

· 实验研究 ·

谷氨酸对视神经脑膜上皮细胞的兴奋性毒性作用及其氧化应激机制

辛晓蓉 巩天祥 洪纓 党鸿

810000 西宁,青海红十字医院眼科(辛晓蓉、党鸿);610041 成都血液中心研究室(巩天祥、洪纓)

通信作者:辛晓蓉,Email:xrgc19@hotmail.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.05.009

【摘要】 **背景** 作为脑脊液-视神经屏障的主要细胞成分,视神经脑膜上皮细胞(MECs)直接与脑脊液相接触,脑脊液中的组分改变可影响 MECs 的功能,进而对视神经的功能产生不利影响。**目的** 探讨脑脊液中兴奋性神经递质谷氨酸对 MECs 功能的影响,为视神经疾病发病机制的研究提供新的线索。**方法** 将培养的人 MECs 株制备成悬液并接种于 96 孔培养板中,密度为 1×10^4 /孔,分别在培养液中添加 100、200、400、600、800 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸孵育 12、24、36、48 和 72 h,未添加谷氨酸者作为正常对照组,采用 MTS 法测定各组 MECs 的增生率(吸光度 A_{490})值。采用 600 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸分别孵育 MECs 24 h 和 48 h,未添加谷氨酸者作为正常对照组,采用实时定量 PCR 法检测细胞中超氧化物歧化酶(SOD)mRNA 和热休克蛋白 90(HSP90)mRNA 的相对表达量;采用 ELISA 法检测细胞的总抗氧化能力(T-AOC),并通过荧光探针 DCFH-DA 观察细胞活性氧(ROS)的荧光强度。**结果** 培养 MECs 生长良好,培养后 72 h 约 80% 细胞达到融合。不同浓度谷氨酸培养组随着谷氨酸浓度的增加及作用时间的延长细胞增生率逐渐下降,总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{浓度}} = 52.501, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 8.505, P < 0.001$)。实验后 24 h 和 48 h 谷氨酸处理组细胞中 SOD mRNA 相对表达量均明显低于同时间点正常对照组,差异均有统计学意义($t = 20.278, t = 16.724$, 均 $P < 0.001$);谷氨酸作用 MECs 后 24 h 细胞中 HSP90 mRNA 相对表达量明显高于正常对照组,差异有统计学意义($t = 5.065, P = 0.002$)。实验后 24 h 谷氨酸处理组细胞中 T-AOC 活性为 $(30.835 \pm 2.094) \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{L})$,低于正常对照组的 $(32.873 \pm 2.317) \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{L})$,但差异无统计学意义($t = 1.599, P = 1.414$);实验后 48 h 谷氨酸处理组细胞中 T-AOC 活性为 $(29.561 \pm 1.831) \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{L})$,低于正常对照组的 $(33.680 \pm 2.039) \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{L})$,差异有统计学意义($t = 3.682, P = 0.004$)。谷氨酸处理组细胞中 ROS 荧光强于正常对照组,谷氨酸处理组处理后 24 h 及 48 h 细胞中 ROS 含量分别为 48.110 ± 1.712 和 40.982 ± 1.853 ,均明显高于正常对照组的 36.608 ± 1.009 和 37.153 ± 1.424 ,差异均有统计学意义($t = 14.178, P < 0.001; t = 4.012, P = 0.002$)。**结论** 谷氨酸可抑制体外培养 MECs 的增生,其对 MECs 的兴奋毒性作用与氧化应激刺激作用有关。

【关键词】 谷氨酸;脑膜上皮细胞;视神经;氧化应激反应;兴奋性氨基酸/毒性作用;细胞增生/药物作用;人;培养细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目(81160122、81460086);留学人员科技活动择优资助项目;青海省自然科学基金项目(2014-Z-911)

Excitatory toxicity of glutamate on meningotheial cells of optic nerve sheaths and its oxidative stress mechanism

Xin Xiaorong, Gong Tianxiang, Hong Ying, Dang Hong

Department of Ophthalmology, Qinghai Red Cross Hospital, Xining 810000, China (Xin XR, Dang H); Blood Research Laboratory, Chengdu Blood Center, Chengdu 610041, China (Gong TX, Hong Y)

