

· 实验研究 ·

腺苷受体拮抗剂对加压培养的视网膜 Müller 细胞钾离子通道的调控作用

杨子建 程瑜 姚慧萍 沈婷 陈雁伟 钟一声

201800 上海交通大学医学院附属瑞金医院北院眼科

通信作者:杨子建, Email: dyangzj@163. com

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 08. 003

【摘要】 目的 阐明腺苷受体拮抗剂 SCH442416 对体外加压的视网膜 Müller 细胞的钾离子通道的调控作用。**方法** 出生后 5 d 的 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 将大鼠的视网膜 Müller 细胞分离和培养, 分为正常对照组 (正常培养)、加压培养组 [40 mmHg/24 h 加压培养 (1 mmHg = 0. 133 kPa)] 和腺苷 + SCH442416 干预组 (40 mmHg/24 h 加压培养后加入 10 μ mol/L 腺苷 + 100 nmol/L SCH442416 培养)。对大鼠视网膜 Müller 细胞体外加压 40 mmHg/24 h 培养, 采用 real-time PCR、Western blot 等方法研究离体加压培养的视网膜 Müller 细胞的钾离子通道 Kir2. 1、Kir4. 1 和 TASK-1 的表达变化情况。体外加压培养的视网膜 Müller 细胞给予腺苷 + 腺苷 A_{2A} 受体拮抗剂 SCH442416 进行干预 (药物终浓度为腺苷 10 μ mol/L + SCH442416 100 nmol/L), 检测视网膜及 Müller 细胞 Kir2. 1、Kir4. 1 和 TASK-1 的 mRNA 和蛋白的表达变化。**结果** 40 mmHg/24 h 加压培养可致视网膜 Müller 细胞钾离子通道 Kir2. 1、Kir4. 1 和 TASK-1 的蛋白表达下调, 与正常对照组相比分别下降了 14. 7%、38. 6% 和 52. 6%, 2 个组 Kir2. 1 蛋白的表达差异无统计学意义 ($P=0. 082$), Kir4. 1 和 TASK-1 蛋白的表达差异均有统计学意义 ($P=0. 000$, $0. 000$); 腺苷 + SCH442416 干预组视网膜 Müller 细胞 Kir2. 1、Kir4. 1 和 TASK-1 的蛋白表达较加压培养组上调, 分别上升了 8. 8%、60. 7% 和 61. 4%, 2 个组 Kir2. 1 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P=0. 354$), 2 个组 Kir4. 1 和 TASK-1 的蛋白表达比较, 差异均有统计学意义 ($P=0. 000$, $0. 000$)。40 mmHg/24 h 加压培养可致视网膜 Müller 细胞 Kir2. 1、Kir4. 1 和 TASK-1 mRNA 表达较正常对照组下调, 差异均有统计学意义 ($P=0. 047$, $0. 001$, $0. 000$); 与加压培养组相比, 腺苷 + SCH442416 干预组 Kir4. 1 和 TASK-1 的表达均上调, 差异均有统计学意义 ($P=0. 038$, $0. 030$), 而 Kir2. 1 的表达无明显变化, 差异无统计学意义 ($P=0. 612$)。**结论** SCH442416 对视网膜 Müller 细胞 Kir4. 1 和 TASK-1 的蛋白和 mRNA 表达具有调控作用。

