

溴莫尼定对视网膜神经节细胞氧化应激损伤的保护作用

王璐 林斌武 王燕 庞龙

510120 广州,广东省中医院眼科

通信作者:庞龙,Email:longpangxtq@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.01.003

【摘要】 目的 探讨溴莫尼定对视网膜神经节细胞(RGCs)氧化应激损伤的保护作用。方法 小鼠 RGC-5 细胞株在含低糖(1 g/L)、体积分数 10% 胎牛血清和 100 U/ml(商品单位)青链霉素混悬液的 DMEM 培养液中进行培养,将传代的 RGC-5 细胞分为正常对照组、H₂O₂处理组和溴莫尼定+H₂O₂处理组。H₂O₂处理组在细胞培养液中加入 800 μmol/L H₂O₂,溴莫尼定+H₂O₂处理组在细胞培养液中加入 1 μmol/L 溴莫尼定处理 2 h,然后加入 800 μmol/L H₂O₂,各组细胞继续培养 24 h。采用 Hoechst 荧光染色法观察各组细胞的细胞核形态和数量变化;采用 Western blot 法测定各组细胞中凋亡相关蛋白 bcl-2 和 bax 蛋白相对表达量变化;采用荧光标记 JC-1 试剂盒检测细胞线粒体膜电位改变。结果 正常对照组细胞核呈圆形或椭圆形,细胞核大小均匀;H₂O₂处理组可见细胞核固缩和碎裂,细胞核数量减少;溴莫尼定+H₂O₂处理组出现核固缩和碎裂的细胞核明显少于 H₂O₂处理组。正常对照组、H₂O₂处理组和溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞中 bcl 相对表达量分别为 0.76±0.15、0.50±0.13 和 0.75±0.17,H₂O₂处理组细胞中 bcl-2 相对表达量明显低于正常对照组和溴莫尼定+H₂O₂处理组,差异均有统计学意义(均 P<0.05)。正常对照组、H₂O₂处理组和溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞中 bax 相对表达量分别为 0.65±0.13、0.83±0.07 和 0.70±0.10,H₂O₂处理组细胞中 bax 相对表达量均明显高于正常对照组和溴莫尼定+H₂O₂处理组,差异均有统计学意义(均 P<0.05)。正常对照组 RGC-5 线粒体膜可见较强的橙色荧光,与细胞膜绿色荧光共表达;H₂O₂处理组细胞中橙色荧光减弱且表达 JC-1 的细胞数量减少;溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞线粒体膜橙色荧光较 H₂O₂处理组增强,JC-1 阳性细胞数量明显增多。结论 溴莫尼定预处理能够预防氧化应激导致的 RGCs 线粒体膜损伤,从而发挥视神经保护作用。

【关键词】 神经保护剂/药理作用;细胞缺氧/药物诱导;氧化应激;视网膜神经节细胞;凋亡;线粒体/病理损伤;溴莫尼定;细胞株

基金项目: 国家自然科学基金项目(81503618)

Neuroprotective effects of brimonidine on retinal ganglion cells induced by oxidative stress mitochondrial dysfunction

Wang Lu, Lin Binwu, Wang Yan, Pang Long

Department of Ophthalmology, Traditional Chinese Medical Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: Pang Long, Email: longpangxtq@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore whether brimonidine has a protective effect on retinal ganglion cells (RGCs) through improving mitochondrial function under the oxidative stress. **Methods** Mouse RGC-5 cells were cultured in DMEM medium containing low concentration of glucose (1 g/L), 10% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin-streptomycin solution. The cells were divided into normal control group, H₂O₂-treated group and brimonidine+H₂O₂ group. H₂O₂ at the concentration of 800 μmol/L was added into the medium in the H₂O₂-treated group, and 1 μmol/L brimonidine was added into the medium for 2 hours prior to the addition of H₂O₂ in the brimonidine+H₂O₂ group. The cells were sequentially cultured for 24 hours. The morphology of the cell nucleus was examined by Hoechst fluorescence staining. The expressions of apoptosis-related protein in the cells were detected by Western blot assay. Mitochondrial membrane potential was assessed by JC-1 staining. **Results** The cell nuclei showed round or oval in shape with consistent size in the normal control group. The pycnosis and karyorrhexis of the cell nuclei were seen in the H₂O₂-treated group, and less abnormal nuclei were found in the brimonidine+H₂O₂ group. The relative expression level of bcl-2 protein in the cells was 0.76±0.15, 0.50±0.13 and 0.75±0.17 in the normal control group, H₂O₂-treated group and brimonidine + H₂O₂ group, respectively, and the expression of bcl-2 protein in the H₂O₂-treated group was significantly lower than that in the normal control group and brimonidine+H₂O₂ group (both at P<0.05). The relative expression level of bax protein in the cells was 0.65±0.13, 0.83±0.07 and 0.70±0.10 in the normal control group, H₂O₂-treated group and brimonidine+H₂O₂ group, respectively, and the expression of bax protein in the H₂O₂-treated group was significantly higher than that in the normal control group and brimonidine+H₂O₂ group (both at P<0.05). A strong orange fluorescence was seen in the mitochondrial membrane of RGC-5 in the normal control group with a co-

