

## · 实验研究 ·

# 内源性大麻素对缺氧缺糖视网膜神经节细胞损伤的保护作用

沈雨濛 林中乔 刘诗亮 田凯琳 陈媛媛 沈吟

430060 武汉大学人民医院眼科中心

通信作者:沈吟, Email: yinshen@whu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.003

**【摘要】** **背景** 急性视网膜缺血缺氧性损伤在眼科较为常见,如青光眼急性发作、视网膜中央动脉阻塞、缺血性视神经病变等,可引起视网膜的缺血缺氧损伤,并可致视网膜神经节细胞(RGCs)的死亡。内源性大麻素(CB)及其受体(CBR)参与中枢神经系统外伤、缺血、炎症及中毒等多种生理病理过程。**目的** 探讨视网膜神经节细胞(RGCs)在缺氧缺糖损伤中内源性CB的作用及意义。**方法** 取6周龄正常C57BL/6J小鼠眼球,制备小鼠视网膜垂直冰冻切片,采用免疫荧光染色法检测和验证CB1R和CB2R在RGCs中的表达。10只C57BL/6J新生鼠浸入75%乙醇消毒后取眼球,在冰上预冷的DMEM培养基中分离视网膜进行RGCs原代培养,采用免疫荧光技术检测培养细胞中RGCs标志物Brn3a的阳性表达并确定培养细胞中CB1R和CB2R的表达。将原代培养14d的RGCs分为正常对照组和氧糖剥夺(OGD)组,分别用完整培养基+体积分数95%空气+体积分数5%CO<sub>2</sub>和无糖培养基+体积分数95%N<sub>2</sub>+4%CO<sub>2</sub>+体积分数1%O<sub>2</sub>条件下培养20h。采用JC-1染色法检测细胞中线粒体结构变化和RGCs的形态变化。各组细胞分别给予1μmol/L CB1R拮抗剂SR141716A、1μmol/L CB2R拮抗剂SR144528以及5μmol/L、10μmol/L CB1R和CB2R激活剂WIN 55212-2,采用MTT法比较各组RGCs存活率。**结果** 正常C57BL/6J小鼠视网膜全层均可见CBR的表达。正常对照组培养的RGCs大小均匀,多呈多角形,细胞间轴突细长并形成网络,细胞中Brn-3a表达阳性;OGD组培养的细胞皱缩或形成碎片,多数细胞轴突消失,Brn-3a表达荧光强度明显减弱。正常对照组RGCs中JC-1染色显示,线粒体的黄色荧光明显强于OGD组,表明OGD组线粒体膜电位明显下降。MTT法检测显示,正常对照组RGCs存活率为(100.00±13.87)%,明显高于OGD组的(89.52±18.16)%,差异均有统计学意义( $q=8.065$ ,  $P=0.008$ );SR141716A和SR144528作用后OGD组细胞存活率分别为(116.63±22.21)%和(112.61±19.02)%均明显高于同组的无药物处理细胞的存活率(89.52±18.16)%,差异均有统计学意义( $q=29.780$ ,  $17.391$ ,均 $P<0.01$ ),而SR141716A和SR144528作用后正常对照组细胞存活率的变化差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。**结论** 细胞缺氧缺糖时上调CB在细胞中的表达和激活CB活性。在缺氧缺糖条件下,抑制细胞中CBR的激活过程对RGCs有保护作用。

**【关键词】** 大麻素/药物;神经保护剂/药物;大麻素受体/代谢;视网膜神经节细胞;糖/代谢;氧/代谢;C57BL/6J小鼠;氧糖剥夺

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81270998、81470628);湖北省卫计委青年人才项目(WJ2015Q014);湖北省杰出青年项目(2014CFA019);武汉市科技局晨光计划项目(2016070204010153)

**Protection of cannabinoid to retinal ganglion cells against oxygen-glucose deprivation damage** Shen Yumeng,

Lin Zhongqiao, Liu Shiliang, Tian Kailin, Chen Yuanyuan, Shen Yin

Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Shen Yin, Email: yinshen@whu.edu.cn

**【Abstract】** **Background** Acute retinal ischemia anoxic injury is common in eye disorders, such as acute glaucoma, central retinal artery occlusion and ischemic optic neuropathy, etc. This will cause retinal ischemia anoxic injury and induce retinal ganglion cells (RGCs) death in addition. Endogenous cannabinoid (CB) and its receptors are involved in the central nervous system injury, ischemia, inflammation, and poisoning and other physiological and pathological process. **Objective** This study was to investigate the effect of CB on RGCs damage induced by

oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** The eyeballs were obtained from 6-week-old normal C57BL/6J mice to prepare retinal frozen sections and the expression and distribution of cannabinoid receptors (CB1R and CB2R) in RGCs was detected by immunofluorescence staining. The eyeballs of ten newborn C57BL/6J mice (postnatal 0–3 days) were obtained after immersed by 75% alcohol and the retinas were isolated in precooled DMEM for the primary culture of RGCs. The cells were identified by detecting the expression of Brn3a, a marker of RGCs, with immunofluorescence staining. Then the cells cultured for 14 days were divided into normal control group (in complete culture medium+95% air+5% CO<sub>2</sub>) and OGD group (in glucose-free medium+95% N<sub>2</sub>+4% CO<sub>2</sub>+1% O<sub>2</sub>) for 20 hours. The mitochondrial damage and RGCs morphology changed were evaluated by JC-1 staining to observe the mitochondrial membrane potential change. SR141716A (CB1R antagonist, 1 μmol/L), SR144528 (CB2R antagonist, 1 μmol/L) and 5 or 10 μmol/L WIN 55212-2 (CB1R and CB2R agonist) were added, and the survival rate of RGCs was assayed MTT. **Results** CBR was positively expressed in various layers of normal mouse retinas. The cells in the normal control group showed uniform size and polygon in shape with the long and thin axons, and the expression of Brn-3a was seen in the cells. However, in the OGD group, cell shrinkage and fragments were found and most of the axons disappeared. The expression of Brn-3a was evidently weakened. The fluorescence intensity of JC-1 was evidently weakened in the OGD group compared with the normal control group, showing the reduce of mitochondrial membrane potential. MTT assay showed that the survival rate of RGCs was (100.00±13.87)%, which was significantly higher than (89.52±18.16)% in the normal control group ( $q=8.065, P=0.008$ ). The mean survival rates of RGCs were (116.63±22.21)% and (112.61±19.02)% in the cells treated by SR141716A and SR144528, and that in the normal cells was (89.52±18.16)% in the OGD group, with significant differences between SR141716A- or SR144528-treated cells and normal cells ( $q=29.780, 17.391$ ; both at  $P<0.01$ ). **Conclusions** Hypoxia and glucose-free up-regulate the expression of CB and activate CB pathway. Inhibition of activation CBR process has a neuroprotection effect under the Hypoxia and glucose-free condition.

[**Key words**] Cannabinoids/pharmacology; Neuroprotective agents/pharmacology; Receptors, cannabinoid/metabolism; Retinal ganglion cells; Glucose/metabolism; Oxygen/metabolism; Mice, inbred, C57BL/6J; Oxygen-glucose deprivation

[**Fund program**]: National Natural Science Foundation of China (81270628); Young Talent Project of Hubei Health and Family Planning Commission (WJ2015Q014); Hubei Province Outstanding Young Project (2014CFA019); Wuhan Youth Science and Technology Plan (2016070204010153)

急性视网膜缺血缺氧性损伤在眼科较为常见,如青光眼急性发作、视网膜中央动脉阻塞、缺血性视神经病变等,可引起视网膜的缺血缺氧损伤,并可致视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的死亡<sup>[1-2]</sup>。由于神经组织具有无法再生的特点,视网膜的神经保护成为目前普遍关注的热点之一。深入探究急性缺血缺氧情况下 RGCs 的病理损伤机制,寻找合理的神经组织保护方法和药物具有重要意义。内源性大麻素(cannabinoid, CB)递质系统在人体内广泛分布,内源性 CB 及其受体参与中枢神经系统外伤、缺血、炎症及中毒等多种生理病理过程<sup>[3]</sup>。本研究观察体外氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型鼠 RGCs 的结构和功能改变,探讨大麻素受体(cannabinoid receptors, CBR)在 RGCs 缺血缺氧糖损伤中的作用及其意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 1~3 日龄清洁级 C57BL/6J 小鼠 60 只,6 周龄小鼠 2 只(武汉大学实验动物中心,动物编号:42000500005941),雌雄不限。动物的饲养和使用遵循 NIH 的《实验动物管理及使用指南》。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 5-氟-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-fluoro-2'-deoxyuridine, 5-FUDR)、WIN 55212-2(美国 Sigma 公司); SR141716A(英国 Tocris 公司); SR144528(美国 Cayman 公司);山羊抗鼠大麻素受体 1(cannabinoid receptor 1, CB1R)多克隆抗体(PAB6876)、山羊抗鼠 CB2R 多克隆抗体(PAB6877)(中国台湾 Abnova 公司);山羊抗鼠 Brn-3a 多克隆抗体(sc-31984,美国 Santa Cruz 公司);FITC 标记驴抗鼠及驴抗羊二抗(GB22301、GB22404);DAPI(G1012)(武汉谷歌生物公司);JC-1 线粒体膜电位试剂盒(美国 Abcam 公司);MTT 粉(上海 Biosharp 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 视网膜冰冻切片免疫荧光染色检测小鼠视网膜中 CBR 的分布** 取 6 周龄正常小鼠的眼球, PBS 漂

洗后沿角巩膜缘后 1 mm 剪除眼前节。将眼杯浸入质量分数 4% 多聚甲醛液中固定 30 min, 经质量分数 10%、20%、30% 蔗糖梯度脱水后用 OCT 包埋胶包埋, 行冰冻垂直切片, 厚度为 12  $\mu\text{m}$ 。体积分数 5% 牛血清白蛋白-Triton100 (BSAT) 室温封闭切片 2 h, 滴加 BSAT 稀释的相应一抗 (1:500), 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜后磷酸盐缓冲液+Triton100 (PBST) 洗 3 次, 每次 10 min; 滴加 BSA 稀释的相应二抗 (1:100), 室温避光孵育 1.5 h。PBST 避光洗 3 次, 每次 10 min。DAPI 染核 30 min, PBST 洗涤后封片。避光晾干, 封片后对距离视盘 400  $\mu\text{m}$  的视网膜组织进行观察, 荧光显微镜采集成像。FITC 标记的 CB1R 及 CB2R 呈绿色荧光, DAPI 标记的细胞核呈蓝色荧光, 检测二者共定位情况。