【关键词】 视网膜; Müller 细胞; SCH442416; Kir2. 1; Kir4. 1; TASK-1

Changes of Kir4. 1 and TASK-1 expression in rat Müller cell induced by SCH442416 at an elevated hydrostatic pressure in vitro Yang Zijian, Cheng Yu, Yao Huiping, Shen Ting, Chen Yanwei, Zhong Yisheng
Department of Ophthalmology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201800, China
Corresponding author: Yang Zijian, Email: dyangzj@163. com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of adenosine receptor antagonist SCH442416 on the expression of Kir2. 1, Kir4. 1 and TASK-1 in rat Müller cell at an elevated hydrostatic pressure *in vitro*. **Methods** Thirty SPF Sprague Dawley rats were purchased from Shanghai Slack Laboratory Animals Ltd. Cultured Müller cells were divided into normal control group ($n=6$), 40 mmHg/24 hours (1 mmHg = 0. 133 kPa) group ($n=6$) and adenosine + SCH442416 intervention group ($n=6$). Müller cells were treated with 40 mmHg pressure for 24 hours in 40 mmHg/24 hours group, and Müller cells were treated with 40 mmHg pressure for 24 hours + 10 μ mol/L adenosine + 100 nmol/L SCH442416 in adenosine + SCH442416 intervention group. The real-time PCR, Western blot, whole-cell patch-clamp recordings and immunohistochemistry were used to detect Kir2. 1, Kir4. 1 and TASK-1 expression and Müller cells Kir currents. The experimental procedures were in accordance with the National Institutes of Health (NIH) guidelines for the Care and Use of Laboratory, and follow the 3R principle. **Results** Western blot assay showed that, following 40 mmHg pressure cultured for 24 hours, the expression of Kir4. 1 and TASK-1 protein in Müller cell were significantly decreased by 38. 6% and 52. 6% compared with the normal control group, with significant differences between the two groups (both at $P=0. 000$); Kir2. 1 protein expression decreased by 14. 7%, with insignificant difference between the two groups ($P=0. 082$). Kir4. 1 and TASK protein expression in adenosine + SCH442416 intervention group was increased by 60. 7% and 61. 4% compared with the 40 mmHg/24 hours group, with significant differences between the two groups (both at $P=0. 000$); Kir2. 1 protein expression in adenosine + SCH442416 intervention group was increased by 8. 8% compared with the 40 mmHg/24 hours group, with insignificant difference between them ($P=0. 354$). Real-time PCR assay showed that, following 40 mmHg pressure cultured for 24 hours,

Kir2.1, Kir4.1 and TASK-1 mRNA expression in Müller cells were significantly decreased compared with the normal control group, with significant differences between the two groups ($P = 0.047, 0.001, 0.000$); Kir4.1 and TASK-1 mRNA expression in Müller cells in the adenosine + SCH442416 intervention group was significantly increased compared with the 40 mmHg/24 hours group, with significant differences between the two groups ($P = 0.038, 0.030$); however, there is no significant change in Kir2.1 mRNA expression ($P = 0.612$). **Conclusions** SCH442416 upregulates the expression of Kir4.1 and TASK-1 mRNA and protein, but weakly affects the expression of Kir2.1.

[Key words] Retina; Müller cell; SCH442416; Kir2.1; Kir4.1; TASK-1

青光眼视神经损害的确切机制尚未完全阐明,目前认为眼压升高所致视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)轴浆流受阻和机械压迫等因素导致的 RGCs 凋亡是其主要病理改变。既往青光眼视神经保护的研究主要集中在神经营养因子、一氧化氮合成代谢和自由基清除等方面,而关于青光眼视网膜微环境的研究,特别是离子及离子通道的研究很少。近年来,视网膜中 Müller 细胞等神经胶质细胞的结构和功能及其在生理及病理状态下对视网膜微环境的调控作用越来越受到重视。腺苷是中枢神经系统中一种重要的神经调质, Müller 细胞通过钙离子依赖的方式分泌腺苷^[1]。生理状态下细胞内外的腺苷浓度常低于 $1 \mu\text{mol/L}$, 应激情况下腺苷浓度大幅度上升,如炎症、缺血、缺氧、创伤、疼痛等。腺苷的广泛生物学效应主要由腺苷受体(adenosine receptor, AR)介导,目前已知的 AR 有 A_1 、 A_{2A} 、 A_{2B} 和 A_3 亚型,均属于 G-蛋白偶联受体,可与相应的 G 蛋白结合,进而调节腺苷酸环化酶、离子通道和磷脂酶活性。有关心血管疾病和肾脏疾病的研究发现,腺苷对心肌细胞和肾基底膜细胞的钾离子通道具有调节作用,同时 AR 激动剂和拮抗剂用于中枢神经系统神经退行性病变,如帕金森病和阿尔茨海默病等的治疗也显示出良好的疗效^[2-3]。本研究的目的在于阐明腺苷受体拮抗剂 SCH442416 对高眼压状态下视网膜 Müller 细胞钾离子通道的调控作用,为青光眼视神经保护研究提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生后 5 d 未睁眼的 SPF 级 SD 大鼠 30 只[SCXK(沪)-2008-0016, 上海斯莱克动物有限公司提供],雌雄不限。将大鼠的视网膜 Müller 细胞进行分离和培养,并分为正常对照组(正常培养)、加压培养组[40 mmHg/24 h 加压培养($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)]和腺苷+SCH442416 干预组(40 mmHg/24 h 加压培养后加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 腺苷+ 100 nmol/L SCH442416 培养)。实验动物的使用遵守美国国立卫生研究院(NIH)颁布的实验动物使用和护理原则以及 3R 原则。