Corresponding author: Xin Xiaorong, Email: xrgc19@hotmail.com

【Abstract】 **Background** Meningotheial cells (MECs) occupy the predominant cell component of barrier between optic nerve and the cerebral spinal fluid, and any change of cerebral fluid components probably affects the MECs function and further impairs the optic nerve. **Objective** This study was designed to investigate the influence of glutamate, a potentially excitotoxic amino acid, to the functional changes of MECs and provide a theoretical evidence for clarifying the mechanism of optic nerve disorders. **Methods** Human MECs strains were cultured *in vitro* and prepared into cell suspension. The cells were inoculated to 96-well plates with the densities of 1×10^4 /well. The

glutamate of 100, 200, 400, 600, 800 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ was added into medium for 12, 24, 36, 48 and 72 hours, respectively, and the cultured cells without glutamate were used as normal control group. MTS assay was employed to measure the proliferative rate (absorbency) of the cells. The regularly cultured MECs were divided into 600 $\mu\text{mol/L}$ glutamate-treated group and normal control group and the cells were treated for 12 and 24 hours respectively, and the expression of superoxide dismutase (SOD) mRNA and heat shock protein 90 (HSP90) mRNA in the cells was detected by real-time PCR; the level of total anti-oxidative capacity (T-AOC) of the cells was processed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the reactive oxygen species (ROS) production was determined by DCFH-DA probe. **Results** Cultured MECs grew well and formed 80% confluence after 72 hours culture. The proliferative rate of the cells were gradually decreased with the increase of glutamate dose and the lapse of affected time, with significant differences among different concentrations of glutamate and various time points ($F_{\text{concentration}} = 52.501$, $P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 8.505$, $P < 0.001$). The relative expression level of SOD mRNA was significantly reduced in the glutamate-treated group compared with the normal control group in both 24 hours and 48 hours after culture ($t = 20.278$, $t = 16.724$, both at $P < 0.001$), and the expression of HSP90 mRNA in the cells was significantly lower in the glutamate-treated group than that in the normal control group in 24 hours after culture ($t = 5.065$, $P = 0.002$). No significant difference was found in T-AOC activity between glutamate-treated group and normal control group in 24 hours after culture ($[30.835 \pm 2.094]$ nmol/(min · L) vs. $[32.873 \pm 2.317]$ nmol/(min · L)) ($t = 1.599$, $P = 1.414$). In 48 hours after culture, T-AOC activity was (29.561 ± 1.831) nmol/(min · L) in the glutamate-treated group, which was significantly lower in comparison with normal control group (33.680 ± 2.039) nmol/(min · L) ($t = 3.682$, $P = 0.004$). Fluorescence staining showed that the intensity of green fluorescence of ROS in MECs in the normal control group was weaker than that in the glutamate-treated group under the immunofluorescence microscope. The ROS level was 48.110 ± 1.712 and 40.982 ± 1.853 at 24 hours and 48 hours in the glutamate-treated cells, and which was significantly elevated in comparison with 36.608 ± 1.009 and 37.153 ± 1.424 in the normal control group ($t = 14.178$, $P < 0.001$; $t = 4.012$, $P = 0.002$). **Conclusions** Glutamate inhibits the proliferation of MECs *in vitro*, and excitatory toxicity of glutamate on MECs probably is associated with oxidative stress response.

[Key words] Glutamate; Epithelial cells, meninges/pathology; Optic nerve; Oxidative stress; Excitatory amino acid/toxicity; Cell proliferation/drug effects; Humans; Cells, cultured

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81160122, 81460086); Ministry of Human Resources and Social Security of PRC; Natural Science Foundation of Qinghai (2014-ZJ911)

以往视神经疾病的基础研究多侧重于神经胶质细胞和视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的研究, 而对于包绕视神经的脑膜以及覆盖视神经脑膜的主要细胞成分——脑膜上皮细胞在视神经疾病中作用的研究甚少。视神经超微结构观察显示, 视神经脑膜上皮细胞 (meningothelial cells, MECs) 是包绕视神经的主要细胞成分, 与脑脊液直接相接触^[1], 参与脑脊液和视神经间屏障的形成, 在保持屏障完整性方面发挥重要作用。视神经脑膜上皮细胞在应激状态下可能发生结构和功能的变化, 从而影响脑脊液和视神经之间屏障的正常生理作用, 导致视神经疾病的发生。我们前期的研究探讨了缺氧等对 MECs 的影响, 提示缺氧抑制 ATP 的产生, 影响线粒体膜电位, 进而损伤线粒体膜, 促使细胞色素 C 释放至细胞质, 并且影响内质网^[2-4]。我们推测脑脊液中生物活性物质的积聚对 MECs 功能也会产生影响。脑脊液中含有多种蛋白质, 其中谷氨酸是中枢神经系统的重要神经递质, 脑脊液中谷氨酸的过度积聚可能产生兴奋性毒性作用, 破

