

银杏内酯 B 对谷氨酸诱导视网膜神经细胞凋亡的影响

郭梦翔, 朱晓波, 罗 燕, 高 艺, 唐仕波

(中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】探讨银杏内酯 B 拮抗谷氨酸诱导的体外培养新生大鼠视网膜神经细胞凋亡作用及其可能的机制。【方法】MTT 法检测不同浓度谷氨酸对原代培养 SD 大鼠视网膜神经细胞的兴奋性毒性作用。细胞分为正常组、谷氨酸组和不同浓度(10、50、100 $\mu\text{mol/L}$)银杏内酯 B 治疗组($n = 6$)。MTT 法检测不同浓度的银杏内酯 B 对谷氨酸诱导凋亡的视网膜神经细胞存活率的影响。流式细胞仪结合 Annexin V/PI 检测细胞凋亡率, JC-1 染色检测线粒体膜电位。【结果】100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸作用下, 视网膜神经细胞的吸光度值降低至 0.50 ± 0.07 , 凋亡率为 52.4%, JC-1 的红/绿比值为 1.77。10 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 银杏内酯 B 作用下神经细胞的吸光度值分别为 0.52 ± 0.09 、 0.64 ± 0.15 和 0.74 ± 0.11 , 细胞的凋亡率分别下降至 36.7%、12.4% 和 2.1%, JC-1 的红/绿比值则分别上升为 1.898、2.089、2.276 ($P < 0.05$)。【结论】银杏内酯 B 可以拮抗谷氨酸诱导的视网膜神经细胞凋亡, 其作用机制可能与提高线粒体膜机能有关。

关键词: 视网膜神经细胞培养; 谷氨酸; 银杏内酯 B; 凋亡

中图分类号: R774.1+2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)06-0690-05

Effects of Ginkgolide B against Glutamate-induced Apoptosis on Retinal Neurons

GUO Meng-xiang, ZHU Xiao-bo, LUO Yan, GAO Yi, TANG Shi-bo

(State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmologic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To investigate the antiapoptosis effects of ginkgolide B against glutamate-induced apoptosis in cultured neonatal rat retinal neurons.【Method】The toxicity of glutamate with different concentration on primary cultured retinal neurons was quantified by MTT. Cultured retinal neurons were divided into 6 groups: Normal group, Glutamate group, 10 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group, 50 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group, and 100 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group ($n = 6$). Neuronal survival was quantified by MTT, and apoptosis was observed by Annexin V/PI and JC-1 assay with flow cytometry.【Result】After treated by 100 $\mu\text{mol/L}$ glutamate, the absorbance value of cultured retinal neurons were reduced to 0.50 ± 0.07 , the apoptosis rate was 52.4% and the red/green rate of JC-1 was 1.77. Cocultured with ginkgolide B in 10 $\mu\text{mol/L}$ ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ respectively increased the neuronal absorbance rate to 0.52 ± 0.09 , 0.64 ± 0.15 , and 0.74 ± 0.11 , while reduced the apoptosis rate to 36.7%, 12.4%, and 2.1% and improved the red/green rate of JC-1 assay to 1.898, 2.089, and 2.276 ($P < 0.05$).【Conclusion】Glutamate toxicity in cultured retinal neurons can be inhibited by Ginkgolide B. The mechanism might be to improve the function of mitochondrial.

Key words: retinal neurons culture; glutamate; ginkgolide B; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(6):690-694]

视网膜神经细胞,特别是光感受器细胞凋亡是视网膜变性性疾病的共同病理通路^[1-2]。Clarke

等认为在视网膜变性疾病中感光细胞变性可能与谷氨酸等兴奋性氨基酸在局部积聚有关^[3]。银

收稿日期: 2008-05-10

基金项目: 广东省科技计划基金国际合作项目(粤科技 A050100029); 广东省建设中医药强省专项基金(2008087)

作者简介: 郭梦翔(1975-), 女, 四川泸州人, 博士, 现在广州市儿童医院眼科工作; 唐仕波, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: tangsb@mail.sysu.edu.cn

