

IBMX 对成年金黄地鼠视网膜节细胞存活的影响

朱永红, 李海标

(中山医科大学组织胚胎学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】探讨玻璃体内注射 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBM X)对切断视神经后视网膜节细胞存活的影响。【方法】用荧光素逆行示踪标记法和定量解剖学技术观察各组成年金黄地鼠于视神经切断 5、7、14 d 后视网膜节细胞的密度。【结果】① 正常视网膜节细胞平均密度为 $(2\ 007 \pm 115)/\text{mm}^2$; ② 视神经切断 5、7、14 d 后, 视网膜节细胞平均密度分别下降至: $(1\ 010 \pm 131)/\text{mm}^2$, $(782 \pm 55)/\text{mm}^2$ 和 $(214 \pm 30)/\text{mm}^2$; ③ 给予 DMSO/生理盐水的对照组在上述各时间段视网膜节细胞平均密度与单纯视神经切断组结果相似; ④ 给予 IBM X 的实验组在 5、7、14 d 视网膜节细胞的平均密度分别为 $(1\ 402 \pm 69)/\text{mm}^2$ 、 $(1\ 182 \pm 194)/\text{mm}^2$ 和 $(483 \pm 17)/\text{mm}^2$, 与视神经切断组和 DMSO/生理盐水对照组相比在各时间段上均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。【结论】IBM X 可提高视神经切断后成年金黄地鼠视网膜节细胞的存活, IBM X 可能通过提高胞内的 cAMP 水平而促进视神经切断后视网膜节细胞的存活。

关键词: 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤/药理学; 视网膜神经节细胞/药物作用; 细胞存活/药物作用; IBM X

中图分类号: R329.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2000)02-0096-04

Effects of 3-isobutyl-1-methyl-xanthine Improves Survival of Axotomized Retinal Ganglion Cell in Adult Hamsters

ZHU Yong-hong, LI Hai-biao

(Department of Histology and Embryology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effects of 3-isobutyl-1-methyl-xanthine(IBM X) on survival of axotomized retinal ganglion cell (RGC) by intravitreal injection.【Methods】Fluorescent retrograde tracing method and quantitative anatomical techniques were used to measure the densities of RGCs in all groups of adult hamsters.【Results】① In normal retinas the mean densities of RGCs were $(2\ 007 \pm 115)/\text{mm}^2$. ② At 5, 7, 14 days after axotomy, the mean densities of RGCs decreased to $(1\ 010 \pm 131)/\text{mm}^2$, $(782 \pm 55)/\text{mm}^2$ and $(214 \pm 30)/\text{mm}^2$, respectively. ③ In the control group treated with DMSO/sodium saline, the densities of RGCs at 5, 7 and 14 days after axotomy were similar to those observed in the axotomized group. ④ In the group treated with IBM X, the densities of RGCs at 5, 7 and 14 days after axotomy were $(1\ 402 \pm 69)/\text{mm}^2$, $(1\ 182 \pm 194)/\text{mm}^2$ and $(483 \pm 17)/\text{mm}^2$, which were different from the axotomized group and DMSO/sodium saline controls ($P < 0.05$).【Conclusions】IBM X improves RGCs survival after axotomy in adult hamsters probably through elevating cellular cAMP level.

Key words: 1-methyl-3-isobutyl-1-xanthine/ pharmacology; retinal ganglion cells/ drug effects; cell survival/ drug effects; IBM X

近胞体端切断成年哺乳动物视网膜节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 的轴突, 导致神经元迟

发性死亡和凋亡, 造成神经元迅速大量丢失^[1]。探讨其死亡原因, 寻求促进受损中枢神经元的存活和

收稿日期: 1999-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(39870266)和广东省自然科学基金资助项目(980096)

作者简介: 朱永红(1964-), 女, 安徽芜湖人, 医学硕士, 讲师; 李海标, 导师

再生的途径,是当今神经生物学的重要问题之一。大量的研究表明,神经营养因子,如神经生长因子(NGF)、脑源性神经生长因子(BDNF)、睫状神经营养因子(CNTF)和胶质源性神经营养因子(GDNF)等对某些中枢神经元的存活和再生起重要作用。它们作用于细胞表面受体,通过胞内多种不同的信号传导通路来调控即早基因和延迟反应基因的表达而发挥作用^[2]。IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine)是胞内cAMP降解酶-磷酸二酯酶(PDE)的非特异性抑制剂,可通过抑制cAMP的降解而提高胞内cAMP的水平^[3],后者是细胞内重要的第二信使,对调控细胞的多种功能和增殖有重要作用。体外培养的研究表明,cAMP有抗凋亡和促进神经元存活的作用^[4],神经营养因子可通过cAMP大幅度提高乳鼠视网膜节细胞的存活。目前对cAMP的抗凋亡和促进神经元存活的作用机制仍不清楚,它可能通过胞内信号系统的某些位点而起作用。IBMX是否能提高在体成年哺乳动物受损中枢神经元的存活仍有待研究。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