坏 MECs 功能, 导致 MECs 内抗氧化防御系统受损, 引起氧自由基及其相关代谢产物过量聚集, 从而对细胞产生损害作用, 导致脑脊液-视神经屏障的通透性改变, 进而影响脑脊液中其他生物活性物质的清除, 引起脑脊液中组分失衡及脑脊液功能失调^[5-6], 可能在缺血性视神经病变和开角型青光眼等视神经损伤过程中起到一定的作用^[7-9]。本研究中拟探讨谷氨酸对 MECs 功能的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

MECs 细胞株 (德国 DMSZ 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 丙酮酸盐、苹果酸、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、总抗氧能力水平 ELISA 检测试剂盒 (美国 MyBiosource 公司); DFCH-DA 检测试剂盒、MTS 检测试剂盒、活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (中国 Beyotime 公司); Total RNA Extracor 试剂盒、Green-2-

Go qPCR mastermix 试剂盒(上海生工生物股份有限公司);青霉素、链霉素(美国 Sigma 公司);75 cm²培养瓶(美国 Sarstedt 公司);96 孔培养板(美国 Costar 公司);PCR 反应扩增仪(美国 BIO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MECs 细胞株置于 75 cm²培养瓶进行培养,培养液为含青霉素 0.1 U(商品单位)/L、链霉素 0.1 μg/L 的 DMEM,分别于培养后 24、48 和 72 h 用倒置显微镜观察细胞形态并拍照。

1.2.2 MTS 法检测 MECs 的增生率 待培养细胞生长至融合状态,用质量分数 0.25% 胰蛋白酶和质量分数 0.02% EDTA 溶液消化,吹打成细胞悬液,离心半径 10 cm,2 500 r/min 离心 3 min,弃上清,收集细胞。将 MECs 消化后制备成细胞悬液,以 1×10⁴/孔的浓度 100 μl 接种于 96 孔培养板,分别加入 0(正常对照组)、100、200、400、600、800 和 1 000 μmol/L 谷氨酸,每一浓度设置 6 个复孔,分别于培养后 24、48 和 72 h 向每孔中加入 100 μl MTS 溶液。采用酶标仪测定波长为 490 nm 的吸光度(A)值,计算细胞增生率。细胞增生率=处理组 A 值/正常对照组 A 值×100%。1 000 μmol/L 时细胞增生率最低,为 22.74%,100 μmol/L 时细胞增生率为 72.61%,谷氨酸抑制作用最低,谷氨酸为 600 μmol/L 时细胞增生率为 50.89%,近似谷氨酸对细胞的 IC₅₀ 值,故选 600 μmol/L 谷氨酸为进一步实验的最适剂量浓度。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 MECs 中超氧化物歧化酶和热休克蛋白 90 的基因表达 将 MECs 消化后调整细胞浓度,将细胞悬液接种于 75 cm²培养瓶,使细胞密度为 1×10⁶,培养液为含青霉素 0.1 U/L、链霉素 0.1 μg/L 的 DMEM,谷氨酸培养组培养液中加入 600 μmol/L 谷氨酸,未添加谷氨酸的细胞作为正常对照组。分别孵育细胞后 24 h 和 48 h 用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 溶液消化,吹打成细胞悬液,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,2 500 r/min 离心 3 min,收集细胞。采用 Total RNA Extracor 提取试剂盒 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,按照 Green-2-Go qPCR mastermix 试剂盒行实时荧光定量 PCR 反应。热休克蛋白 90 (heat shock protein, HSP90)上游引物:5'-ACTTCCGTG ATACGATGCCTAA-3',下游引物:5'-CATGTTGATT CGAGTGGTCTT-3';超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)上游引物:5'-TGGACAAACCTCAG CCCTAA-3',下游引物:5'-AAACCAAGCCAACCCCAA C-3';β-actin 上游引物:5'-TAGTTGCGTTACACCCTT TCTTG-3';下游引物:5'-TCACCTTCACCGTTCCAGT TT-3'。将提取的 RNA 逆转录合成 cDNA,以 cDNA 产