杏内酯B(ginkgolide B, GB)是银杏叶提取物中的主要药效成分,是目前已知最强的天然特异性血小板活化因子(Platelet-activating factor, PAF)拮抗剂,体外实验证实,银杏内酯B可以拮抗谷氨酸诱导的培养脑皮质神经细胞凋亡^[4-5]。在本研究中,我们建立谷氨酸诱导的原代培养的大鼠视网膜神经细胞凋亡模型,观察银杏内酯B对视网膜神经细胞的保护作用,并进一步探讨可能的作用机制,以期对视网膜变性疾病的治疗提供新的途径。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

出生后7~8 d的SD乳鼠,雌雄不拘,由中山大学实验动物中心提供,粤监证字2006A064。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗神经原特异性烯醇化酶(NSE)多克隆抗体、兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体、SABC-FITC和SABC-CY3免疫组织化学试剂盒均购自武汉博士德公司;小鼠抗视紫红质单克隆抗体(Rhodopsin,美国NeoMarkers);Annexin V/PI检测试剂盒(深圳晶美),JC-1荧光探针(美国Molecular Probe),银杏内酯B(含量≥98%)(南京海陵中药制品公司)。流式细胞仪(美国Beckman-Coulter),酶标仪(美国sigma)。

1.3 方 法

1.3.1 视网膜神经细胞的培养和鉴定 按文献^[6]报道方法培养新生SD大鼠视网膜神经细胞。细胞培养7 d后,以NSE、Rhodopsin和GFAP为一抗,相应的荧光抗体为二抗,免疫荧光双染对培养细胞进行鉴定。阴性对照采用PBS代替一抗。

1.3.2 噻唑啉(MTT)法检测不同浓度谷氨酸对视网膜神经细胞存活率的影响 调整视网膜神经细胞的浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,每孔200 μL 接种于多聚赖氨酸提前包被的96孔板内,在37℃、5%CO₂的培养箱内培养,至第7天随机分为3大组:正常对照组、100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸组和1 mmol/L谷氨酸组,其中后两组分别按照谷氨酸干预后30 min、1 h、2 h、8 h和12 h分为5小组,每组设5个复孔,同时设定空白对照孔。在不同时间点终止干预,按MTT法常规操作,测定并记录各孔在490 nm的吸光度值(A)。细胞存活率(%) = 各组测定

的吸光度值/正常对照组吸光度值 × 100%。

1.3.3 MTT法测定GB对视网膜神经细胞存活率的影响 实验共分为5组。神经细胞接种后7 d分组:A组(正常对照组)及B组(谷氨酸模型组)分别给予正常培养液及100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸干预12 h,PBS洗两次后换用新鲜培养液继续培养12 h;C~E组(GB治疗组):培养第6天分别加入浓度为10、50和100 $\mu\text{mol/L}$ 的GB培养24 h,再加入100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸干预12 h后终止干预,PBS洗两次后换用新鲜培养液继续培养12 h。MTT法测定各组吸光度值,计算细胞存活率。

1.3.4 Annexin V/PI细胞凋亡检测 按方法1.3.3项下分组干预细胞,终止干预后,PBS洗细胞两次,加入稀释的结合缓冲液200 μL 重悬细胞;加入3 μL Annexin V/FITC混匀,室温避光10 min;继续加入2 μL PI,混匀,室温避光5 min;补充结合缓冲液300 μL 混匀,流式细胞仪检测。

1.3.5 流式细胞仪检测线粒体膜电位变化 按方法1.3.3项下分组干预细胞,终止干预后,PBS洗细胞两次。以无酚红DMEM培养液配置浓度为0.2 $\mu\text{L/mL}$ 的JC-1染液,每管细胞沉淀加入500 μL 吹打混匀,37℃避光孵育30 min。300 × g离心5 min,弃上清,500 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.3.6 统计方法 采用SPSS12.0软件包中的单因素方差分析法(ANOVA)对数据进行分析,结果以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 $P < 0.05$ 表示差别具有显著性意义。

2 结 果

2.1 细胞形态及免疫荧光双染细胞鉴定

接种24 h,绝大多数细胞贴壁,或三五聚集成团,或散在生长。部分活性较好的细胞伸出短小突起(图1A)。随着时间延长,细胞突起延长,接种后7 h神经细胞突起之间相互交织成网状,部分细胞胞体伸展成不规则形、梭形,胞体饱满,立体感强,边界清楚(图1B)。此后神经胶质细胞逐渐爬出,位于神经细胞的下方,色泽较灰暗,呈不规则片状,培养后20 d绝大多数细胞为神经胶质细胞。免疫荧光双染显示培养后第7天,绝大多数细胞NSE阳性(图1C)。Rhodopsin阳性的细胞约占半数(图1D)。