expression with the green fluorescence of cell membrane. In the H_2O_2 -treated group, the orange fluorescence intensity in the cells was evidently weakened, and the number of JC-1 responded cells was considerably increased and the orange fluorescence intensity was enhanced in the brimonidine + H_2O_2 group. **Conclusions** Brimonidine can prevent RGCs from oxidative-stress damage by improving the mitochondrial function and therefore play a potential neuroprotective effect on optic nerve.

[Key words] Neuroprotective agents/pharmacology; Cell hypoxia/drug effects; Oxidative stress; Retinal ganglion cells; Apoptosis; Mitochondria/pathology; Brimonidine; Cell line

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81503618)

氧化应激诱导的视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 凋亡是青光眼、糖尿病视网膜病变、视神经炎等多种疾病的共同病理过程。正常代谢过程中, RGCs 产生和清除活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的能力维持着动态平衡, 但在低血流或高眼压等病理状态下, RGCs 清除 ROS 的能力下降, 极易造成氧化应激损伤, 导致细胞死亡。线粒体是氧化应激反应的主要场所, 在高眼压及其他病理状态下易受到氧化应激反应的损伤而加速细胞凋亡^[1-2]。研究证实, 降眼压新药溴莫尼定是一种高度选择性 α_2 肾上腺素能受体激动剂, 具有潜在的神经保护作用^[3-4], 然而, 其具体作用机制尚不十分清楚。本研究拟观察溴莫尼定对线粒体及 RGCs 氧化应激损伤的保护作用, 为青光眼患者视神经保护相关研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠 RGCs 株 RGC-5 (美国 Gibco 公司)。DMEM 培养液、胎牛血清、青链霉素混悬液 (美国 Gibco 公司); 羊抗小鼠 bcl 单克隆抗体 (ab37899, 1:500)、兔抗小鼠 bax 单克隆抗体 (ab32503, 1:500) (美国 Abcam 公司); 兔抗小鼠 β -actin 单克隆抗体 (BM0627, 1:100)、辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗 (BA1050, 1:500)、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (BA1054, 1:500) (武汉博士德生物公司); 荧光标记 JC-1 试剂盒 (KGA604) (南京凯基生物技术公司); RIPA 裂解液 (上海申能博彩公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RGC-5 置于含低糖 (1 g/L)、体积分数 10% 胎牛血清和 100 U/ml (商品单位) 青链霉素混悬液的 DMEM 培养液中, 在 37 °C、体积分数 5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 每 2 ~ 3 d 用质量分数 0.05% 胰蛋白酶消化传代 1 次。培养液中添加胰蛋白酶和 EDTA 混合液少量, 置于 37 °C 孵育箱中消化 2 ~ 5 min, 倒置相差显微镜下进行观察, 待细胞质发生回缩且细胞间隙增大时吸出消化液, 加入少量含血清培养液, 终止消化。用吸管吸取培养液, 反复轻轻吹打瓶

壁细胞形成细胞悬液。将细胞接种于新的培养瓶中, 置于 CO_2 培养箱中继续培养。

1.2.2 细胞分组 待传代 RGC-5 细胞贴壁培养 12 h, 待细胞达到 70% ~ 80% 融合后将细胞分为正常对照组、 H_2O_2 处理组和溴莫尼定 + H_2O_2 处理组。正常对照组细胞进行常规培养, H_2O_2 处理组细胞培养液中加入 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 溴莫尼定 + H_2O_2 处理组在细胞培养液加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 溴莫尼定溶液, 并于作用后 2 h 再添加 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 使其终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.3 免疫荧光染色法观察细胞核形态变化 各组细胞培养后 24 h 待 85% ~ 95% 细胞贴壁时从培养箱中取出, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 用质量分数 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; Triton 透化膜 20 min, 添加体积分数 5% 山羊血清封闭 1 h, 加入 Hoechst 试剂染核 7 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 加入体积分数 50% 甘油以封片, 免疫荧光显微镜下任意选取 5 个视野, 观察细胞核数量和形态学变化。