**1.2.2 RGCs 原代培养** 取 10 只 C57BL/6J 小鼠新生鼠颈椎脱臼法处死后浸入体积分数 75% 乙醇消毒, 摘取眼球, 在冰上预冷的 DMEM 培养基中分离视网膜, 37  $^{\circ}\text{C}$  酶解消化 45 min。终止消化反应, 吹打后收集细胞悬液于 24 孔板。培养 6~7 d 后神经元长出大量突起, 每天每孔加入 25  $\mu\text{l}$  1:10 稀释的 5-FUDR。

**1.2.3 OGD 小鼠模型的建立及分组** 参照文献 [4-5] 的方法建立小鼠 RGCs 的 OGD 模型。原代培养的 RGCs 培养 14 d, 将培养基更换为无糖培养基, 在低氧条件 (体积分数 94%  $\text{N}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  和 1%  $\text{O}_2$ ) 下继续培养 20 h。将培养的细胞分为正常对照组和 OGD 组, 正常对照组细胞用完整培养基、体积分数 95% 空气、5%  $\text{CO}_2$  和 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行培养, OGD 组细胞用无糖培养基、95%  $\text{N}_2$ 、4%  $\text{CO}_2$ 、1%  $\text{O}_2$  和 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养。然后正常对照组和 OGD 组分别分为 CB1R 拮抗剂 SR141716A 组 (1  $\mu\text{mol/L}$  SR141716A+完整培养基/无糖培养基) 或 CB2R 拮抗剂 SR144528 组 (1  $\mu\text{mol/L}$  SR144528+完整培养基/无糖培养基)、CBR 激动剂 5  $\mu\text{mol/L}$  WIN 55212-2 组 (5  $\mu\text{mol/L}$  WIN 55212-2+完整培养基/无糖培养基)、CBR 激动剂 10  $\mu\text{mol/L}$  WIN 55212-2 组 (10  $\mu\text{mol/L}$  WIN 55212-2+完整培养基/无糖培养基)、 $1 \times 10^{-3}$  DMSO 对照组 (完整培养基/无糖培养基稀释 DMSO 至  $1 \times 10^{-3}$ )、 $1 \times 10^{-5}$  DMSO 对照组 (完整培养基/无糖培养基稀释 DMSO 至  $1 \times 10^{-5}$ )、空白对照组 (完整培养基/无糖培养基)。每组设 6 个复孔。每组加入以上相应的试剂处理 30 min 后进行 OGD 干预。

**1.2.4 免疫荧光染色法检测细胞中 Brn-3a 表达** 按照文献 [6] 的方法, 每组各取 3 张细胞爬片, 用预冷的 PBS 浸泡 3 min。以 4% 多聚甲醛冰上固定 20 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。PBST 孵育 5 min, 10% BSA 室温下封闭 20 min。滴加 Brn-3a 一抗 (1:500) 4  $^{\circ}\text{C}$  过

夜。PBST 清洗 5 min, 清洗 5 次。避光滴加 FITC 标记驴抗山羊荧光二抗 (1:100), 室温下孵育 1 h。PBST 避光摇动清洗 3 次, 每次 5 min。滴加 DAPI 染液, 室温下孵育 4 min, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。避光晾干, 封片后于荧光显微镜下观察。

**1.2.5 JC-1 荧光染色法检测细胞线粒体结构** 用 DMSO 配制 1 mmol/L 的 JC-1 母液, 实验前稀释, 终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 13 000 $\times g$  离心 3 min, 过滤去除无法溶解的沉淀。每个同样的实验组设置 3 个复孔, PBS 洗涤培养板上的细胞 1 次, 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 JC-1 混合液, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 10 min。缓冲溶液洗涤培养板 2 次。荧光显微镜下采集成像, 用 JC-1 荧光探针测定 RGCs 内线粒体膜电位, 膜电位高的线粒体呈 JC-1 聚合物的红色荧光, 膜电位低线粒体呈 JC-1 单体的绿色荧光, 二者共标记显示为黄色荧光<sup>[7]</sup>。

**1.2.6 MTT 法检测细胞活性** 无菌 PBS 配制 MTT 工作液, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤备用。每组分别设 12 个复孔, 造模完成后吸除原培养基并除去残余药物, 向每孔加入 100  $\mu\text{l}$  不含 KCl 的培养基及 20  $\mu\text{l}$  的 5 mg/ml MTT 工作液, 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 4 h。小心吸除培养液, 每孔中加入 150  $\mu\text{l}$  DMSO 溶剂, 反应 10 min。用酶标仪在波长 490 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。细胞存活率 = 干预组平均 A 值 / 正常对照组平均 A 值  $\times 100\%$ 。