物为模板,反应条件:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 60 s,60 ℃ 扩增 60 s,40 个循环。扩增后进行融解曲线分析,以 0.17 ℃/s 变化速度从 55 ℃ 升至 95 ℃,每隔 2 s 记录 1 次荧光值,获得融解曲线。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算细胞中 SOD mRNA 和 HSP90 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 ELISA 法测定 MECs 总抗氧化能力 细胞的处理方法同 1.2.3,细胞消化吹打成细胞悬液,1 000 r/min 离心 3 min,收集上清液。96 孔酶标板依次编号,标准品稀释并加样,分别设空白孔和待测样品孔,所有样本均设双孔检测。每孔加入酶标试剂 100 μl,空白孔除外,温育后洗涤拍干,加入显色剂,每孔加终止液 100 μl,终止反应。酶标仪器仪表在波长 450 nm 处依序测量各孔的 A 值作为总抗氧化能力(total anti-oxidative capacity, T-AOC)水平,根据样品的 A 值由标准曲线查出相应的酶活性。

1.2.5 细胞内 ROS 测定 将 100 μl 细胞悬液接种于 96 孔培养板中,细胞密度为 1×10⁴/孔,谷氨酸处理组加入 600 μmol/L 谷氨酸,未添加谷氨酸者为正常对照组。培养板置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,分别于培养后 24 h 和 48 h 加入 20 μmol/L DCFH-DA,每孔 50 μl,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中避光培养 20 min。用无血清 DMEM 洗 3 次,ROSup 刺激 30 min 作为阳性对照,多功能酶标仪检测激发波长为 488 nm、发射波长为 525 nm 处的荧光值,荧光显微镜下观察细胞内 ROS 的荧光强度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件(10034432, IBM, Chicago)进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组多水平协方差研究设计,不同浓度谷氨酸作用不同时间点 MECs 增生率、不同浓度谷氨酸作用不同时间点细胞中 SOD mRNA 和 HSP90 mRNA 相对表达量的变化以及 T-AOC 活性和 ROS 水平的总体差异比较均采用两因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的形态

正常 MECs 培养后 24 h 贴壁生长,细胞形态扁平,细胞核为卵圆形(图 1A);细胞培养后 48 h 可见细胞突起延伸,细胞数量增多(图 1B);随着培养时间的延长,细胞增生明显,突触延伸,至培养后 72 h 约 80% 的细胞达到融合,细胞间彼此相连(图 1C)。

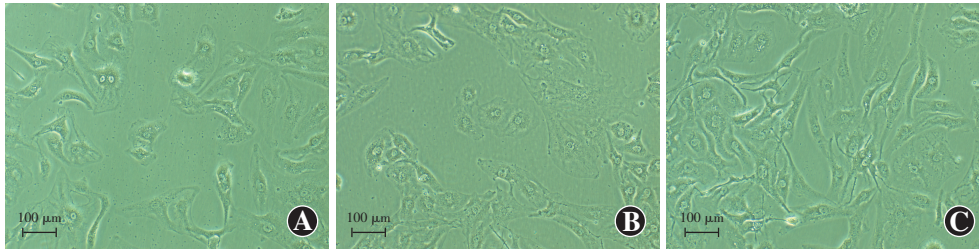


图 1 正常 MECs 形态观察 (标尺 = 100 μm) A: 细胞培养后 24 h 贴壁, 细胞核为卵圆形 B: 细胞培养后 48 h 可见细胞突触, 细胞数量增多 C: 细胞培养后 72 h 约 80% 细胞融合

2.2 不同浓度谷氨酸培养不同时间 MECs 的增生率及活性

正常对照组和 100、200、400、600、800、1 000 μmol/L 谷氨酸培养 MECs 后 12、24、36、48 和 72 h 细胞增生率和活性明显不同, 正常对照组随着时间延长细胞增生率逐渐增加, 400、600、800 和 1 000 μmol/L 谷氨酸培养

组随着时间延长细胞增生率逐渐下降。细胞培养后 24、36、48 和 72 h, 不同浓度谷氨酸培养组随着谷氨酸浓度的增加细胞增生率逐渐下降。不同浓度谷氨酸培养组作用不同时间细胞增生率的总体比较差异均有统计学意义 ($F_{浓度} = 52.501, P < 0.001; F_{时间} = 8.505, P < 0.001$) (表 1)。