1.2.4 Western blot 法检测细胞中 bcl-2 和 bax 蛋白的表达 将细胞置于含单去污剂裂解液 RIPA 的离心管中, 匀浆, 冰上放置 30 min, 离心半径 = 13.5 cm, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 以含 20 ~ 30 μg 蛋白的溶液体积作为上样量。加入相应体积的 SDS 加样缓冲液, 加热 10 min 使蛋白变性, 室温下冷却, 常规电泳, 转膜, 封闭。滴加相应一抗, 4 °C 摇床上孵育过夜, 滴加相应二抗, 常温下孵育 1 h, 显影液显影, 根据目的蛋白信号的强弱选择曝光时间, 然后用洗片机洗片, 采用 Image J 软件测定反应条带灰度值, 计算细胞中目的蛋白的相对表达量。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值 / β -actin 蛋白灰度值 $\times 100\%$ 。

1.2.5 JC-1 荧光标记法评估线粒体膜电位 按照荧光标记 JC-1 试剂盒说明, 细胞经 H_2O_2 及溴莫尼定处理后用 PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min; 加入 1 ml 1 倍缓冲液和 2 μl JC-1 溶液, 使其体积分数为 50%, 混匀, 避光置于 37 °C 培养箱中孵育 15 ~ 20 min, PBS 洗涤细胞 2 次, 每次 5 min; 再次加入 1 ml 1 倍缓冲液, 荧光显微镜下观察细胞荧光染色情况。JC-1 在线粒体内膜聚集形成 J-聚合物, 发出橙色荧光, 细胞膜为绿色荧光。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预三水平研究设计,正常对照组、H₂O₂处理组和溴莫尼定+H₂O₂处理组 RGC-5 细胞中 bcl-2 和 bax 蛋白相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞形态学及数量变化

正常对照组细胞核呈圆形或椭圆形,偶见破裂的细胞核,细胞核大小及分布均匀,数量较多;H₂O₂处理组较正常对照组细胞核数量减少,细胞核大小不均,异常形态的细胞核数量增加;溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞核数量减少,但细胞核大小较均匀(图 1)。

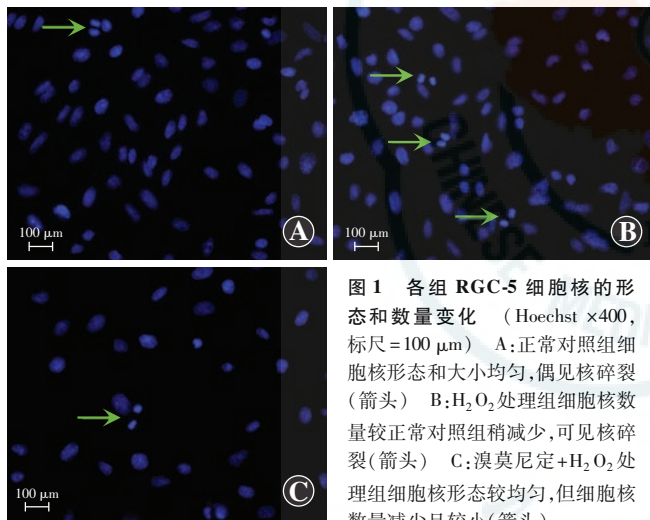


图 1 各组 RGC-5 细胞核的形态和数量变化 (Hoechst ×400, 标尺 = 100 μm) A: 正常对照组细胞核形态和大小均匀,偶见核碎裂(箭头) B: H₂O₂处理组细胞核数量较正常对照组稍减少,可见核碎裂(箭头) C: 溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞核形态较均匀,但细胞核数量减少且较小(箭头)

2.2 各组细胞中 bcl-2 和 bax 蛋白相对表达量变化

正常对照组细胞中 bcl 表达条带较强, bax 蛋白表达强度较弱, H₂O₂处理组 bcl 表达条带减弱, bax 蛋白表达条带增强, 溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞中 bcl 表达条带强于 H₂O₂组, bax 蛋白表达强度弱于 H₂O₂处理组(图 2A)。正常对照组、H₂O₂处理组和溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞中 bcl 相对表达量分别为 0.76 ± 0.15 、 0.50 ± 0.13 和 0.75 ± 0.17 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 5.448, P = 0.021$), 其中 H₂O₂处理组细胞中 bcl-2 相对表达量明显低于正常对照组和溴莫尼定+H₂O₂处理组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。正常对照组、H₂O₂处理组和溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞中 bax 相对表达量分别为 0.65 ± 0.13 、 0.83 ± 0.07 和 0.70 ± 0.10 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 4.200,$

