

视神经损伤对大鼠视网膜兴奋性氨基酸转运蛋白-1 表达的影响

陈海英 黄正如 叶 凯

Effect of optical nerve contusion on expression of excitatory amino acid transporter-1 in rat retina

Chen Haiyin, Huang Zhengru, Ye Kai. Department of Ophthalmology, Changshu NO. 2 People's Hospital, Changshu 215500, China

Abstract Objective The high concentration of glutamate in intercellular matrix of retina induce the apoptosis of retinal ganglion cells by playing the excitotoxicity. Many researches and our previous study also showed that injury of optical nerve, ocular hypertention and ischemia of retina results in the increase of glutamate concentration in vitreous. The aim of this study was to investigate the expression of excitatory amino acid transporter-1 (EAAT-1) in rat retina after optical nerve contusion. **Methods** The model of optical nerve contusion was established in forty-eight Sprague-Dawley (SD) rats by clipping exposure optical nerve for 30 seconds with artery forceps in the right eyes as experimental eyes, and the optical nerves of left eyes were not clipped as sham control group. Vitreous samples were collected from 24 rats at 1 day, 7, 14 days after contusion, and the glutamate concentration in vitreous was detected by high-performance liquid chromatography. The chromatographic peak area was recommended as the calculating index of glutamate concentration. Eyeballs of other 24 rats were enucleated at above time points for the detection of expression of EAAT-1 by immunohistochemistry, and the expression of EAAT-1 was quantitated using mean gray scale. **Results** The vitreous glutamate concentration in the experimental eyes was higher than that of the sham eyes at 1 day, 7, 14 days after contusion ($t_{1h} = 10.171, P = 0.000; t_{7h} = 3.871, P = 0.006; t_{14h} = 5.599, P = 0.001$). However, the expression level of EAAT-1 was significantly lower in experimental eyes than that of the sham eyes at 1 day, 7, 14 days after contusion ($t_{1h} = 3.460, P = 0.011; t_{7h} = 4.182, P = 0.004; t_{14h} = 4.077, P = 0.005$). **Conclusion** Optical nerve contusion could down-regulate the expression of EAAT-1 in retina, which results in glutamate accumulation.

Key words optical nerve contusion; glutamate; excitatory amino acid transporter-1

摘要 目的 研究视神经损伤对兴奋性氨基酸转运蛋白-1 (EAAT-1) 的表达以及对视网膜谷氨酸 (Glu) 摄取的影响。**方法** 建立大鼠右眼视神经损伤模型 48 只。术后 1、7、14 d 以高效液相色谱分析检测大鼠玻璃体谷氨酸浓度; 通过免疫组织化学检测大鼠视网膜 EAAT-1 的表达。**结果** 视神经损伤后 1、7、14 d, 实验眼玻璃体谷氨酸浓度升高, 与对照眼比较, 差异均有统计学意义 ($t_{1h} = 10.171, P = 0.000; t_{7h} = 3.871, P = 0.006; t_{14h} = 5.599, P = 0.001$); 实验眼视网膜 EAAT-1 表达降低, 与对照眼比较, 差异均有统计学意义 ($t_{1h} = 3.460, P = 0.011; t_{7h} = 4.182, P = 0.004; t_{14h} = 4.077, P = 0.005$)。**结论** 视神经损伤后视网膜内谷氨酸积聚, 与视网膜 EAAT-1 的表达降低有关。

关键词 视神经损伤; 谷氨酸; 兴奋性氨基酸转运蛋白-1

分类号 R 774.6 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808 (2009) 10-0884-04

视网膜细胞间隙高浓度的谷氨酸 (glutamate, Glu) 对视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 具有兴奋性毒性作用而导致其凋亡^[1-2]。研究表明视神

经损伤、高眼压、视网膜缺血可导致玻璃体 Glu 浓度升高^[3-5], 实验性急性高眼压能引起兔眼玻璃体 Glu 浓度明显升高^[6]。本研究旨在探讨视神经损伤后兴奋性氨基酸转运蛋白-1 (excitatory amino acid transporter-1, EAAT-1) 的表达变化, 了解视网膜对 Glu 摄取功能的改变。

作者单位: 215500 常熟市第二人民医院眼科 (陈海英、黄正如), 病理科 (叶凯)

通讯作者: 黄正如 (Email: hzru@sina.com)

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级 SD 大鼠 48 只(南通大学医学院动物实验中心提供),雌雄各半,体重 200 ~ 250 g。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗大鼠 EAAT-1 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(北京博奥森生物技术有限公司)。氨基酸型离子交换分析柱(39 mm × 300 mm)及氨基酸型高效液相色谱分析仪(英国 Waters 公司)。