1.1.2 主要试剂及仪器 腺苷、SCH442416、牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司);兔抗大鼠谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)多克隆抗体(美国 Abcam 公司)。倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);电热恒温干燥箱(DHG-9145A, 上海慧泰公司);pH 仪(瑞士 Mettler-Toledo 公司);离心机(美国 Beckman 公司);PCR 仪(Applied Biosystems, 美国应用生物系统公司);电泳和蛋白转膜设备(美国 Bio-Rad 公司);生物分子成像仪(ImageQuant LAS4000, 日本通用电气医疗公司)。

1.2 方法

1.2.1 Müller 细胞的分离和培养 参考文献[4]的方法进行 Müller 细胞的分离和培养:颈椎脱臼法处死 SD 大鼠后使用体积分数 75% 乙醇浸泡消毒 15 min, 无菌条件下摘取眼球, 4°C 条件下 D-Hanks 平衡盐缓冲液浸泡并漂洗数次。在培养皿中将离体眼球置于 4°C 的 D-Hanks 平衡盐缓冲液中,解剖显微镜下去除眼前节组织,钝性分离视网膜, D-Hanks 平衡盐缓冲液漂洗视网膜 2 次。收集视网膜,离心半径 10 cm, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入质量分数 0.125% 胰蛋白酶, 37°C 条件下消化 15 min, 加入含体积分数 10% 胎牛血清的高糖培养基 DMEM 终止消化,吸管吹打均匀。尼龙筛过滤,收集细胞, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 制成细胞悬液,接种于 T75 培养瓶,置于 37°C 、体积分数 5% CO_2 培养箱中进行培养。每日观察,隔日换液。待细胞接种 7~8 d 后,将培养瓶置于摇床振荡, 37°C 条件下 100 r/min 振荡 1 h。待细胞长满 80% 时, 1:2 传代,取第 2 代细胞用于实验。采用 Müller 细胞特异标志物 GS 行免疫荧光染色对细胞进行鉴定。

1.2.2 细胞加压培养 细胞计数后按每瓶 5×10^5 个细胞接种到培养瓶,放置于 5% CO_2 、 37°C 恒温培养箱中培养。当细胞长满 80% 时,更换新鲜培养液,对细胞进行加压培养实验。使用带医用 T 型三通管的橡皮塞将细胞密封于培养瓶中,注射器自 T 型三通管注入适量的无菌气体(体积分数 95% 空气、5% CO_2), 从与培养瓶相通的血压计压力表读取压力值。压力稳定后,培养瓶放入 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。

1.2.3 Western blot 法检测视网膜及 Müller 细胞 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 蛋白的表达 细胞计数,每 1×10^7 个细胞加入 500 μl CER 试剂,振荡重悬,冰浴 2 min,将细胞悬液转移到冰预冷的玻璃匀浆器内(3 ml 的小容积玻璃匀浆器),冰上手动匀浆 20 ~ 30 次。取出 500 μl 裂解混合物,转移到 1.5 ml 离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 800 $\times g$ 离心 5 min,取上清液 300 μl 加入 30 μl MER 液,冰浴 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 14 000 r/min 离心 30 min,用 100 μl Suspension Buffer 重悬细胞,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。SDS-PAGE 凝胶电泳,200 mA 转膜 120 min,含质量分数 5% 脱脂奶粉的 PBST 室温下封闭 2 h。配置 Kir2.1 (1:1 000)、Kir4.1 (1:300)、TASK-1 (1:200)、GAPDH (1:10 000)一抗溶液各 5 ml。将 PVDF 膜置于一抗溶液中杂交,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。杂交完毕后,将 PVDF 膜取出,使用 PBST 漂洗 PVDF 膜 10 min,共 3 次。将 PVDF 膜置于配置好的 5 ml 二抗溶液中(羊抗兔二抗与 1 倍 BSA 液比例为 1:2 000;驴抗羊二抗与 1 倍 BSA 液的稀释比例为 1:5 000),室温下孵育 2 h。使用 PBST 漂洗 PVDF 膜 10 min,共 3 次,将 PVDF 膜置于 Li-COR 红外线扫描仪下扫描。采用 Image ProPlus (IPP) 图像分析软件分析进行图像定量分析,以 GAPDH 为内参照,计算各目的蛋白相对表达量。