成年健康雄性金黄地鼠60只,体重80~100g,年龄6~8周,由中山医科大学实验动物中心提供。动物随机分为4组:正常对照组;视神经切断组;视神经切断加IBMX玻璃体内注射组;视神经切断加DMSO/生理盐水对照组;后3组再按视神经切断后动物存活时间分为5、7、14d3个时间组,每组5只动物。

1.2 切断视神经

30g/L戊巴比妥钠腹腔注射(50mg/kg)麻醉动物,经眶上暴露左侧视神经,在距球后1.0mm处切断视神经,小心勿伤及视网膜中央动脉。

1.3 给药方法

IBMX(CALBIOCHEM公司产品)为白色粉末,溶于DMSO/生理盐水,稀释配成所需浓度。用微玻璃管经角巩缘将3 μ L各含0.3、0.6及1.2 μ g的IBMX注入玻璃体内,分别观察其对切断视神经7d后,视网膜节细胞存活数量。其它实验组采用0.6 μ g/眼的IBMX一次注射。对照组不注或注入DMSO/生理盐水。

1.4 RGCs的标记和密度分析

动物麻醉开颅后,用吸引器吸去覆于上丘上方的大脑皮质暴露两侧上丘,用粘有30g/L粒蓝(Granular Blue, GB, 德国Merck公司试剂)的明胶海绵置于上丘表面7d,标记正常视网膜节细胞。而切断视神经后存活视网膜节细胞的标记则于取材前2d暴露视神经近侧残端并剪短至0.5mm,在断端放置粘有30g/L粒蓝的明胶海绵。

粒蓝标记后动物存活2d(经视神经断端标记)或7d(经上丘标记),在麻醉状态下摘出眼球,剥离视网膜于40g/L多聚甲醛(0.1mol/L磷酸缓冲液, pH=7.3)4 $^{\circ}$ C固定1~3h,视网膜平铺片的制备按文献[5]。

用激发光波长为400nm的滤光片在荧光显微镜下观察并计数视网膜平铺片上粒蓝标记的细胞数,方法按文献[6],即以视乳头为中心,在通过视乳头的坐标轴上,分别从视网膜鼻上、鼻下、颞上、颞下等距取点,每个视网膜共取24~32个点,用40倍物镜观察并在0.01mm²目镜网格进行计数。数据处理用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 正常RGCs密度

经上丘标记的各种大、中、小3型(胞体直径分别为:12~21.9~12.6~9 μ m)节细胞散布于整个视网膜。其平均密度为(2007 \pm 115)/mm²,节细胞胞体为圆形或卵圆形,逆行标记的荧光物质主要分布在核周和树突起始部。

2.2 IBMX的剂量选取

当IBMX剂量从0.3 μ g/眼增至0.6 μ g/眼时,切断视神经7d的视网膜节细胞密度增加,IBMX剂量为0.6 μ g/眼时,节细胞密度与对照组相比出现显著性差异($P<0.01$),IBMX剂量为1.2 μ g/眼时节细胞的密度下降,但与0.6 μ g/眼剂量组相比无显著性差异($P>0.05$),故以0.6 μ g/眼为实验剂量(表1)。

2.3 视神经切断后存活视网膜节细胞的密度

近端切断视神经后大量RGCs死亡,其密度明显下降,5、7、14d后RGCs的平均密度见表2,与正常节细胞密度(2007 \pm 115)/mm²相比,其存活率分别为:50%、39%和11%(图1a, 2a, 3a)。

2.4 IBMX对视神经切断后节细胞存活的影响

玻璃体内注射IBMX的动物,视神经切断5、

表1 IBMX 对视神经切断 7 d 后视网膜节细胞密度的影响

Table 1 Effects of different amounts of IBMX on the densities of RGCs after axotomy in 7 days

| IBMX ($\mu\text{g}/\text{eye}$) | Granular blue-labeled RGCs ($\bar{x} \pm s, \text{cell}/\text{mm}^2$) |
|-----------------------------------|---|
| 0.0 | 782 \pm 55 |
| 0.3 | 863 \pm 62 |
| 0.6 | 1 182 \pm 194 ¹⁾ |
| 1.2 | 1 099 \pm 22 ¹⁾ |