1.2 方法

1.2.1 视神经损伤模型的建立 48 只大鼠按 0.2 mL/kg 腹腔内注射 10% 水合氯醛麻醉,双眼局部聚维酮碘消毒后剪开鼻上穹隆部结膜,钝性分离暴露双眼视神经。反向动脉镊夹持右眼球后 1 mm 处视神经 30 s^[7],左眼视神经不予夹持而作为假手术对照。缝合结膜切口,涂 2% 金霉素眼膏 1 次。

1.2.2 标本取材 术后 1、7、14 d 分别任意选取 16 只大鼠,麻醉后摘除双眼。其中的任意 8 只大鼠左右眼以混合固定液(95% 乙醇:蒸馏水:40% 甲醛:冰醋酸为 10:7:2:1)固定,拟行组织病理学及免疫组织化学检查;另 8 只大鼠左右眼沿角膜巩膜缘剪开,取出全部玻璃体,置 0.5 mL Eppendorf 管中 -20 °C 冷冻保存,拟行玻璃体 Glu 浓度检测。

1.2.3 高效液相色谱分析检测 Glu 的浓度 取 0.1 mL 玻璃体样本以生理盐水稀释至 0.5 mL,加入磺基水杨酸钠 0.5 mg,混匀后 10 000 r/min 离心 5 min。取上清液,自动进样器进样 60 μL。甲溶液(柠檬酸钠 19.6 g、酚 1.0 g,双蒸水定容至 1 000 mL,硝酸调节 pH 至 3.05)和乙溶液(硼酸 1.5 g、硝酸钠 21.0 g,双蒸水定容至 1 000 mL,6 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 9.60) 62 °C 梯度洗脱 30 ~ 90 min。邻苯二甲醛柱后衍生法荧光检测玻璃体中的 Glu。通过测定标准样品中的 Glu,根据标本的 Glu 的色谱峰面积计算玻璃体 Glu 的浓度。

1.2.4 组织病理学及免疫组织化学检测 EAAT-1 的表达 眼球固定后赤道部开窗摘出晶状体,低梯度乙醇脱水,软蜡包埋,8 μm 厚连续切片,取经视盘的视网膜横切片。切片水化,以 3% 过氧化氢处理后抗原修复,山羊血清封闭,室温孵育后加兔抗大鼠 EAAT-1 单克隆抗体一抗(1:300),4 °C 过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:200),37 °C 孵育后二氨基联苯胺(DAB)显色,脱水后中性树胶封片。同时行常规苏木精-伊红染色。以大鼠脑海马组织为阳性对照;PBS 代替一抗为阴性对照。每只眼取 2 张切片,每张切片 200 倍显微镜下以视盘为中心两侧对称各取 2 个部位图像(距视盘边缘 2 个、4 个视盘直径),以 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图像系统测量内核层 EAAT-1 免疫组织化学染色的平均灰度值(所取部位的平均灰度值 - 背景灰度值)。

1.3 统计学方法

采用 Stata 7.0 统计学软件进行统计学分析。实验测试指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组和假手术组手术前后玻璃体中 Glu 浓度的变化和 EAAT-1 在视网膜中表达变化的比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术后玻璃体 Glu 浓度的变化

视神经损伤后 1、7、14 d,实验眼和对照眼玻璃体 Glu 浓度的差异均有统计学意义(表 1)。结果表明视神经损伤后玻璃体 Glu 浓度升高。

2.2 手术后 EAAT-1 的表达变化

Müller 细胞构成视网膜支架,贯穿视网膜神经上皮层。生理情况下,EAAT-1 主要存在于 Müller 细胞的细胞膜。因此,EAAT-1 染色表现为内核层的颗粒状和垂直走向的丝状棕色染色(图 1)。免疫组织化学染色的灰度分析结果显示:视神经损伤后 1、7、14 d,实验眼与对照眼视网膜 EAAT-1 的灰度值比较差异有统计学意义(表 1)。结果表明视神经损伤后大鼠视网膜 EAAT-1 的表达水平降低。

表 1 手术后玻璃体中 Glu 浓度变化及 EAAT-1 在视网膜的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The level of glutamate in vitreous and expression of EAAT-1 in retina after operation($\bar{x} \pm s$)