1.2.4 Real-time PCR 法检测视网膜及 Müller 细胞 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 的 mRNA 的表达 采用 Trizol 裂解法,按试剂盒操作说明进行总 RNA 的抽提。用上述已合成的 cDNA 稀释 10 倍后,采用 real-time PCR 法检测 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 mRNA 的表达。采用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒,在 AMI 7300 Real-Time PCR 扩增仪上进行 PCR 检测。Real-time PCR 引物以美国 NCBI Data Base 上登录的 Rat 的 RefSeq 为参照设计,引物由上海英潍捷基贸易有限公司提供,序列如下:KIR2.1 上游引物为 5'-CTCTCCTGGCTGTTCTTTGG-3',下游引物为 5'-ATCGGGCACTCGTCTGTAAC-3';KIR4.1 上游引物为 5'-CAAAGAAGAGGGCTGAGACG-3',下游引物为 5'-TTGAGCCGAATATCCTCACC-3';TASK-1 上游引物为 5'-ATGGTGCTCATCGGTTTCGT-3',下游引物为 5'-CGTACTGAGGCTGCGTTTGC-3'; β -actin 上游引物为 5'-GCGCTCGTCTCGACAACGG-3',下游引物为 5'-GTGTGGTGCCAAATCTTCTCC-3'。在 PCR 板上盖好密封膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 下低速离心混匀,采用两步法 PCR 扩增的标准程序进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环。PCR 仪器在 72 $^{\circ}\text{C}$ 阶段检测荧光值,得到

Ct 值后,以 β -actin 为内参,计算 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 mRNA 表达量的变化。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。各组检测结果的数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 个组 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 蛋白和 mRNA 表达的整体比较采用单因素方差分析,方差齐者采用 LSD-t 检验进行两两比较,方差不齐者采用 Games-Howells 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的鉴定

培养的细胞中 GS 表达阳性,呈红色荧光(图 1),证实为 Müller 细胞。

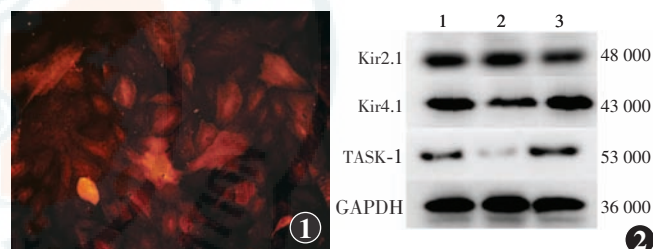


图 1 体外培养 Müller 细胞的鉴定($\times 100$) 培养的 Müller 细胞 GS 表达阳性,呈红色荧光 图 2 40 mmHg/24 h 加压和 40 mmHg/24 h+腺苷+SCH442416 对 Müller 细胞钾离子通道蛋白表达的影响 加压培养视网膜 Müller 细胞的钾离子通道 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 的蛋白表达条带减弱,腺苷+SCH442416 干预组视网膜 Müller 细胞的钾离子通道 Kir4.1 和 TASK-1 的蛋白表达条带较加压培养组增强 1:正常对照组 2:加压培养组 3:腺苷+SCH442416 干预组 注:GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

2.2 各组 Müller 细胞中 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 蛋白表达

Western blot 检测结果显示,加压培养组视网膜 Müller 细胞的钾离子通道 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 的蛋白表达下调(图 2),与正常对照组相比,Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 的蛋白表达分别下降了 14.7%、38.6% 和 52.6%,其中 3 个组间 Kir2.1 蛋白表达总体比较差异无统计学意义($P = 0.082$),Kir4.1 和 TASK-1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($P = 0.000$ 、 0.000);腺苷+SCH442416 干预组视网膜 Müller 细胞中 Kir4.1 和 TASK-1 蛋白相对表达量较加压培养组分别增加了 8.8%、60.7% 和 61.4%,2 个组 Kir2.1 蛋白表达比较,差异无统计学意义($P = 0.354$),2 个组间 Kir4.1 和 TASK-1 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P = 0.000$ 、 0.000)(表 1)。