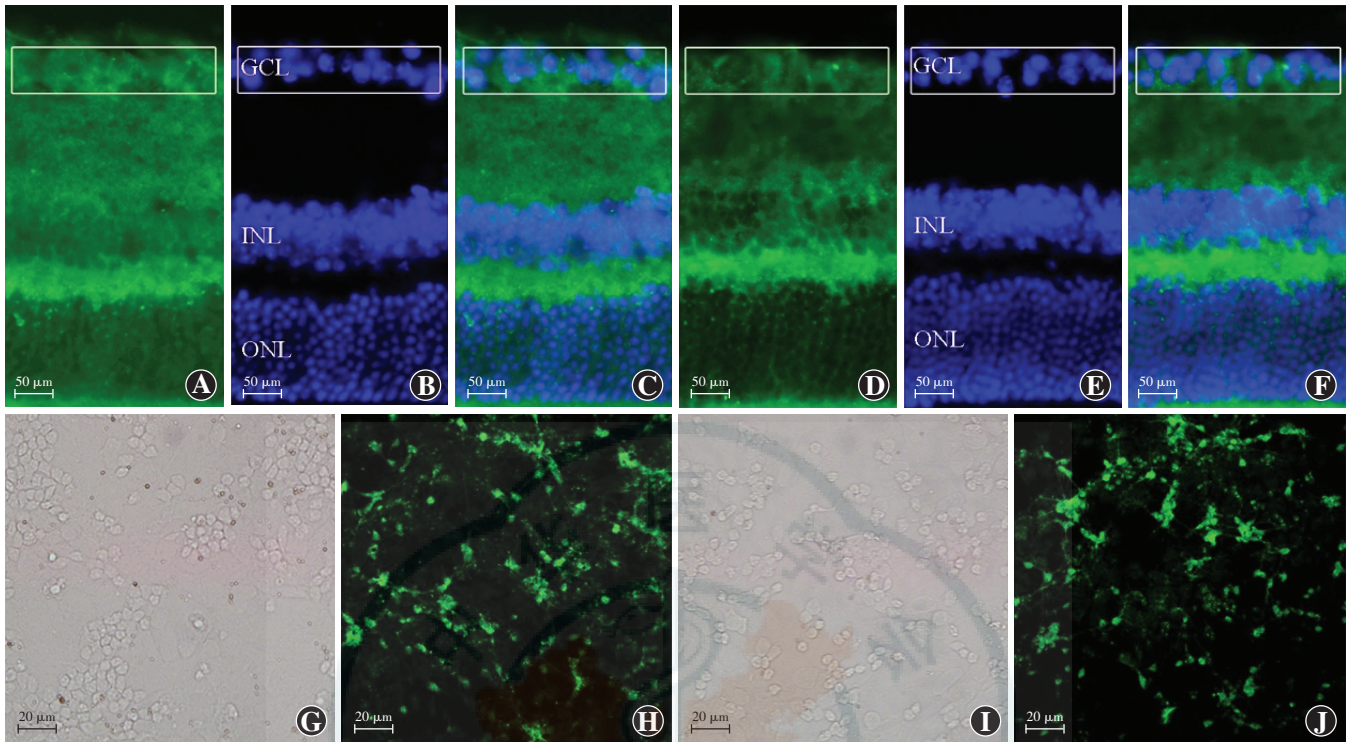
### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件 (SPSS Inc., Chicago, 美国) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间数据资料经 Levene 检验证实方差齐。采用区组设计两因素干预多水平均衡分组实验设计, 正常对照组和 OGD 组用不同药物处理后细胞存活率的总体差异比较采用两因素方差分析, 多重比较 SNK- $q$  检验。采用双尾检验法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CBR 蛋白在 RGCs 的表达及分布

DAPI 染色显示视网膜由外向内分别为外核层 (outer nuclear layer, ONL)、内核层 (inner nuclear layer, INL) 和神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL)。视网膜全层均可见 CB1R、CB2R 的阳性表达, GCL 可见 CB1R、CB2R 与 RGCs 存在明显的共标记。原代培养的 RGCs 细胞爬片行 CB1R、CB2R 免疫荧光染色可见培养细胞呈多边形, 符合 RGCs 的典型形态, 证实正常 RGCs 中可表达 CB1R 和 CB2R (图 1)。



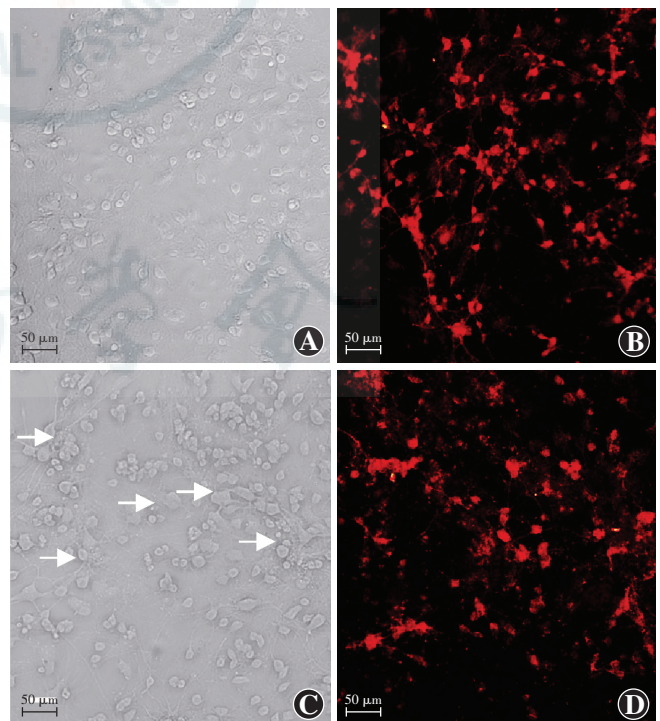
**图 1 CB1R 和 CB2R 在小鼠正常 RGCs 的表达** A: 正常对照组小鼠视网膜垂直冰冻切片荧光染色显示视网膜各层 CB1R 表达呈绿色荧光 (FITC, 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) B: 正常对照组小鼠 INL、ONL 和 GCL 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI, 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) C: A 与 B 的融合图 D: 正常对照组小鼠视网膜垂直冰冻切片荧光染色显示视网膜各层 CB2R 表达呈绿色荧光 (FITC, 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) E: 正常对照组小鼠 INL、ONL 和 GCL 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI, 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) F: C 与 D 的融合图 G: 原代培养的小鼠 RGCs 呈多边形 (标尺 = 20  $\mu\text{m}$ ) H: 正常对照组小鼠视网膜中 CB1R 呈绿色荧光 (FITC, 标尺 = 20  $\mu\text{m}$ ) I: 原代培养的小鼠 RGCs 呈多边形 (标尺 = 20  $\mu\text{m}$ ) J: 培养细胞的 CB2R 表达呈绿色荧光 (FITC, 标尺 = 20  $\mu\text{m}$ ) GCL: 神经节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层