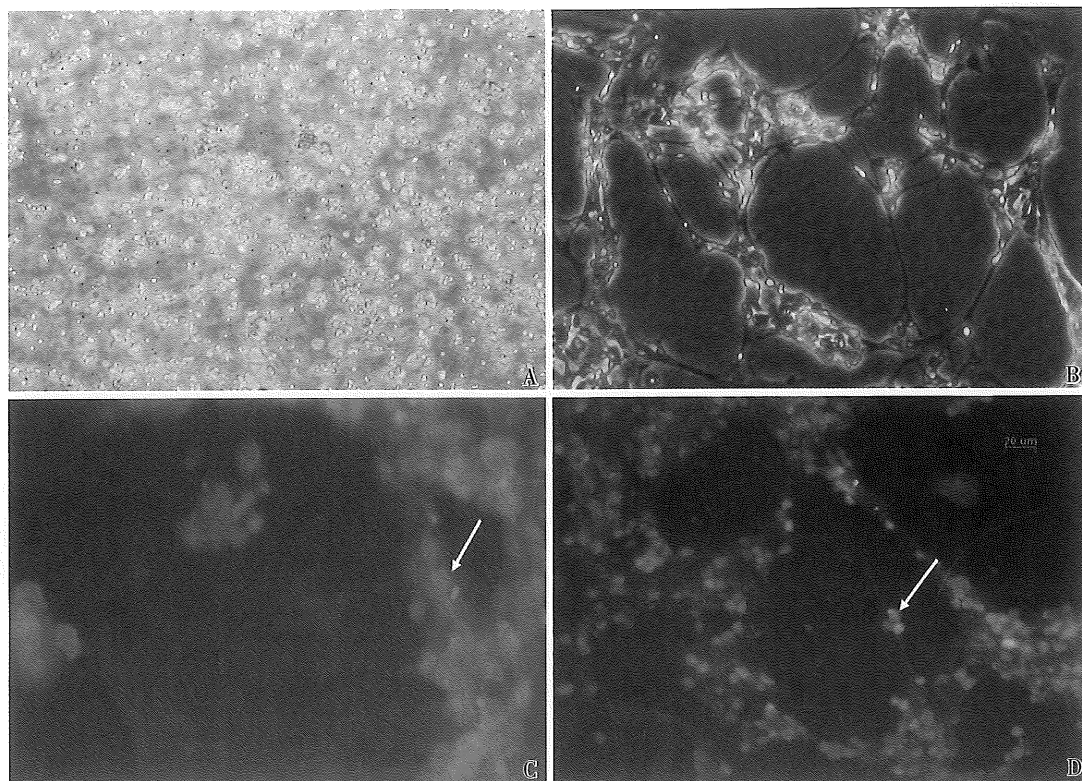


图 1 体外培养的视网膜神经细胞图片及神经细胞荧光免疫双染鉴定结果

Fig.1 Photomicrograph of cultured retinal neurons and their double immunofluorescence labeling results

A: 24 h of cultured retinal neurons ($\times 100$); B: 7 d of cultured retinal neurons ($\times 100$); C: A double immunofluorescence labeling of NSE (red fluorescence) and GFAP (green fluorescence) in 7 d of cultured retinal neurons ($\times 200$). The proportion of NSE-positive neurons were nearly 80%; D: A double immunofluorescence labeling of NSE (green fluorescence) and Rhodopsin in 7 d of cultured retinal neurons ($\times 200$). The NSE-Rhodopsin-positive cells were shown in orange fluorescence (white arrow label).