Group	Glu level(μmol/L)		<i>t</i>	<i>P</i>	EAAT-1(scale value)		<i>t</i>	<i>P</i>
	Sham eyes	Exp eyes			Sham eyes	Exp eyes		
Post-op 1 d	4.62 ± 1.41	8.52 ± 2.21	10.171	0.000	54.59 ± 8.17	56.92 ± 8.45	3.460	0.011
Post-op 7 d	4.58 ± 1.33	9.85 ± 4.19	3.871	0.006	53.92 ± 10.68	57.84 ± 11.65	4.182	0.004
Post-op 14 d	5.37 ± 2.47	12.06 ± 4.39	5.599	0.001	55.02 ± 7.06	60.93 ± 8.64	4.077	0.005

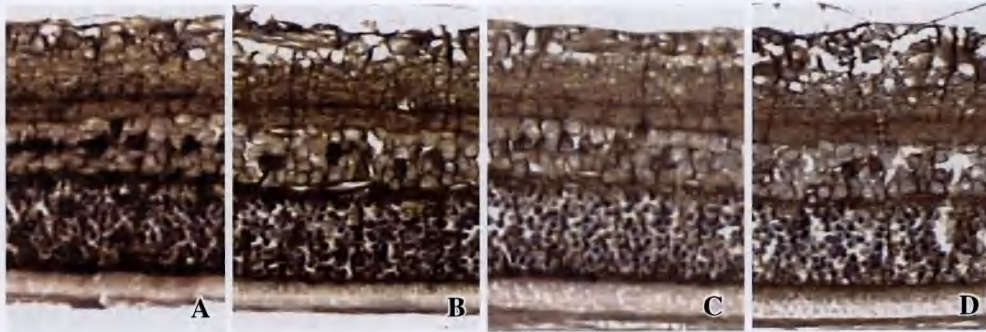


图1 视神经损伤后不同时间大鼠视网膜 EAAT-1 的表达(×200) A:正常对照 B:损伤后 1 d C:损伤后 7 d D:损伤后 14 d

Fig.1 Immunohistochemistry of EAAT-1 resulted in labeling of cell bodies in the inner nuclear layer, together with processes with a wide distribution throughout the retina. The intensity of labeling decreased after optic nerve contusion(×200) A:normal control B:1 day after contusion C:7 days after contusion D:14 days after contusion

3 讨论

Glu 是哺乳动物中枢神经系统和视网膜中双极细胞等 Glu 能神经元的兴奋性神经递质。目前,哺乳动物体内已发现 5 种与神经系统 Glu 清除相关的 EAAT, 其中有 4 种在视网膜内存在。EAAT-1 主要存在于 Müller 细胞和星形胶质细胞;EAAT-2 存在于视锥细胞和双极细胞;EAAT-3 存在于少突胶质细胞和 RGCs; EAAT-4 存在于光感受器和双极细胞^[8-11]。生理情况下,视网膜内双极细胞等释放的 Glu 部分被 Müller 细胞膜上的 EAAT-1 摄取,在谷氨酰胺合酶的催化下合成谷氨酰胺后作为 Glu 的前体再运输至神经元,即“谷氨酸-谷氨酰胺”循环^[12];部分 Glu 被双极细胞膜上的 EAAT-2 摄取而再入囊泡释放;小部分 Glu 扩散至玻璃体,最终随房水排出。

本研究结果显示视神经损伤后 1、7、14 d,大鼠实验眼玻璃体 Glu 的浓度均高于对照眼。玻璃体 Glu 是由视网膜细胞间隙弥散而来,玻璃体 Glu 浓度的升高表明了视网膜细胞间隙内 Glu 积聚。而同期大鼠实验眼视网膜 EAAT-1 的表达均低于对照眼,表明视神经损伤可导致视网膜 EAAT-1 的表达降低。研究表明 Müller 细胞在视网膜突触间隙 Glu 的摄取中占支配优势,而表达于 Müller 细胞的 EAAT 只有 EAAT-1^[12-13]。近来的研究发现 EAAT-1 敲除的小鼠可出现 RGCs 的自发凋亡及视神经萎缩,也证实了 EAAT-1 对视网膜突触间隙 Glu 清除发挥的重要作用^[14]。因此,Müller 细胞的 EAAT-1 的表达降低必然导致视网膜内 Glu 的积聚。

只有存在神经元的情况下,大脑星形胶质细胞才能在体外表达 EAAT-2^[15-16]。也有研究表明 Müller 细胞谷氨酰胺合酶的表达以 Müller 细胞与 RGCs、双极

细胞等神经元之间的相互作用为前提^[17]。如果 Müller 细胞 EAAT-1 的表达与 RGCs 等神经元之间也存在与此类似的关系,那么视神经损伤导致的 RGCs 死亡可引起 Müller 细胞低表达 EAAT-1。