## 2.2 培养细胞的鉴定及 OGD 模型造模情况

细胞铺片培养 24 h 后可见突起由细胞伸出, 培养后 5 ~ 6 d 可见细胞突起相互接触, 铺满培养孔板的底部。加入具有抑制胶质细胞活性的 5-FUDR 后 3 ~ 5 d, 非 RGCs 的细胞数量明显减少。培养 8 d 后, 除培养细胞外的胶质细胞消除, 仅留下培养的细胞。细胞爬片经 Brn-3a 免疫荧光染色可见正常对照组细胞中 Brn-3a 呈红色荧光, Brn-3a 标记的细胞胞体饱满, 呈多边形, 轮廓清晰, 大小较均匀, 荧光显微镜下细胞有立体感, 轴突细长, 互相形成网络。缺氧缺糖培养组细胞培养后 12 h 出现少量皱缩, 细胞变圆。细胞培养后 20 h, OGD 组出现大量皱缩和变圆的细胞以及脱落的细胞碎片。OGD 组细胞爬片的 Brn-3a 免疫荧光染色可见 RGCs 失去典型的形态结构, 胞体形状和细胞突起出现异常 (图 2), 成功建立 OGD 损伤细胞模型。

## 2.3 各组 RGCs 中线粒体结构变化

正常对照组 RGCs 中 JC-1 聚合物的红色荧光明显多于 JC-1 单体的绿色荧光, 而 OGD 组 JC-1 聚合物的红色荧光明显减弱, 可见 JC-1 单体的绿色荧光。正常对照组 RGCs 中黄色荧光明显强于 OGD 组 (图 3)。



**图 2 培养细胞的免疫荧光染色鉴定 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ )** A: 正常对照组培养的 RGCs 大小均匀, 多呈多角形 B: 正常对照组培养的细胞中 Brn-3a 表达阳性, 呈红色荧光, 呈多边形, 轴突细长且互相接触, 形成网络 C: OGD 组出现大量皱缩、变圆的细胞以及脱落的细胞碎片 D: OGD 组多数细胞中 Brn-3a 表达荧光强度明显减弱, 培养的 RGCs 变圆, 多数细胞突起消失

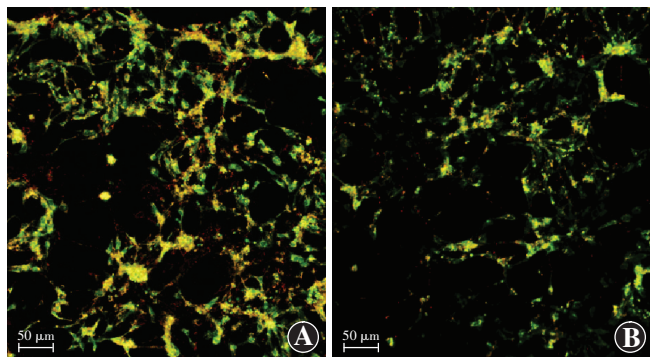


图 3 RGCs 中 JC-1 染色情况 A: 正常对照组细胞中黄色荧光细胞数目较多, 荧光较强 B: OGD 组细胞中黄色荧光细胞数目较正常对照组明显增多, 荧光减弱