$P = 0.041$), 其中 H₂O₂处理组细胞中 bax 相对表达量均明显高于正常对照组和溴莫尼定+H₂O₂处理组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2B)。

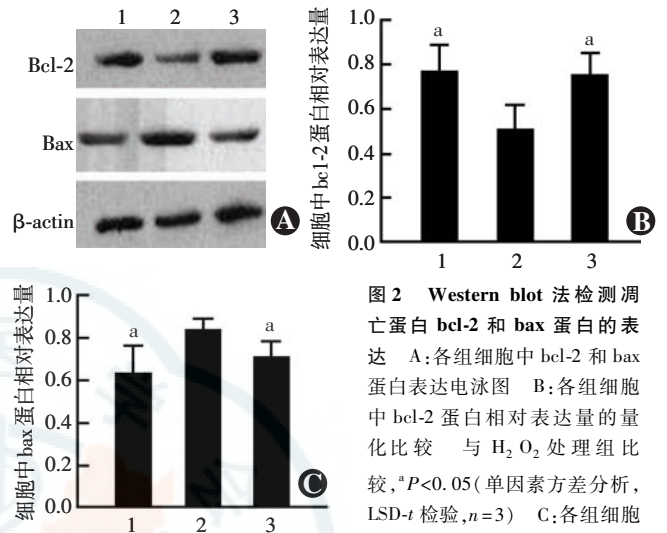


图 2 Western blot 法检测凋亡蛋白 bcl-2 和 bax 蛋白的表达 A: 各组细胞中 bcl-2 和 bax 蛋白表达电泳图 B: 各组细胞中 bcl-2 蛋白相对表达量的量化比较 与 H₂O₂处理组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) C: 各组细胞中 bax 蛋白相对表达量的量化比较 与 H₂O₂处理组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1: 正常对照组 2: H₂O₂处理组 3: 溴莫尼定+H₂O₂处理组

2.3 各组 RGC-5 细胞线粒体膜电位变化

正常对照组 RGC-5 细胞维持较高的正常线粒体膜电位, 表现为橙色强荧光, 并与细胞膜的绿色荧光共表达(图 3A); H₂O₂处理组 RGC-5 细胞线粒体膜呈橙色荧光的细胞数量减少, 单个细胞的线粒体膜上橙色荧光减弱(图 3B); 溴莫尼定+H₂O₂处理组线粒体膜呈橙色荧光的细胞数量较 H₂O₂处理组明显增加, 单个细胞的线粒体膜上橙色荧光较 H₂O₂处理组增强(图 3C)。

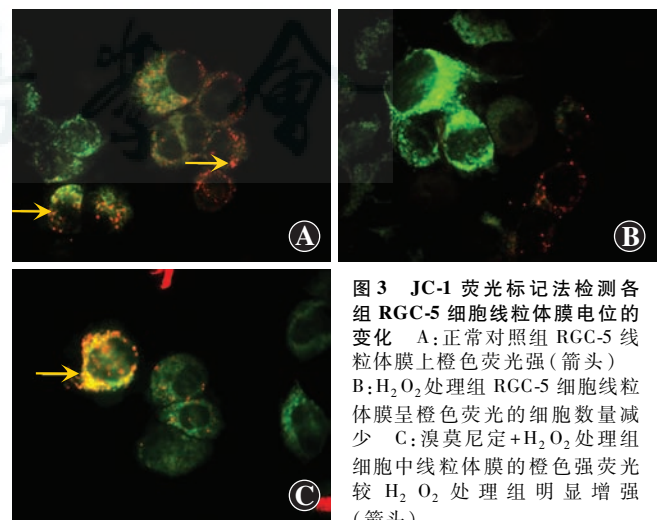


图 3 JC-1 荧光标记法检测各组 RGC-5 细胞线粒体膜电位的变化 A: 正常对照组 RGC-5 线粒体膜上橙色荧光强(箭头) B: H₂O₂处理组 RGC-5 细胞线粒体膜呈橙色荧光的细胞数量减少 C: 溴莫尼定+H₂O₂处理组细胞中线粒体膜的橙色强荧光较 H₂O₂处理组明显增强(箭头)