表 1 不同浓度谷氨酸作用不同时间 MECs 增生率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

谷氨酸浓度 (μmol/L)	样本量	培养不同时间点细胞增生率				
		12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
0	6	0.791±0.010	0.766±0.032	0.821±0.040 ^a	0.854±0.024 ^a	0.977±0.099 ^a
100	6	0.760±0.027	0.732±0.010 ^d	0.756±0.038 ^d	0.785±0.023 ^d	0.781±0.064 ^d
200	6	0.753±0.013	0.725±0.014 ^d	0.726±0.027 ^d	0.757±0.022 ^d	0.735±0.033 ^d
400	6	0.748±0.009	0.723±0.010 ^d	0.693±0.015 ^{ad}	0.630±0.028 ^{ad}	0.703±0.025 ^{ad}
600	6	0.736±0.018	0.689±0.007 ^{adefg}	0.663±0.022 ^{adef}	0.603±0.023 ^{abdef}	0.625±0.052 ^{adef}
800	6	0.731±0.021	0.683±0.011 ^{adefg}	0.634±0.015 ^{adefg}	0.583±0.060 ^{abdefgi}	0.532±0.056 ^{abdefgi}
1 000	6	0.751±0.026	0.668±0.035 ^{adefgh}	0.571±0.010 ^{abdefghi}	0.540±0.031 ^{abdefgi}	0.424±0.021 ^{abdefgi}

注: $F_{浓度} = 52.501, P < 0.001; F_{时间} = 8.505, P < 0.001$ 。与各自组内 12 h 比较, ^a $P < 0.01$; 与各自组内 24 h 比较, ^b $P < 0.01$; 与各自组内 36 h 比较, ^c $P < 0.01$; 与各自时间点 0 μmol/L 组比较, ^d $P < 0.01$; 与各自时间点 100 μmol/L 组比较, ^e $P < 0.01$; 与各自时间点 200 μmol/L 组比较, ^f $P < 0.01$; 与各自时间点 400 μmol/L 组比较, ^g $P < 0.01$; 与各自时间点 600 μmol/L 组比较, ^h $P < 0.01$; 与各自时间点 800 μmol/L 组比较, ⁱ $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-t 检验) MECs: 脑膜上皮细胞

2.3 谷氨酸作用后 MECs 产生 SOD mRNA 和 HSP90 mRNA 表达的变化

随着谷氨酸作用时间的延长, 细胞中 SOD mRNA 相对表达量下降而 HSP90 mRNA 相对表达量增加, 正常对照组和谷氨酸培养组培养 24 h 和 48 h 细胞中 SOD mRNA 相对表达量和 HSP90 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (SOD mRNA: $F_{分组} = 102.184, P < 0.001; F_{时间} = 20.097, P = 0.001$; HSP90 mRNA: $F_{分组} = 6.367, P = 0.025; F_{时间} = 26.775, P < 0.001$), 其中 600 μmol/L 谷氨酸作用 24 h 和 48 h 细胞中 SOD mRNA 的相对表达量均明显低于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 20.278, 16.724$, 均 $P < 0.001$); 谷氨酸作用 MECs 后 24 h 细胞中 HSP90 mRNA 的相对表达量明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t = 5.065, P = 0.002$), 而作用后 48 h 2 个组间细胞中 HSP90 mRNA 相对表达量的差异无统计学意义 ($t = -1.079, P = 0.322$)。谷氨酸作用后 48 h 细胞中 SOD mRNA 相对表达量明显低于作用后 24 h, 而

HSP90 mRNA 相对表达量明显高于作用后 24 h, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 2)。

表 2 谷氨酸作用不同时间后 MECs 中 SOD mRNA 和 HSP90 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	作用不同时间 SOD mRNA 表达		作用不同时间 HSP90 mRNA 表达	
		24 h	48 h	24 h	48 h
正常对照组	6	0.978±0.019	0.930±0.055	0.846±0.108	0.957±0.030
谷氨酸培养组	6	0.695±0.028 ^a	0.367±0.004 ^{ab}	0.566±0.024 ^a	0.981±0.031 ^b

注: SOD mRNA: $F_{分组} = 102.184, P < 0.001; F_{时间} = 20.097, P = 0.001$; HSP90 mRNA: $F_{分组} = 6.367, P = 0.025; F_{时间} = 26.775, P < 0.001$ 。与各自时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与各自组内 24 h 比较, ^b $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-t 检验) MECs: 脑膜上皮细胞; SOD: 超氧化物歧化酶; HSP: 热休克蛋白