### 2.4 CBR 拮抗剂作用后各组 RGCs 活性变化

不同 CBR 抑制药物作用后, 各组细胞存活率的总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{药物}} = 4.876, P = 0.001$ ;  $F_{\text{组别}} = 2.718, P = 0.014$ )。OGD 组细胞存活率明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $q = 8.065, P = 0.008$ ); 正常对照组 CB1R 抑制剂 SR141716A 作用后细胞存活率与  $1 \times 10^{-5}$  DMSO 和  $1 \times 10^{-3}$  DMSO 溶剂作用后比较差异均无统计学意义 ( $q = 1.893, P = 0.581$ ;  $q = 0.624, P = 0.805$ ), OGD 组 SR141716A 作用后细胞存活率明显高于无药物处理细胞, 差异有统计学意义 ( $q = 29.780, P < 0.001$ )。CB2R 抑制剂 SR144528 处理后 OGD 组细胞活性率明显高于无药物处理细胞, 差异有统计学意义 ( $q = 17.391, P = 0.002$ ); OGD 组  $5 \mu\text{mol/L}$  和  $10 \mu\text{mol/L}$  WIN 55212-2 作用后细胞存活率与仅 OGD 处理后细胞存活率的差异均无统计学意义 ( $q = 0.903, P = 0.187$ ;  $q = 0.865, P = 0.436$ ), 但正常对照  $10 \mu\text{mol/L}$  WIN 55212-2 处理后细胞存活率明显下调, 与正常条件下的细胞存活率差异有统计学意义 ( $q = 5.548, P = 0.004$ ) (表 1)。

表 1 CB1R 和 CB2R 抑制剂及激动剂作用后不同培养组细胞存活率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

药物	样本量	不同培养组 RGCs 存活率	
		正常对照组	OGD 组
0		100.00 ± 13.87	89.52 ± 18.16 <sup>a</sup>
$10^{-5}$ DMSO		105.73 ± 16.78	92.44 ± 18.43
$10^{-3}$ DMSO		106.91 ± 12.88	93.61 ± 18.43
$5 \mu\text{mol/L}$ WIN 55212-2		103.88 ± 15.72	98.93 ± 21.94
$10 \mu\text{mol/L}$ WIN 55212-2		97.77 ± 11.71	96.57 ± 20.27
SR141716A		103.37 ± 19.44	116.63 ± 22.21 <sup>b</sup>
SR144528		106.48 ± 16.67	112.61 ± 19.02 <sup>b</sup>

注:  $F_{\text{药物}} = 4.876, P = 0.001$ ;  $F_{\text{组别}} = 2.718, P = 0.014$ 。与各自的正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 OGD 组内无药物处理 (0) 的细胞比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) CB: 大麻素; DMSO: 二甲基亚砷; WIN 55212-2: 大麻素激动剂; SR141716A: CB1R 拮抗剂; SR144528: CB2R 拮抗剂

### 3 讨论

视网膜血供丰富, 缺血缺氧损伤可严重影响视网膜的正常功能。视网膜缺血缺氧性损伤的组织病理变化的主要特点为 RGCs 数目减少和视网膜萎缩变薄, 最终导致视网膜形态和功能的改变<sup>[8]</sup>。本研究通过对视网膜 RGCs 进行原代培养的方法建立体外培养体系, 简化了细胞的生活环境, 明确了生长条件, 便于施加实验因素及容易获得观测结果, 是研究 RGCs 生理功能和病理变化的实验基础。

哺乳动物体内广泛存在着内源性 CB<sup>[9-10]</sup>, 目前被证实的 CBR 包括 CB1R 和 CB2R<sup>[11]</sup>。其中 CB1R 主要分布于中枢神经系统的突触前膜, 激活后可以通过逆行性信号传导参与记忆、认知、运动控制的调节, 而 CB2R 主要分布在外周免疫系统中<sup>[12-14]</sup>。研究显示, 角膜上皮和内皮、小梁网、Schlemm 管、睫状体、睫状体血管和视网膜均有 CBR 的表达<sup>[15]</sup>。人正常视网膜感觉神经层有 CB1R 的分布, 内外丛状层与视网膜的突触部、INL、GCL 及光感受器的外段均有阳性表达; CB2R 在视网膜中也呈广泛分布<sup>[16]</sup>。本研究中用原代培养的 C57BL/6J 小鼠 RGCs 建立 OGD 损伤模型, 并在此基础上研究了 CB1R、CB2R 在视网膜上的生理功能, 发现 CBR 在正常条件下处于静息状态, 但在细胞缺氧缺糖时处于激活状态。本研究中观察到, 在 OGD 条件下, 阻止 CB1R、CB2R 的激活具有神经保护作用。

近年来关于究竟是 CB 激动剂还是拮抗剂能对视网膜发挥抗损伤作用存在争议。一方面, CB 能改善急/慢性脑外伤、脑缺氧、氧化损伤、谷氨酸兴奋毒性病变的预后, 对中枢神经退行性疾病也有神经保护作用<sup>[17]</sup>; 另一方面, 也有研究表明, CB1R 选择性抑制剂 SR141716A 能减轻 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体诱导的新生大鼠脑缺血后的神经兴奋性损伤<sup>[18]</sup>。Zhang 等<sup>[19]</sup>研究证实, 选择性 CB2R 激动剂或 CB1R 拮抗剂在自身免疫性脑脊髓膜炎和脑缺血-再灌注损伤动物模型均显示出保护作用, 也有体外实验结果显示 SR141716A 对光损伤造成的光感受器细胞变性具有保护作用; 高血糖可通过激活 CB1R 导致 RPE 细胞的凋亡, 而 SR141716A 能够挽救  $\text{H}_2\text{O}_2$  造成的 RPE 细胞的氧化损伤<sup>[20-21]</sup>。本研究认为, CB 系统是否参与神经保护或损伤可能与细胞生存微环境的基础状态有关。正常情况氧和糖条件下 CBR 抑制剂对细胞活性无明显抑制作用, 而 OGD 条件下, 即缺氧缺糖抑制剂对细胞活性有逆转作用, 我们认为 CBR 在 OGD 下处于激活状态, 抑制 CBR 的激活