表 1 各组 Müller 细胞中 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 蛋白表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Kir2.1 蛋白	Kir4.1 蛋白	TASK-1 蛋白
正常对照组	6	15 837 ± 1 882	254 124 ± 28 351	149 213 ± 15 944
加压培养组	6	95 392 ± 10 781	156 029 ± 11 475 ^a	92 423 ± 10 374 ^a
腺苷+SCH442416 干预组	6	103 856 ± 18 407	250 665 ± 22 316 ^b	103 856 ± 18 407 ^{ab}
F 值		1.734	38.906	54.652
P 值		2.710	0.000	0.000

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与加压培养组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验)

2.3 各组 Müller 细胞中 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 mRNA 的表达

Real-time PCR 检测结果显示,与正常对照组相比,加压培养组 Müller 细胞中 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 mRNA 相对表达量下调,差异均有统计学意义($P = 0.047, 0.001, 0.000$)。腺苷+SCH442416 干预组细胞中 Kir4.1 和 TASK-1 mRNA 的相对表达量较加压培养组增加,差异均有统计学意义($P = 0.038, 0.030$),2 个组间 Kir2.1 mRNA 相对表达量的差异无统计学意义($P = 0.612$)(表 2)。

表 2 各组 Müller 细胞中 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK-1 mRNA 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Kir2.1 mRNA	Kir4.1 mRNA	TASK-1 mRNA
正常对照组	6	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.06
加压培养组	6	0.79 ± 0.08 ^a	0.53 ± 0.63 ^a	0.69 ± 0.06 ^a
腺苷+SCH442416 干预组	6	0.74 ± 0.12 ^a	0.77 ± 0.55 ^{ab}	1.11 ± 0.27 ^b
F 值		5.242	33.938	11.873
P 值		0.048	0.000	0.010

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与加压培养组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验,Games-Howells 检验)

3 讨论

大鼠视网膜 Müller 细胞表面有丰富的钾离子通道,包括内向整流通道(Kir)家族和串联孔通道(TASK-1)和钙离子依赖型钾离子通道(BK 通道)等,钾离子通道,特别是 Kir 对于维持 Müller 细胞膜的超极化状态和细胞内外液的水、电解质平衡十分重要^[5]。TASK 包含 TASK-1、TASK-2 和 TASK-3 等亚型,在大鼠视网膜上以 TASK-1 的表达为主^[6]。Kir 家族包括强内向整流通道(Kir2.X)、弱内向整流通道(Kir4.X)和 G 蛋白偶联内向整流通道(Kir3.X)等,视网膜 Müller 细胞上以 Kir2.1、Kir4.1 表达为主^[7],但目前研究发现,斜坡刺激诱导和阶跃刺激诱导的内向整流的曲线特征主要表现为弱内向整流特征,因此,

视网膜 Müller 细胞的内向钾离子电流主要由 Kir4.1 通道和 TASK-1 通道形成^[8]。

应激状态下,视网膜 Müller 细胞激活有多种表现,比如 L-谷氨酸/L-天冬氨酸转运体和谷氨酰胺合成酶的蛋白和 mRNA 表达改变,波形蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白表达上调等^[9-11],而钾离子通道的下调也是其中的重要表现。考虑到与慢性青光眼患者和慢性高眼压动物模型的眼压水平,本研究中选择 40 mmHg 这一中等程度的加压条件进行培养^[12]。

腺苷 A_{2A}受体主要表达于视网膜内核层及神经节细胞层^[13]。有研究显示,腺苷 A_{2A}受体拮抗剂可以促进视网膜缺血缺氧损伤的修复^[14]。在本研究中,腺苷 A_{2A}受体拮抗剂 SCH442416 提高了体外加压培养的视网膜 Müller 细胞 Kir4.1 和 TASK-1 的表达,提示腺苷 A_{2A}受体拮抗剂可能通过调控视网膜离子通道的功能而达到保护神经节细胞的作用。