2.4 谷氨酸作用后 MECs 产生 T-AOC 水平的变化

谷氨酸处理组用谷氨酸作用 MECs 后 24 h, MECs 中 T-AOC 活性较正常对照组轻度下降, 但组间差异无统计学意义 ($t = 1.599, P = 1.414$)。谷氨酸作用后 48 h 细胞中 T-AOC 的产生量与正常对照组比较明显下降, 差异有统计学意义 ($t = 3.682, P = 0.004$) (表 3)。

表 3 谷氨酸作用不同时间后 MECs 中 T-AOC 的变化 [$\bar{x} \pm s$, nmol/(min · L)]

组别	样本量	作用不同时间点 T-AOC 活性	
		24 h	48 h
正常对照组	6	32.873 ± 2.317	33.680 ± 2.039
谷氨酸培养组	6	30.835 ± 2.094	29.561 ± 1.831 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 56.875, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 0.074, P = 0.788$. 与各自时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) MECs: 脑膜上皮细胞; T-AOC: 总抗氧化能力

2.5 谷氨酸作用后 MECs 中 ROS 水平变化

谷氨酸处理组用谷氨酸作用 MECs 24 h, 细胞中 ROS 的水平明显高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t = 14.178, P < 0.001$); 谷氨酸作用后 48 h 细胞中 ROS 水平明显高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t = 4.012, P = 0.002$), 但低于谷氨酸作用后 24 h (表 4)。荧光显微镜下可见谷氨酸处理组细胞中 ROS 荧光明显强于正常对照组, 谷氨酸作用于细胞后 48 h 细胞中 ROS 荧光强度减弱, 但仍强于正常对照组 (图 2)。

表 4 谷氨酸作用不同时间后 MECs 中 ROS 水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 ROS 含量	
		24 h	48 h
正常对照组	6	36.608 ± 1.009	37.153 ± 1.424
谷氨酸处理组	6	48.110 ± 1.712 ^a	40.982 ± 1.853 ^{ab}

注: $F_{\text{浓度}} = 54.682, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 10.084, P = 0.005$. 与同时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.001$; 与组内 24 h 比较, ^b $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) MECs: 脑膜上皮细胞; ROS: 活性氧

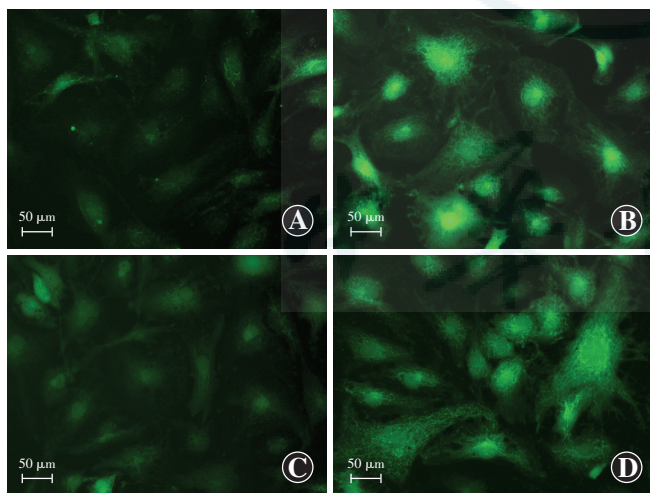


图 2 谷氨酸作用后 MECs 中 ROS 荧光强度变化 荧光显微镜下细胞中 ROS 呈绿色荧光 (DCFH-DA, 标尺 = 50 μm) A: 实验后 24 h 正常对照组 MECs 中 ROS 荧光强度微弱 B: 实验后 24 h 谷氨酸处理组 MECs 中 ROS 荧光强度明显强于正常对照组 C: 实验后 48 h 正常对照组 MECs 中 ROS 荧光强度稍强于实验后 24 h D: 谷氨酸作用后 48 h 谷氨酸处理组 MECs 中 ROS 荧光强度减弱