因此,本研究认为视神经损伤后,视网膜突触间隙 Glu 积聚,玻璃体 Glu 浓度增高是其表现;Müller 细胞 EAAT-1 低表达是 Glu 的积聚的原因之一。视神经、视

网膜损伤后导致 RGCs 死亡的机制非常复杂,但 Glu 的兴奋性毒性作用参与其中。维持或促进 EAAT-1 的表达可能一定程度上降低视网膜突触间隙 Glu 的浓度,从而抑制视神经损伤后 RGCs 的死亡。

参考文献

- 1 Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ. Müller cell protection rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(11): 3444-3450
- 2 Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, et al. Chronic low dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells; toxic blocked by memantine [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(8): 1618-1624
- 3 Brooks DE, Garcia GA, Dreyer EB, et al. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma [J]. Am J Vet Res, 1997, 58(8): 864-867
- 4 Yoles E, Schwartz M. Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve [J]. Arch Ophthalmol, 1998, 116(7): 906-910
- 5 刘东敬, 陈晓明, 盘如刚, 等. 大鼠慢性高血压模型的建立及玻璃体游离谷氨酸变化的实验研究 [J]. 眼科研究, 2008, 26(5): 343-346
- 6 黄正如, 管怀进, 李炳源. 实验性青光眼兔眼玻璃体谷氨酸浓度的动态变化 [J]. 中国实用眼科杂志, 2004, 22(13): 285-286
- 7 黄厚斌, 马志中, 张卯年. 大鼠视神经部分损伤后神经纤维再生的形态学观察 [J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(3): 241-245
- 8 Ariza JL, Fairman WA, Wadiche JI, et al. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex [J]. J Neurosci, 1994, 14(9): 5559-5569
- 9 Rauen T, Kanner BI. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae [J]. Neurosci Lett, 1994, 169(2): 137-140
- 10 Rauen T, Rothstein JD, Wassle H. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina [J]. Cell Tissue Res, 1996, 286(3): 325-336
- 11 Pow DV, Barnett NL. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina [J]. Neurosci Lett, 2000, 280(1): 21-24
- 12 Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, et al. High-affinity glutamate transporters in the rat retina; a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance [J]. Cell Tissue Res, 1998, 291(1): 19-31
- 13 Lehre KP, Davanger S, Danbolt NC. Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina [J]. Brain Res, 1997, 744(1): 129-137
- 14 Takayuki H, Chikako H, Kazuaki N, et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma [J]. J Clin Invest, 2007, 117(7): 1763-1770
- 15 Swanson RA, Liu J, Miller JW, et al. Neuronal regulation of glutamate

transporter subtype expression in astrocytes [J]. J Neurosci, 1997, 17(3):932-940
 16 Gundersen V, Danbolt NC, Ottersen OP, et al. Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate [J]. Neuroscience, 1993, 57(1):97-111
 17 Reisfeld S, Vardimon L. Cell to cell contacts control the transcription

activity of the glucocorticoid receptor[J]. Mol Endocrinol, 1994, 8(9):1224-1233

(收稿:2009-01-08 修回:2009-08-18)

(本文编辑:王莉红)

· 短篇论著 ·

前房穿刺术治疗兔角膜碱烧伤的研究

李艳颖 傅少颖 刘红玲 张 萍 吕冰洁

碱烧伤后早期合理的治疗可以减少远期并发症的发生,其中应用前房穿刺术的时机选择仍然存在很大争议。本研究制作兔角膜碱烧伤模型,观察前房穿刺术对角膜新生血管(CNV)及角膜溃疡等的影响,以探讨前房穿刺术在早期治疗角膜碱烧伤中的临床应用价值。

1 材料与与方法

1.1 动物模型与分组 健康成年哈白兔 24 只,体重 2.5~3.0 kg,雌雄兼用,免龄 3 个月;选择单眼作为实验眼。诱导全身麻醉后,将直径 8 mm、浸入 1 mol/L NaOH 溶液中 1 min 的滤纸片贴附于实验兔角膜中央 2 min 后取出,立即用生理盐水冲洗角膜表面和结膜囊 1 min,形成角膜中央边界清楚的圆盘状白色碱性烧伤区。依据 Hughes 分度法确认为中度角膜碱烧伤模型^[1-2]。按照随机数字表法将 24 只实验动物随机分为 4 组,第 1 组为烧伤对照组未进行前房穿刺;第 2 组为 2 h 单次前房穿刺;第 3 组为 24 h 单次前房穿刺;第 4 组分别在 2、24、72、120 h 行前房多次穿刺。