2.2 谷氨酸对体外培养视网膜神经细胞的兴奋性毒性

正常对照组的 A 值为 0.97 ± 0.23 ; 12 h 高浓度谷氨酸组的 A 值为 0.48 ± 0.13 , 低浓度组为 0.53 ± 0.21 。其余各时间点的 A 值详见表 1; 经统计分析, 从给予谷氨酸后 2 h 开始, 两个谷氨酸组的 A 值与正常对照组相比差异都有显著意义。

表 1 MTT 法测定谷氨酸对培养视网膜神经细胞吸光度值的影响

Table 1 The influence of glutamate on A-value of cultured retinal neurons measured by MTT-assay ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Time (h)	Control	Glu 1 mmol/L	Glu 100 μ mol/L
0.5		0.95 ± 0.16	0.90 ± 0.24
1		0.77 ± 0.11	0.79 ± 0.16
2	0.97 ± 0.23	$0.66 \pm 0.12^{1)}$	$0.71 \pm 0.10^{1)}$
8		$0.50 \pm 0.04^{1)}$	$0.68 \pm 0.42^{1)}$
12		$0.48 \pm 0.13^{1)}$	$0.53 \pm 0.21^{1)}$

1) $P \leq 0.05$ vs control

2.3 MTT 法测定 GB 对视网膜神经细胞存活率的影响

正常对照组 A 值为 0.85 ± 0.03 , 100 μ mol/L 谷氨酸(B 组)作用 12 h 后 A 值明显下降到 0.50 ± 0.07 ($P \leq 0.05$), 与 A 组(正常对照组)相比神经细胞存活率降低到 57.4%。预先给予不同浓度的 GB (C-E 组) 后视网膜神经细胞的 A 值分别为 0.52 ± 0.09 、 0.64 ± 0.15 和 0.74 ± 0.11 。各组的 A 值变化趋势见图 2。

2.4 Annexin V/PI 细胞凋亡检测

正常对照组神经细胞凋亡率为 5.5%; 谷氨酸组凋亡率达到 52.4%; 10、50 和 100 μ mol/L 的 GB 组的凋亡率分别为 36.7%、12.4% 和 2.1% (图 3)。

2.5 流式细胞仪检测线粒体膜电位变化

各组细胞经 JC-1 染色后, 通过流式细胞仪检测红色荧光和绿色荧光平均荧光强度的变化(红/绿), 从而间接反映线粒体膜电位的变化。谷氨酸诱导后, 神经细胞红/绿比值为 1.77, 显著低于正

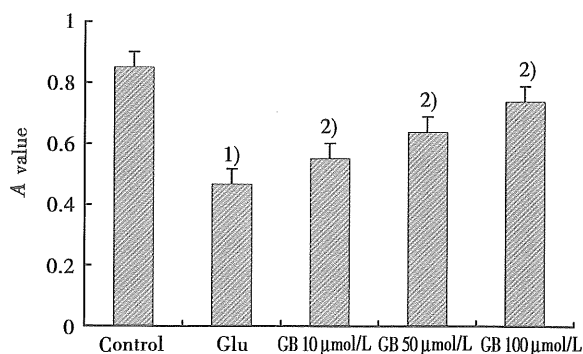


图2 MTT法检测谷氨酸和银杏内酯B对视网膜神经细胞的存活率的影响

Fig.2 The effect of glutamate and ginkgolide B on cell viability of retinal neurons by MTT

1) vs control, $P \leq 0.05$; 2) vs Glu, $P \leq 0.05$

常对照组;预先给予10~100 $\mu\text{mol/L}$ GB后红/绿比值逐渐增加,见图4。

3 讨论

研究表明谷氨酸兴奋性毒性作用与青光眼和糖尿病性视网膜病变等的发病机制息息相关^[7-9]。Clarke等认为在视网膜变性疾病中感光细胞变性可能是与谷氨酸等兴奋性氨基酸在局部积聚有关^[3]。这一假说也在视网膜变性模型rd1小鼠中

得到证明,应用谷氨酸受体拮抗剂CNQX可以抑制rd1小鼠视杆细胞的凋亡^[10]。由此可见,谷氨酸兴奋性毒性作用与视网膜变性的发病密切相关。

关于谷氨酸诱导凋亡的浓度,目前没有统一的标准。我们采用MTT法观察文献常用的两种浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 和1 mmol/L在不同作用时间下对体外培养的大鼠视网膜神经细胞的影响,以建立合适的视网膜神经细胞凋亡模型。结果发现,100 $\mu\text{mol/L}$ 和1 mmol/L谷氨酸作用下,随时间延长培养的视网膜神经细胞存活率逐渐降低,但是前者的下降趋势与1 mmol/L组相比更加缓和,到12 h还有约54%的细胞存活。由于我们的实验目的是观察银杏内酯B对谷氨酸诱导的视网膜神经细胞凋亡的保护作用,药物有一定的起效时间,所以我们认为选择更加缓和的致凋亡作用比较合适。