1) Compared with control, $P < 0.01$, $n = 5$

7、14 d 后 RGCs 的平均密度见表 2, 与正常视网膜节细胞密度相比, 其存活分别为 70%、59% 和 24% (图 1b, 2b, 3b), 与单纯视神经切断组相比分别增加了 20%、20% 和 13%。DMSO/生理盐水对照组在视神经切断 5、7、14 d 后节细胞的存活率与单纯视神经切断组结果相近(表 2), 经单因素方差分析, IBMX 组与视神经切断组和 DMSO/生理盐水对照组相比在视神经切断后 3 个时间段的 P 值均小于 0.05, 表明它们之间有显著性差异。

表 2 IBMX 对视神经切断后视网膜节细胞密度的影响

Table 2 Effect of IBMX on the densities of RGCs after axotomy ($\bar{x} \pm s, \text{cell}/\text{mm}^2$)

| Group | 5 d | 7 d | 14 d |
|--------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| IMBX | 1 402 \pm 69 ¹⁾ | 1 182 \pm 194 ¹⁾ | 483 \pm 17 ¹⁾ |
| No injection | 1 010 \pm 131 | 782 \pm 55 | 214 \pm 30 |
| DMSO/saline | 1 089 \pm 88 | 813 \pm 90 | 233 \pm 57 |

1) IMBX group compare with normal saline group and no injection group, $P < 0.05$, $n = 5$

3 讨论

3.1 IBMX 对受损视网膜节细胞存活的促进作用

本实验结果, 近端切断金黄地鼠的视神经后, RGCs 短期内大量死亡, 5、7、14 d 后, 节细胞的密度分别下降了 50%、61% 和 89%, IBMX 可分别将其存活提高 20%、20% 和 13%, 我们的前一结果与以往报道一致^[2], 而后一结果则未见有关报道。

近端切断新生或成年哺乳动物的视神经可导致节细胞大量死亡, 包括坏死和凋亡。造成节细胞大量死亡的原因十分复杂, 可能有: ①兴奋性氨基酸的神经毒性作用和胞内钙超载, 自由基和一氧化

氮(NO)的产生^[1, 6]。②靶源性神经营养因子供应的中断: 切断视神经后给予脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养素(NT4/5)、睫状源性神经营养因子(CNTF)可减少因轴突损伤所触发的视网膜节细胞的迟发性死亡和凋亡^[1, 2], 促进损伤后视网膜节细胞的存活。

目前对 IBMX 促进受损的 RGCs 存活的原因还不清楚。IMBX 可抑制细胞内 cAMP 降解, 提高其 cAMP 和 cGMP 的水平。对哺乳动物视网膜的研究表明, cGMP 主要位于视网膜的外部, 而视网膜的内部如内核层、内网层和神经节细胞层其水平很低。cGMP 磷酸二酯酶的分布也同样^[7]。所以对 RGCs 而言 IBMX 主要是提高节细胞内 cAMP 的水平。最近体外培养的研究表明 cAMP 对中枢神经元的存活和突起的生长起重要作用, 它可增强神经营养因子对受损中枢神经元的作用^[4]。有研究表明, 血管活性肠肽(VIP)和 Forskolin 都可提高细胞内的 cAMP 水平, 促进周围和中枢神经元的存活^[4, 8]。Forskolin 可协同 BDNF、NT4/5、CNTF、胰岛素样生长因子(IGF)等神经营养因子大幅度提高培养胚鼠和乳鼠的 RGCs 存活率^[4]。IMBX 提高在体成年哺乳动物受损 RGCs 的存活, 可能与下列因素有关: ①IMBX 可抑制视网膜其他非神经元成分(Muller 胶质细胞)的 cAMP 的降解提高其胞内 cAMP 水平, 后者可促进 Muller 胶质细胞产生某些神经营养因子, 如胶质源性神经营养因子等, 通过旁分泌作用于其周围的 RGCs。②IMBX 可提高 RGCs 的 cAMP 的水平, 后者协同其他神经营养因子增强 RGCs 对神经营养因子的反应性。③IMBX 可提高视网膜节细胞层的无长突细胞 cAMP 的水平, 后者可能通过激活或者协同多种神经营养因子激活的信号转导通路。