3 讨论

MECs 位于脑脊液和神经组织的交界处, 被覆于

蛛网膜下腔的鞘膜, 直接与脑脊液接触, 因此对脑脊液组分及其含量的改变以及各种刺激非常敏感, 对于维持神经组织的功能具有重要作用。MECs 在清除脑脊液的代谢物中发挥重要作用, 维持脑脊液的平衡并参与免疫反应。病理条件下, 对视神经鞘膜细胞的 MECs 及蛛网膜下腔小梁等产生刺激, 影响脑脊液循环, 导致视神经腔室综合征^[5], 进而引起脑脊液成分改变, 对 MECs 及其线粒体产生损害, 并影响蛛网膜下腔供应视神经的软脑膜丛中的血管。视神经腔室综合征的形成导致视神经蛛网膜下腔脑脊液中生物分子浓度及脑脊液流速发生相应改变, 使脑脊液中的生物活性物质蛋白聚集, 从而引起脑脊液中组分失衡及脑脊液功能失调。我们以往的研究提示, 脑脊液中 B-trace 蛋白浓度的改变对胶质神经细胞的增生和线粒体功能产生影响^[10]。

脑脊液中含有多种蛋白质, 85% 来源于血液, 约 15% 的蛋白, 如谷氨酸蛋白等在脑内合成。谷氨酸是中枢神经系统重要的神经递质, 研究证实在脑外伤、脑缺血等病理情况下均有大量谷氨酸释放到细胞间隙, 引起神经细胞肿胀。谷氨酸的兴奋性毒性与神经变性疾病氧化应激作用等有关^[11-15]。氧化应激反应过程中氧自由基过量生成, 氧自由基及其相关代谢产物过量聚集, 对细胞产生多种毒性作用。研究表明谷氨酸的兴奋性毒性与青光眼相关的线粒体失调相关^[12]。

本研究提示 600 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸处理后 MECs 中 T-AOC 活性下降, SOD 表达量减少, ROS 产生增多, 证实细胞总的氧化应激反应降低了细胞的抗氧化能力, 短时间内 HSP90 mRNA 表达下调, 随着谷氨酸作用时间延长, HSP90 mRNA 表达量增加, 我们推测当细胞应激时, 细胞质内的 HSP 迅速移入细胞核并包围核仁, 细胞质内只有少量 HSP; 应激状态消除后细胞处于恢复阶段, 细胞核内 HSP 又返回细胞质。HSP 通过控制蛋白质的折叠、伸展、转运、寡聚体的形成和解聚来调节细胞骨架等, 从而在细胞中执行重要的生理功能, 在病理条件下提高细胞的抵抗力, 对细胞发挥应激保护作用。谷氨酸引起 MECs 凋亡细胞增多, 细胞中 caspase 9 上调。从本研究结果可以推测, 谷氨酸可能通过凋亡机制来抑制 MECs 的增生, 影响 MECs 形成紧密的细胞层来限制物质在脑脊液和脑组织间自由扩散的功能。另外, MECs 具有内吞作用, MECs 的功能受到影响可能会影响蛛网膜下腔的生物活性物质的清除, 从而导致脑脊液腔室的改变。我们的研究表明, MECs 通过主动内吞作用而清除脑脊液中的代谢物质^[2], 在谷氨酸的作用下 ROS 增多也提示谷氨酸兴奋