到目前为止,导致光感受器细胞凋亡的机制尚不十分明确。大量的研究表明,线粒体在调控细胞凋亡中起关键作用^[11-12]。线粒体膜通透性的改变是多种促细胞凋亡级联转导信号的枢纽,线粒体跨膜电位 $\Delta\psi_m$ 的破坏,被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件之一,它发生在细胞核凋亡特征(染色质浓缩、DNA断裂)出现之前,一旦线粒体跨膜电位崩溃,则细胞凋亡不可逆转。

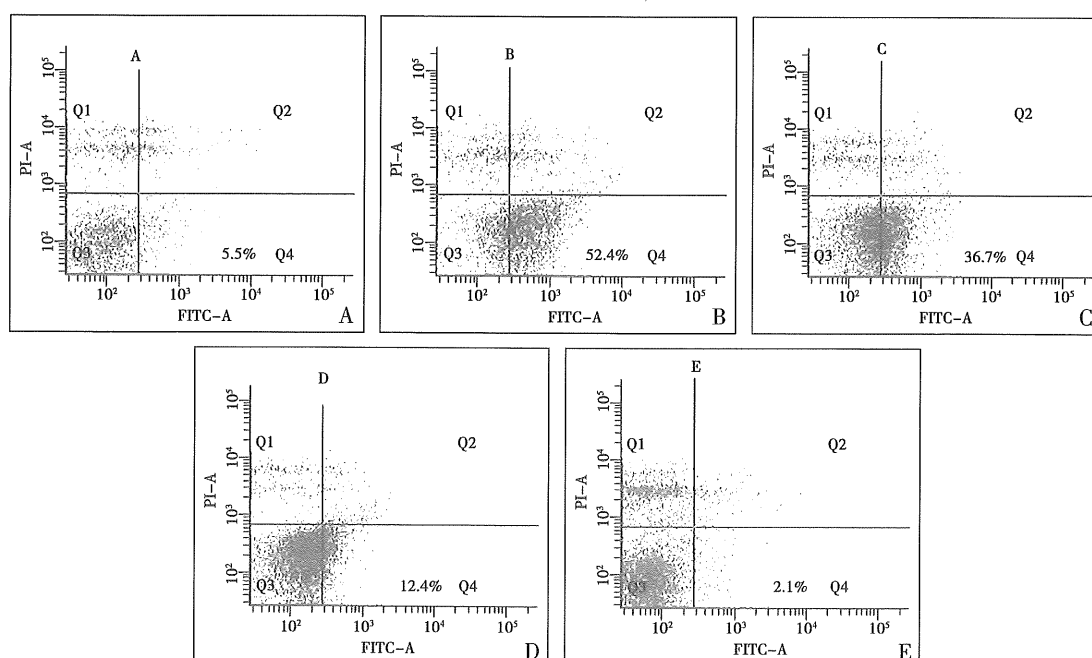


图3 Annexin V/PI联合流式细胞仪检测视网膜神经细胞凋亡

Fig.3 Apoptosis analysis of retinal neurons by Annexin V/PI with flow cytometry

A: Normal control group; B: Glu-treated group; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group; D: 50 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group; E: 100 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group.

