail.com,联系电话/传真:024-23252375。大会将组织医疗产品展览会,欢迎各厂商参加。

中华医学会激光医学分会眼科激光学组

冷冻干燥羊膜临床应用研讨会在南昌召开

由江西省医学会眼科专业委员会主办的“冷冻干燥羊膜临床应用研讨会”于 2004 年 12 月 17 日在江西省南昌市召开。陈家祺、卜春及、李定章及周世有等国内著名眼科专家与学者出席会议。

冷冻干燥生物羊膜为近日研制成功的新成果。此项技术已通过国家食品药品监督管理局认证,获得正式生产批文。该羊膜在制备中严格控制原材料来源,采用科学的钴 60 灭菌技术。解决了羊膜在临床使用中病原微生物特别是肝炎、梅毒、艾滋病等病毒对患者污染风险的问题,确保了羊膜使用的安全性。通过低温真空干燥与脱水等技术,使羊膜在无保护液的条件下常温长期保存,大大促进了羊膜手术在临床中的推广与运用。陈家祺等专家就该羊膜在临床应用与羊膜未来发展方向发表了意见,同时还进行了羊膜移植手术的学术讲座。

江西省医学会