我们前期的研究表明,腺苷对 Kir2.1、Kir4.1 和 TASK 蛋白和 mRNA 的表达无影响^[8]。本研究中发现,40 mmHg/24 h 的加压培养可致 Müller 细胞中 Kir4.1 和 TASK-1 表达下调,SCH442416 处理使体外加压培养的视网膜 Müller 细胞中 Kir4.1 和 TASK-1 表达上调,而 Kir2.1 的表达均无明显变化,结果与小鼠缺血性视网膜病变模型的结果相似,均表现为 Kir2.1 和 Kir4.1 在同一因素的作用下的不同步调节^[15],提示 Kir2.1 可能与 Kir4.1 和 TASK-1 表达存在不同的调节机制。

综上所述,选择性腺苷 A_{2A}受体拮抗剂 SCH442416 可以有效地调控体外加压培养的 Müller 细胞中钾离子通道 Kir4.1 和 TASK-1 的表达。

参考文献

- [1] Brückner E, Grosche A, Pannicke T, et al. Mechanisms of VEGF- and glutamate-induced inhibition of osmotic swelling of murine retinal glial (Müller) cells: indications for the involvement of vesicular glutamate release and connexin-mediated ATP release [J]. Neurochem Res, 2012, 37(2): 268-278. DOI:10.1007/s11064-011-0606-z.
- [2] Valadas JS, Batalha VL, Ferreira DG, et al. Neuroprotection afforded by adenosine A_{2A} receptor blockade is modulated by corticotrophin-releasing factor (CRF) in glutamate injured cortical neurons [J]. J Neurochem, 2012, 123(6): 1030-1040. DOI:10.1111/jnc.12050.
- [3] Calabresi P, Di FM, Gallina A, et al. New synaptic and molecular targets for neuroprotection in Parkinson's disease [J]. Mov Disord, 2013, 28(1): 51-60. DOI:10.1002/mds.25096.
- [4] Yu J, Zhong Y, Cheng Y, et al. Effect of high hydrostatic pressure on the expression of glutamine synthetase in rat retinal Müller cells cultured *in vitro* [J]. Exp Ther Med, 2011, 2(3): 513-516. DOI:10.3892/etm.2011.239.
- [5] Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina [J]. Prog Retin Eye Res, 2006, 25(4): 397-424. DOI:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.
- [6] Skatchkov SN, Eaton MJ, Shuba YM, et al. Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Müller) glial

- cells[J]. *Glia*, 2006, 53(3): 266-276. DOI:10.1002/glia.20280.
- [7] Ishii M, Horio Y, Tada Y, et al. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KIR4.1, on mammalian retinal Müller cell membrane; their regulation by insulin and laminin signals[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(20): 7725-7735.
- [8] Yang Z, Huang P, Liu X, et al. Effect of adenosine and adenosine receptor antagonist on Müller cell potassium channel in Rat chronic ocular hypertension models[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11294 [2018-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462755/>. DOI:10.1038/srep11294.
- [9] Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F, et al. Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(11): 3615-3621.
- [10] Lam TT, Kwong JM, Tso MO. Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(2): 638-645.
- [11] Shen F, Chen B, Danias J, et al. Glutamate-induced glutamine synthetase expression in retinal Müller cells after short-term ocular hypertension in the rat[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(9): 3107-3112. DOI:10.1167/iovs.03-0948.
- [12] Goldblum D, Mittag T. Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye[J]. *Vision Res*, 2002, 42(4): 471-478.
- [13] Crooke A, Guzmán-Arangué A, Peral A, et al. Nucleotides in ocular secretions; their role in ocular physiology[J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 119(1): 55-73. DOI:10.1016/j.pharmthera.2008.04.002.
- [14] Zhong Y, Yang Z, Huang WC, et al. Adenosine, adenosine receptors and glaucoma: an updated overview[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(4): 2882-2890. DOI:10.1016/j.bbagen.2013.01.005.
- [15] Iandiev I, Tenckhoff S, Pannicke T, et al. Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 396(2): 97-101. DOI:10.1016/j.neulet.2005.11.016.