3.2 IBMX 促进受损视网膜节细胞存活的作用机制

已有大量的研究表明, 神经营养因子如 NGF、BDNF、CNTF 和 GDNF 等对某些中枢神经元的存活和再生具有重要的作用。它们作用于细胞表面的相应受体, 然后分别通过 ras-有丝分裂原蛋白激酶(ras-MAPK)、PI-3 激酶(PI-3K)、信号转导子和转录激活子(Jak-STAT)以及 Ret 等信号传导通路来调控即早基因和延迟反应基因的表达而起作用。目前对 cAMP 促进神经元存活的作用机制还不清楚, 有的研究表明, 它可通过蛋白激酶 A(PKA)使

某些转录子,如cAMP反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化,来调控某些即早基因(*c-fos*, *c-jun*)的表达^[9]。最近还有人在神经营养因子诱导的肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞系PC12细胞凋亡的研究的基础上,提出cAMP可能通过激活MAPK家族中的细胞外信号调节激酶(ERK)和抑制*c-jun* N末端激酶(JNK)以及p38而可起抗凋亡和促进神经元存活的作用^[10]。

是否IBMX可通过抑制视网膜节细胞的磷酸二酯酶提高胞内cAMP的水平,后者再作用于PKA、ERK、JNK和p38,或者神经营养因子的其他信号传导途径而起抗凋亡和促进受损伤节细胞的存活,仍有待深入探讨。

(本文图1~3见插页1)

参考文献:

- [1] Cui Q, Harvey A R. At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cell following target ablation in neonatal rat [J] . J Neurosci, 1995, 15 (12): 8143.
- [2] Mansour-Robaey S, Clarke D B, Wang Y G, *et al.* Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cell [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 1632.
- [3] Wen H Z, Abraham M C, George A O. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor ROLIPRAM and RO-20-1724 promoted apoptosis in HL60 promyelocytic leukemic cell AC via cyclic AMP-independent mechanism [J] . Life Sci, 1998, 63(4): 265.
- [4] Meyer A F, Kaplan M R, Frank W P, *et al.* Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cell in culture [J] . Neuron, 1995, 15: 805.
- [5] 李雯,李海标. P物质样免疫反应神经元在蟾蜍视网膜的定位和分布 [J] . 中山医科大学学报, 1994, 15 (2): 95.
- [6] Kashii S, Mandai M, Kikuchi M, *et al.* Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in culture retinal neurons [J] . Brain Res, 1996, 711: 73.
- [7] Sosamma J B, Gerald W D, Joyce G C. The distribution of the components of the cyclic GMP cyclic in retina [J] . J Bio Chem, 1980, 255(7): 3128.
- [8] Kaiser P K, Lipton S A. VIP-mediated increase in cAMP prevents terodotoxin-induced retinal ganglion cell death *in vitro* [J] . Neuron, 1990, 5: 373.
- [9] Finkbeiner S, Tavazoie S F, Maloratsky A, *et al.* CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses [J] . Neuron, 1997, 19: 1031.
- [10] Xia Z G, Dickens M, Raingeaud J, *et al.* Opposing effects of ERK and JNK-P38 MAP kinase on apoptosis [J] . Science, 1995, 270: 1326.

(编辑 刘清海)

·新成果·

鼻内窥镜手术在全国的推广

课题负责人 许庚等

(中山医科大学附属第三医院, 广东 广州 510630)

作者在国内首次对内窥镜鼻窦手术、鼻眼相关手术、鼻颅底手术的手术解剖学、镜下形态学、CT诊断学进行系列研究。取得了显著成绩:①慢性鼻窦炎、鼻息肉是鼻科学临床常见病,发病率2%,全国超过2000万病人。该课题从1990年起在国内首次开展功能性内窥镜鼻窦手术,把传统的鼻窦破坏性手术进步为功能性手术,一次手术治愈率达到85%以上。②外伤性视神经管骨折导致失明是眼科常见病,占脑外伤患者3%~4%。在国内首次采用经鼻内窥镜筛蝶窦进路视神经管减压术,手术后复明率超过50%。③脑脊液鼻漏修补术,前中颅底和鞍区占位性病变经鼻内窥镜手术切除,避免开颅手术和鼻面部切口。在国内首次开展经鼻内窥镜垂体瘤切除术,成功率100%;在国内首次开展经鼻内窥镜脑脊液鼻漏修补术,一次手术治愈率100%。在国际首次经鼻内窥镜切除前颅底复发性脑膜瘤、切除侵入颅内的蝶筛囊肿、取除颅内枪弹异物。该项成果于1998年获国家教育部科技进步推广奖一等奖。