3 讨论

视神经损伤是多种眼部疾病的共同结局, 如青光

眼、糖尿病视网膜病变及年龄相关性黄斑变性等^[5-7], 有效地延缓或阻止神经元凋亡将为相关疾病的视神经损伤提供更好的保护作用。

线粒体是主要的细胞代谢场所, 过度的氧化应激作用可使线粒体损伤, 导致细胞死亡, 进而引起相关疾病视神经损伤, 因此近年来基于线粒体的神经保护研究逐渐受到关注。线粒体在氧化应激过程中起重要作用, 是细胞内产生 ROS 的主要来源及 ROS 攻击的主要目标。ROS 可干扰 DNA 和 RNA 复制、氧化线粒体蛋白质和呼吸链酶复合物, 使蛋白质丧失正常的催化和降解功能, 过量的 ROS 也可诱导线粒体膜通透性转换孔开放, 引起线粒体通透性改变和膜电位下降^[8-9]。视神经是机体能量需求及耗氧率较高的组织之一, 其信号传导需要大量能量, 线粒体功能异常可引起 ATP 消耗及供氧量减少, 从而引起神经细胞损伤及凋亡。

溴莫尼定广泛用于青光眼的治疗, 近年来发现其在治疗神经损伤方面也具有一定的效果。研究表明, 小鼠视神经挫伤造模前或造模后于小鼠玻璃体腔注射溴莫尼定均能减少 RGCs 丢失并减缓继发性 RGCs 死亡^[10]。Lindsey 等^[4]的研究也显示, 视神经挫伤模型小鼠全身应用小剂量溴莫尼定后可减少 RGCs 树突的丢失, 提示溴莫尼定具有明显的视神经保护作用。既往研究还发现, 局部应用质量分数 0.20% 或 0.15% 的溴莫尼定每天 2~3 次能够激活人 α_2 肾上腺素受体, 后者可通过 L 型 Ca^{2+} 通道降低血浆 Ca^{2+} 质量浓度, 抑制凋亡相关蛋白的活化, 减少细胞的凋亡^[11]。本研究结果显示, 在相同氧化应激条件下, 经溴莫尼定预处理 RGCs 细胞核形态完整, 细胞中促凋亡蛋白的表达量下调而促凋亡蛋白表达量上调, 细胞线粒体膜电位明显高于 H_2O_2 处理的氧化应激模型细胞, 提示氧化应激对 RGCs 线粒体有损伤作用, 而溴莫尼定在一定程度上能够拮抗这种损伤作用, 这为临床上对青光眼视神经保护作用的研究提供了新的思路。此外, 作为近

年来研究热点, 线粒体功能和形态保护的概念也为溴莫尼定的临床应用提供了实验依据。

参考文献

- [1] Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25 (5): 490-513. DOI:10.1016/j.preteyeres.2006.07.003.
- [2] Qi X, Lewin AS, Sun L, et al. Suppression of mitochondrial oxidative stress provides long-term neuroprotection in experimental optic neuritis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48 (2): 681-691. DOI:10.1167/iovs.06-0553.
- [3] Lee KY, Nakayama M, Aihara M, et al. Brimonidine is neuroprotective against glutamate-induced neurotoxicity, oxidative stress, and hypoxia in purified rat retinal ganglion cells [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 246-251.
- [4] Lindsey JD, Duong-Polk KX, Hammond D, et al. Differential protection of injured retinal ganglion cell dendrites by brimonidine [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56 (3): 1789-1804. DOI:10.1167/iovs.14-13892.
- [5] Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, et al. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31 (2): 152-181. DOI:10.1016/j.preteyeres.2011.11.002.
- [6] Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27 (2): 283-290. DOI:10.1016/S0278-5846(03)00023-X.
- [7] Lee EK, Yu HG. Ganglion cell-inner plexiform layer and peripapillary retinal nerve fiber layer thicknesses in age-related macular degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56 (6): 3976-3983. DOI:10.1167/iovs.15-17013.
- [8] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Nature*, 2006, 443 (7113): 787-795. DOI:10.1038/nature05292.
- [9] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39 (1): 44-84. DOI:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- [10] Guo X, Namekata K, Kimura A, et al. Brimonidine suppresses loss of retinal neurons and visual function in a murine model of optic neuritis [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 592: 27-31. DOI:10.1016/j.neulet.2015.02.059.
- [11] Gross RL, Hensley SH, Gao F, et al. Effects of betaxolol on light responses and membrane conductance in retinal ganglion cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41 (3): 722-728.

(收稿日期:2016-03-09 修回日期:2017-11-20)

(本文编辑:张荻)

读者·作者·编者

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省眼科研究所 河南省立眼科医院承办的眼科专业学术期刊, 月刊, 每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果, 主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等, 学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章, 欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

(本刊编辑部)