1.2 前房穿刺方法 在倍诺喜表面麻醉下进行,选择角膜颞侧 5:00 位为穿刺点,利用 1 mL 注射器在角膜缘内 1 mm 处透明角膜进针,抽取 0.2 mL 房水^[3-4]。

1.3 观察指标 CNV 面积:烧伤后第 5 天开始记录长入角膜的新生血管长度并计算 CNV 面积,计算公式: $S = C/12 \times 3.1416 \times [r^2 - (r-l)^2]$,其中 S 为 CNV 生长面积, C 为 CNV 网的跨圆周钟点数, r 为角膜半径, l 为 CNV 长度^[5-6]。角膜水肿的评估参照 Holland 标准^[7]。角膜溃疡情况:21 d 时处死实验动物,取下完整角膜组织进行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察。

1.4 统计学方法 数据采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析,各组的 CNV 面积比较和角膜水肿评分比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CNV 面积 烧伤后第 3 天角膜缘有新生血管芽生长,第 5 天以后新生血管呈毛刷状向烧伤区生长。第 1 组 CNV 生长较快、密集,充血明显;第 2 组、3 组 CNV 生长较第 1 组缓慢;第 4 组 CNV 较纤细,第 14 天达到高峰,第 21 天时,各组 CNV 均有不同程度的后退,以第 4 组明显(图 1~4)。14 d 时, 4 组 CNV

面积比较差异有统计学意义 ($F = 9.396, P < 0.01$),第 2 组、3 组间比较差异无统计学意义,第 2 组、4 组比较及第 3 组、4 组间比较差异均有统计学意义 ($t_1 = 2.42, t_2 = 2.74, P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组 CNV 面积的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

分组	CNV 面积		
	7 d	14 d	21 d
1	63.98 ± 15.30	130.75 ± 6.78	125.93 ± 7.09
2	53.73 ± 11.38	120.54 ± 9.34	113.89 ± 12.63
3	55.89 ± 6.42	115.69 ± 4.90	105.26 ± 4.08
4	24.51 ± 8.20	107.82 ± 8.82	85.97 ± 13.03
F		9.396	
P		< 0.01	

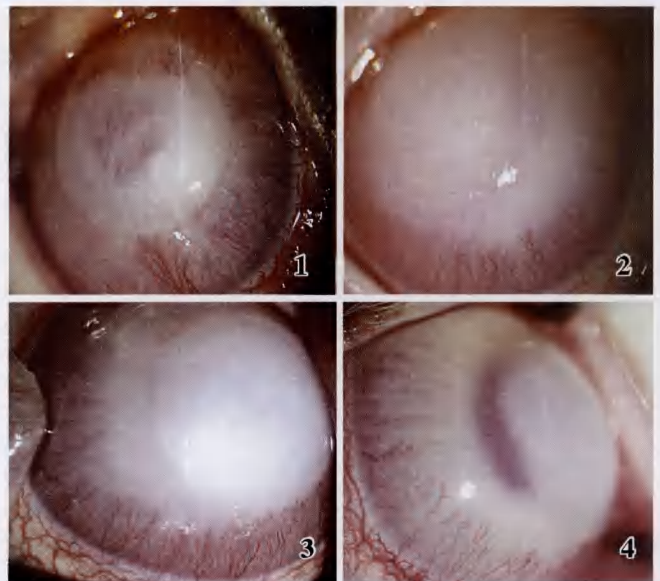


图 1 第 1 组烧伤后 14 d, CNV 密集, 上方长入烧伤区, 中央角膜溃疡明显, 角膜明显水肿 图 2 第 1 组烧伤后 14 d 全周 CNV 较密集, 血管较第 1 组细、短, 角膜水肿 图 3 第 3 组烧伤后 14 d, 角膜全周新生血管, 生长较密集未达烧伤区, 角膜水肿较第 1 组、2 组轻, 隐约见部分虹膜 图 4 第 4 组烧伤后 14 d, CNV 明显减少, 角膜上皮完整, 角膜水肿明显减轻, 可透见虹膜和瞳孔

2.2 角膜水肿评分结果 烧伤后角膜中央形成一直径 8 mm、乳白色且边界清楚的圆形混浊。7 d 时, 4 组比较差异有统计学意义 ($F = 11.26, P < 0.01$), 第 2、3、4 组间比较差异均无统计学

作者单位: 150001 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科
 通讯作者: 傅少颖 (Email: fushaoying@126.com)