(陈丽芳)

IBMX 对成年金黄地鼠视网膜节细胞存活的影响 (正文见第 96 页)

Effect of 3-isobutyl-1-methyl-xanthine Improve
Survival of Axotomized Retinal Ganglion (Text in page 96)

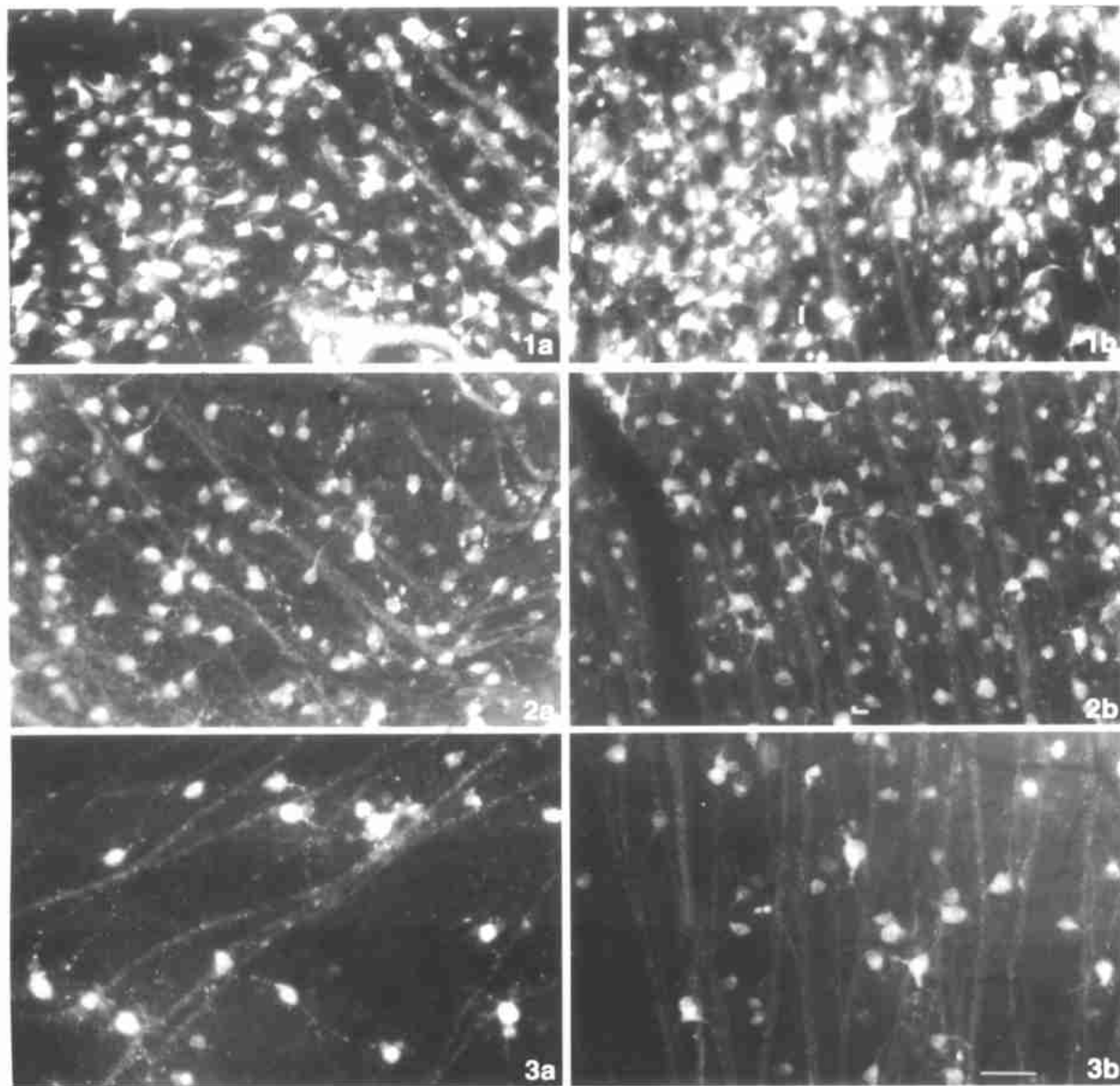


图 1~3 切断轴突后存活的粒蓝标记视网膜神经节细胞

Fig. 1~3 Granuler blue labeled surviving retinal ganglion cells after axotomy

1, 2, 3; 5, 7, 14 days after axotomy respectively; a; normal group; b; IBMX injection group; scale bar= 40 μm