(收稿日期:2018-02-24 修回日期:2018-06-26)

(本文编辑:刘艳)

· 病例报告 ·

兄弟同患 Stargardt 病病例报告

任秀玉 马翔 秦秀虹 孙晓晶

116011 大连医科大学附属第一医院眼科

通信作者:马翔, Email: xma9467@vip.sina.com

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2018.08.004

例1,患者,男,23岁,因双眼视力逐渐下降约13年,2015年7月于大连医科大学附属第一医院就诊。既往无其他疾病史。家族史:父母健康,非近亲结婚。双眼视力0.06,矫正无助。色觉检查示红绿色弱。双眼眼前节无异常。双眼眼底视盘颜色正常,边界清晰,视网膜血管纹理尚清晰,动静脉比为2:3,双眼黄斑区可见类椭圆形萎缩变性灶,大小约2.0 PD×1.5 PD,边界不清,呈金箔样反光,其中有“骨刺”样色素沉着及淡黄色斑点,黄斑中心凹反光消失。黄斑区呈青灰色改变,病灶周围可见大量弥散的、欠清晰黄白色斑点(图1)。红外自发荧光(infrared autofluorescence, IRAF)检查示,黄斑受累区呈大片弱荧光区(图2)。荧光素眼底血管造影(fundus fluorescence angiography, FFA)检查可见视盘荧光正常,动脉期充盈正常,静脉早期血管弓内大片颗粒状高荧光改变,其间可见片状荧光遮蔽,呈现牛眼状窗样透见荧光(图3),晚期黄斑区无明显荧光素渗漏。整个造影过程中呈脉络膜淹没征(图4),左眼表现大致同右眼。光相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)检查示,双眼病变区视网膜色素上皮和光感受器萎缩,神经上皮层菲薄(图5)。闪光视网膜电图(flicker electroretinogram, FERG)检查示双眼明暗适应振幅下降,提示视网膜色素上皮层萎缩。诊断:双眼 Stargardt 病。

例2,患者,男,16岁,为例1患者的直系弟弟,因双眼视力逐渐下降约7年,2015年7月于大连医科大学附属第一医院就诊。既往无其他疾病史。双眼视力0.1,矫正无助。色觉检查示红绿色弱。双眼眼前节无异常。双眼眼底视盘颜色正常,边界清楚,视网膜血管纹理尚清晰,动静脉比为2:3,双眼黄斑区可见土黄色横椭圆形萎缩变性灶,大小约1.0 PD×1.5 PD,边界

清晰,呈金箔样反光,黄斑中心凹反光消失,视网膜中周部可见大量、清晰的黄白色斑点(图6)。IRAF检查示双眼黄斑区椭圆形弱荧光,后极部见大量点状强荧光斑(图7)。FFA检查示双眼静脉期视盘边界清晰,黄斑区拱环内可见牛眼状强荧光,后极部视网膜见多量点状强荧光,晚期黄斑区无明显渗漏(图8)。脉络膜淹没征(+) (图9)。双眼OCT、FERG检查结果与例1患者相似(图10)。诊断:双眼 Stargardt 病。

讨论:Stargardt 病是临床上少见的常染色体隐性遗传病,可散发,多见于10~20岁青少年人群,无性别差异,表现为双眼中心视力渐进性下降。多数病例一旦视力下降至0.5以下,则视力迅速下降并稳定在0.1左右。不同年龄的患者视力下降持续时间不同,20岁以前、21~24岁及41~60岁发病者,视力自0.5降至0.1的时间分别是7、22和29年^[1]。Stargardt 病眼底改变为黄斑部圆形或椭圆形萎缩区和/或周围散在黄白色斑点,检眼镜下可见黄斑区呈“金箔样”反光。该病灶多单独存在,最终残留类似“牛眼”状视网膜色素上皮和毛细血管萎缩灶。IRAF表现为病灶区呈低荧光改变,与OCT检查显示神经上皮层菲薄、层次不清的结构改变结果符合。病灶周围有环形高荧光带往往提示病变正处于发展阶段,而这些区域在FFA和彩色眼底像上远不如自发荧光明显。FFA见脉络膜背景荧光普遍减弱,增加了与视网膜血管荧光的对比度,反衬出视网膜毛细血管更加清晰,即脉络膜淹没征,为 Stargardt 病诊断的特异性指征^[2-3]。FERG结果显示,明暗适应下各波振幅均有降低,反映病变范围较大,视锥、视杆细胞均受损。本病例中2例兄弟患者发病年龄均在10岁左右,双眼视力呈对称下降,且稳定在0.1左右,发病年龄及视力变化与文献报道相符,且两兄弟均伴