对视网膜细胞具有保护作用。

内源性 CB 是突触功能的重要调节分子,其调节短/长时程的兴奋或抑制性突触可塑性的主要形式为经典的逆行性信号传导<sup>[22]</sup>。最近研究发现,中枢神经系统中依据兴奋性突触传递频率的不同 CB 存在激活与拮抗间开关转换的调制作用<sup>[23]</sup>。此外,内源性 CB 系统(CB 及 CBR)可降低兴奋性红藻氨酸对神经元的损伤,从而对神经元的急性兴奋性损伤提供按需保护<sup>[24]</sup>。CB1R 选择性抑制剂 SR141716A 能减轻新生大鼠脑卒中模型中的神经兴奋性损伤,阻断缺血半影区内 NMDA 受体的表达,显示局部的特异性保护功能,可能与 CBR 耦联通路无关<sup>[25-26]</sup>。

结合已有研究结论和本研究结果,我们推测 CBR 可能介导下述作用:(1)通过 CB1R 抑制兴奋性突触间神经递质的分泌;(2)抑制细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的上升;(3)激活细胞内磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt 激酶、胞外调节激酶、脑源性神经生长因子、核因子- $\kappa$ B 等信号通路<sup>[27-31]</sup>;通过 CB2R 来调节炎症因子的释放等。我们在后续研究中拟探究以上信号通路在 OGD 条件下的激活状态,并研究这些分子在该过程中是否受 CBR 的调控。

随着 CB 对眼部神经保护机制研究的不断深入,CB 对视网膜组织的神经保护作用必定会引起眼科医生的广泛关注,成为相关眼病治疗的新靶点。对内源性 CB 系统的研究能阐明某些疾病的病理机制,还有助于新药的研发,为相关疾病治疗提供新的途径<sup>[32]</sup>,更有利于视网膜缺血缺氧性损伤的临床治疗。

## 参考文献

- [1] Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease [J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(4): 363-365. DOI:10.1136/bjo.86.4.363.
- [2] 邢达勇,王景春,韩云,等.谷氨酸的兴奋毒性与视神经损伤[J].中国实用眼科杂志,2009,27(1):5-7. DOI:10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2009.01.002.
- [3] Sánchez AJ, García-Merino A. Neuroprotective agents: cannabinoids [J]. Clin Immunol, 2012, 142(1): 57-67. DOI:10.1016/j.clim.2011.02.010.
- [4] Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride [J]. Toxicol Lett, 2006, 160(2): 171-177. DOI:10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
- [5] Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, et al. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis [J]. Phytother Res, 2009, 23(10): 1431-1438. DOI:10.1002/ptr.2797.
- [6] Francisco MN, Manuel JL, Paloma SC, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(8): 3860-3868. DOI:10.1167/iovs.08-3267.
- [7] 蔡循,陈国强,陈竺,等.线粒体跨膜电位与细胞凋亡[J].生物化学与生物物理进展,2001,28(1):3-6.  
Cai X, Chen GQ, Chen Z, et al. Mitochondrial transmembrane potential and cell apoptosis [J]. Prog Biochem Biophys, 2001, 28(1): 3-6.
- [8] Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors [J]. Exp Eye Res, 2006, 83(3): 473-83. DOI:10.1016/j.exer.2006.01.016.
- [9] Straiker A, Stella N, Piomelli D, et al. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(25): 14565-14570.
- [10] Cottone E, Pomatto V, Cerri F, et al. Cannabinoid receptors are widely expressed in goldfish: molecular cloning of a CB2-like receptor and evaluation of CB1 and CB2 mRNA expression profiles in different organs [J]. Fish Physiol Biochem, 2013, 39(5): 1287-1296. DOI:10.1007/s10695-013-9783-9.
- [11] López EM, Tagliaferro P, Onaivi ES, et al. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina [J]. Synapse, 2011, 65(5): 388-392. DOI:10.1002/syn.20856.
- [12] 黄婵娟,霍妍,陈琛,等. miR-30b 对大鼠糖氧剥夺性视网膜神经节细胞损伤的保护作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(5): 396-401. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.05.004.  
Huang CJ, Huo Y, Chen C, et al. Protective effect of miR-30b on retinal ganglion cells against oxygen-glucose deprivation *in vitro* [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(5): 396-401. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.05.004.
- [13] Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses [J]. Nature, 2001, 410(6828): 588-592. DOI:10.1038/35069076.
- [14] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids [J]. Nature, 1993, 365(6441): 61-65. DOI:10.1038/365061a0.
- [15] Buckley NE, Hansson S, Harta G, et al. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat [J]. Neuroscience, 1998, 82(4): 1131-1149.
- [16] Hu SS, Arnold A, Hutchens JM, et al. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina [J]. J Comp Neurol, 2010, 518(18): 3848-3866. DOI:10.1002/cne.22429.
- [17] Yazulla S. Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection [J]. Prog Retin Eye Res, 2008, 27(5): 501-526. DOI:10.1016/j.preteyeres.2008.07.002.
- [18] Hansen HH, Azcoitia I, Pons S, et al. Blockade of cannabinoid CB(1) receptor function protects against *in vivo* disseminating brain damage following NMDA-induced excitotoxicity [J]. J Neurochem, 2002, 82(1): 154-158.
- [19] Zhang M, Martin BR, Adler MW, et al. Modulation of cannabinoid receptor activation as a neuroprotective strategy for EAE and stroke [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2009, 4(2): 249-259. DOI:10.1007/s11481-009-9148-4.
- [20] Lim SK, Park MJ, Lim JC, et al. Hyperglycemia induces apoptosis via CB1 activation through the decrease of FAAH 1 in retinal pigment epithelial cells [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(2): 569-577. DOI:10.1002/jcp.22756.
- [21] Wei Y, Wang X, Zhao F, et al. Cannabinoid receptor 1 blockade protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative injury [J]. Mol Vis, 2013, 19: 357-366.