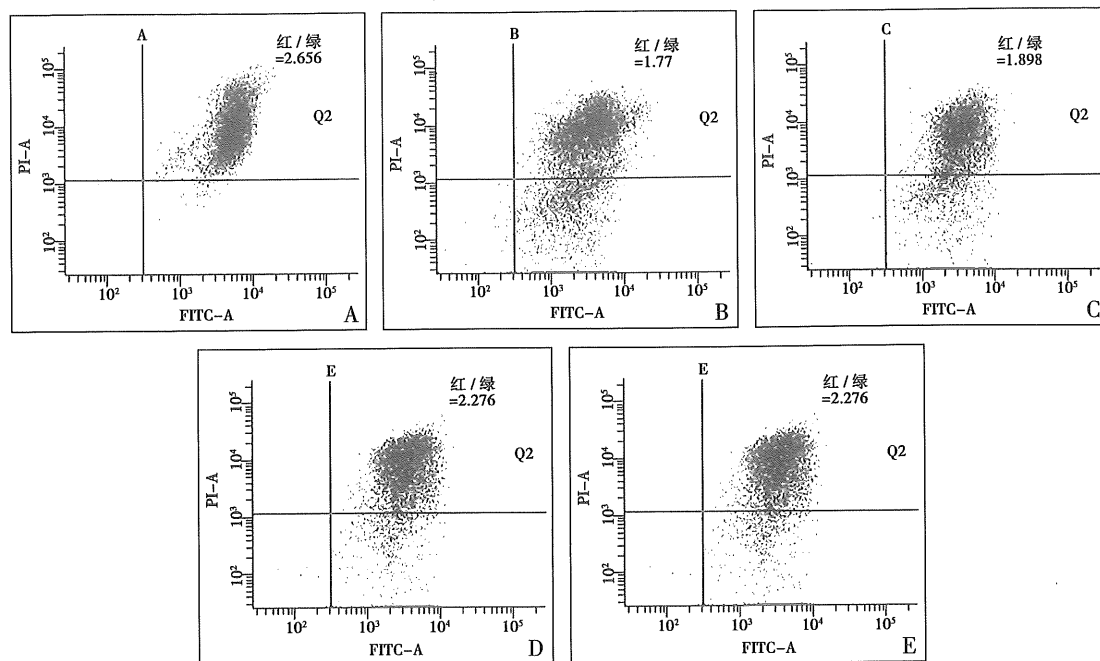


图 4 JC-1 联合流式细胞仪检测视网膜神经细胞的线粒体膜电位

Fig.4 The mitochondrial membrane potential of retinal neurons measured by JC-1 with flow cytometry

A: Normal control group; B: Glu-treated group; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group; D: 50 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group; E: 100 $\mu\text{mol/L}$ GB-treated group

本实验中 MTT 和 Annexin V/PI 的结果均显示,100 $\mu\text{mol/L}$ 的谷氨酸可以导致视网膜神经细胞存活率降低,凋亡率增加;预先给予不同浓度的银杏内酯 B 可以拮抗谷氨酸的致凋亡作用,在 10 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内该作用具有剂量依赖性;JC-1 的结果表明 GB 抑制谷氨酸的致凋亡作用可能是通过提高线粒体跨膜电位,从而阻断下游的凋亡级联反应,抑制凋亡相关因子的释放而实现的。

参考文献:

- [1] Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration[J]. Science, 2005,308(5720): 419-421.
- [2] Maubaret C, Hamel C. Genetics of retinitis pigmentosa: metabolic classification and phenotype/genotype correlations[J]. J Fr Ophtalmol, 2005,28(1):71-92.
- [3] Clarke G, Collins RA, Leavitt BR, et al. A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations[J]. Nature, 2000,406(6792):195-199.
- [4] Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, et al. Bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb761) protects against neuronal death in global brain ischemia and in glutamate-induced excitotoxicity [J]. Cell Mol Biol (Noisy-legrand), 2002,48(6):663-669.
- [5] 蔡卫斌,臧颖,余明华. 银杏内酯 B 对谷氨酸诱导大鼠大脑皮质神经元氧化损伤的影响[J]. 中山大学学报:医学科学版,2003,24(3):256-260.
- [6] 孟晶,唐仕波,林少芬,等. 银杏内酯 B 对体外培养的大鼠视网膜神经细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(2):791-795.
- [7] Kuehn MH, Fingert JH, Kwon YH. Retinal ganglion cell death in glaucoma: mechanisms and neuroprotective strategies [J]. Ophthalmol Clin North Am, 2005,18(3):383-395.
- [8] Guo L, Salt TE, Maass A. Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006,47(2):626-633.
- [9] Ng YK, Zeng XX, Zing EA. Expression of glutamate receptors and calcium-binding proteins in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Brain Res, 2004,1018(1):66-72.
- [10] Marie Noelle D, Valérie F, Nathalie N, et al. Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina[J]. Mol Vis, 2005,11(1):688-696.
- [11] Kalloniatis M, Tomisich G. Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina[J]. Prog Retin Eye Res, 1999, 18(6):811-866.
- [12] 彭心昭,陈英,朴英杰. 线粒体通透性与细胞自噬、凋亡的关系[J].解剖学研究,1999,21(2):128-130,138.

(编辑 刘清海)