[22] Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function [J]. *Neuron*, 2012, 76 (1) : 70–81. DOI:10.1016/j.neuron.2012.09.020.

[23] Roloff AM, Thayer SA. Modulation of excitatory synaptic transmission by delta 9-tetrahydrocannabinol switches from agonist to antagonist depending on firing rate [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75 (4) : 892–900. DOI:10.1124/mol.108.051482.

[24] Marsicano G, Goodenough S, Monory K, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity [J]. *Science*, 2003, 302 (5642) : 84–88. DOI:10.1126/science.1088208.

[25] Sommer C, Schomacher M, Berger C, et al. Neuroprotective cannabinoid receptor antagonist SR141716A prevents downregulation of excitotoxic NMDA receptors in the ischemic penumbra [J]. *Acta Neuropathol*, 2006, 112 (3) : 277–286. DOI:10.1007/s00401-006-0110-8.

[26] Schwitzer T, Schwan R, Angioi-Duprez K, et al. The endocannabinoid system in the retina: from physiology to practical and therapeutic applications [J/OL]. *Neural Plast*, 2016, 2016 : 2916732 [2015–06–07]. <https://www.hindawi.com/journals/np/2016/2916732/>. DOI: 10.1155/2016/2916732.

[27] Molina-Holgado F, Pinteaux E, Heenan L, et al. Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 28 (1) : 189–194. DOI:10.1016/j.mcn.2004.09.004.

[28] Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain [J]. *J Neurochem*, 2007, 102 (4) : 1105–1114. DOI:10.1111/j.1471-4159.2007.04642.x.

[29] Moranta D, Esteban S, Garcia-Sevilla JA. Acute, chronic and withdrawal effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on the sequential activation of MAPK/Raf-MEK-ERK signaling in the rat cerebral frontal cortex: short-term regulation by intrinsic and extrinsic pathways [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85 (3) : 656–667. DOI:10.1002/jnr.21140.

[30] Khaspekov LG, Brenz Verca MS, Frumkina LE, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19 (7) : 1691–1698. DOI:10.1111/j.1460-9568.2004.03285.x.

[31] Panikashvili D, Mechoulam R, Beni SM, et al. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 25 (4) : 477–484. DOI:10.1038/sj.jcbfm.9600047.

[32] Sarne Y, Asaf F, Fishbein M, et al. The dual neuroprotective-neurotoxic profile of cannabinoid drugs [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 163 : 1391–1401. DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01280.x.

(收稿日期:2015-12-04)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

### 消 息

## 2017 年第二十三届全国眼外伤学术会议暨整合眼外科技技术研讨会 征文通知

为秉承眼外伤学组打造眼外科技交流平台的学术宗旨,促进中国在眼外伤及眼外科技技术领域的国际学术交流,由中华医学会眼科学分会、中华医学会眼科学分会眼外伤学组主办,第四军医大学西京医院承办,天津医科大学总医院、北京大学第三医院、郑州大学第一附属医院、中日友好医院、清华大学附属北京清华长庚医院和首都医科大学附属北京同仁医院等单位协办的“第二十三届全国眼外伤学术会议暨整合眼外科技技术研讨会”将于 2017 年 5 月 18~20 日在陕西省西安市召开。本次会议突出眼外伤救治前沿技术、视网膜外科、角膜、白内障及青光眼手术技术等特点,以名家论坛、国际交流、热点问题辩论、疑难病例分享与点评和手术视频等形式进行交流。

注册参会者授予国家级继续医学教育 I 类学分。

征文要求:(1)尚未公开发表的眼外伤相关疾病的临床与基础研究论文;与眼外科手术相关的玻璃体视网膜、角膜、晶状体、青光眼、视神经、眼附属器研究论文;与眼外伤或眼手术相关的疑难病例或视频。(2)中文或英文摘要(中文摘要字数 500 字以内,英文摘要字数 300 字以内),包括目的、方法、结果、结论和关键词 5 部分;视频时长不超过 5 min,投稿只提交摘要,不上传视频文件。(3)投稿时请注明第一作者的工作单位、邮政编码、Email、接收短信的联系电话。(4)请登录大会网站 <http://cots.coschina.org> 在线投稿。(5)征文截止日期:2017 年 3 月 31 日。

联系人:张静楷(13920363960),张自峰(13468629060)

会议邮箱:ywsxj2017@126.com

中华医学会眼科学分会

中华医学会学术会务部

2016 年 12 月