性毒性对 MECs 功能产生影响,可能与线粒体的氧化磷酸化过程异常,影响线粒体膜电位,损伤线粒体膜的结构和功能,细胞色素 C 释放,启动凋亡途径有关,可使细胞的吞噬功能进一步下降,影响蛛网膜下腔的生物活性物质的清除,这可能是引起视神经腔室综合征的主要病理机制^[16-17],这种损害由于同时发生的氧化应激而进一步加重。这也可能是阿尔茨海默病^[18]、青光眼等神经性疾病的病理机制之一,有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Killer HE, Laeng HR, Flammer J, et al. Architecture of arachnoid trabeculae, pillars, and septa in the subarachnoid space of the human optic nerve; anatomy and clinical considerations [J]. Br J Ophthalmol, 2003, 87(6): 777-781.
- [2] Xin X, Fan B, Flammer J, et al. Meningothelial cells react to elevated pressure and oxidative stress [J/OL]. PLoS One, 2011, 6(5): e20142 [2013-01-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21611150/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0020142.
- [3] 辛晓蓉, 巩天祥, 赵莉, 等. 缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞 ATP 水平和细胞色素 C 表达的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(1): 28-31. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.006.
Xin XR, Gong TX, Zhao L, et al. Effects of hypoxia on production of ATP and expression of mitochrome C in human meningothelial cells as the cerebral fluid-optic nerve barrier [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(1): 28-31. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.006.
- [4] 辛晓蓉, 巩天祥. 缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞内质网和线粒体膜电位的影响 [J]. 眼科新进展, 2014, 34(11): 1009-1012. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0280.
Xin XR, Gong TX. Effects of hypoxia on endoplasmic reticulum and mitochondrial membrane potential in human meningothelial cells in cerebral fluid-optic nerve barrier [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(11): 1009-1012. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0280.
- [5] Killer HE, Jaggi GP, Flammer J, et al. Cerebrospinal fluid dynamics between the intracranial and the subarachnoid space of the optic nerve. Is it always bidirectional? [J]. Brain, 2007, 130(Pt 2): 514-520. DOI: 10.1093/brain/awl324.
- [6] Killer HE, Jaggi GP, Flammer J, et al. The optic nerve: a new window into cerebrospinal fluid composition? [J]. Brain, 2006, 129(Pt 4): 1027-1030.
- [7] Killer HE, Mironov A, Flammer J. Optic neuritis with marked distension of the optic nerve sheath due to local fluid congestion [J]. Br J Ophthalmol, 2003, 87(2): 249.
- [8] Jaggi GP, Mironov A, Huber AR, et al. Optic nerve compartment syndrome in a patient with optic nerve sheath meningioma [J]. Eur J Ophthalmol, 2007, 17(3): 454-458.
- [9] Killer HE, Jaggi GP, Flammer J, et al. Is open-angle glaucoma caused by impaired cerebrospinal fluid circulation around the optic nerve? [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2008, 36(4): 308-311. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2008.01735.x.
- [10] Xin X, Huber A, Meyer P, et al. L-PGDS (betatrace protein) inhibits astrocyte proliferation and mitochondrial ATP production in vitro [J]. J Mol Neurosci, 2009, 39(3): 366-371. DOI: 10.1007/s12031-009-9214-7.
- [11] Nicholls DG, Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts [J]. Trends Neurosci, 2000, 23(4): 166-174.
- [12] Ju WK, Kim KY, Angert M, et al. Memantine blocks mitochondrial OPA1 and cytochrome c release and subsequent apoptotic cell death in glaucomatous retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(2): 707-716. DOI: 10.1167/iovs.08-2499.
- [13] Fan MM, Raymond LA. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease [J]. Prog Neurobiol, 2007, 81(5-6): 272-293. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2006.11.003.
- [14] Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. Ann Neurol, 1995, 38(3): 357-366.
- [15] Ju WK, Lindsey JD, Angert M, et al. Glutamate receptor activation triggers OPA1 release and induces apoptotic cell death in ischemic rat retina [J]. Mol Vis, 2008, 14: 2629-2638.
- [16] Jaggi GP, Harlev M, Ziegler U, et al. Cerebrospinal fluid segregation optic neuropathy: an experimental model and a hypothesis [J]. Br J Ophthalmol, 2010, 94(8): 1088-1093. DOI: 10.1136/bjo.2009.171660.
- [17] Killer HE, Jaggi GP, Miller NR, et al. Cerebrospinal fluid dynamics between the basal cisterns and the subarachnoid space of the optic nerve in patients with papilloedema [J]. Br J Ophthalmol, 2011, 95(6): 822-827. DOI: 10.1136/bjo.2010.189324.
- [18] Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, et al. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology [J]. J Psychiatry Neurosci, 2013, 38(1): 6-23. DOI: 10.1503/jpn.110190.

(收稿日期: 2016-10-05)

(本文编辑: 尹卫靖 张荻)

· 病例报告 ·

真性晶状体囊膜剥脱合并年龄相关性白内障一例

方石峰 卢建民 秦秀虹 高锦展 马翔

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/cma.j.issn.2095-0160.2017.05.010

患者,男,67岁,因左眼无痛性视力下降2年于2014年11月10日至大连医科大学附属第一医院眼科就诊。既往无葡萄膜炎病史,无内眼手术及眼外伤史,否认高温环境、热辐射接触史,无糖尿病、高血压、冠心病等全身疾病史,否认药物过敏史。全身体检未发现异常。眼部检查:视力右眼0.8,左眼0.3,眼压右眼17 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),左眼15 mmHg,双眼结膜无充血,角膜透明,前房中等深度, KP(-),房水闪辉(-),瞳

孔等大正圆居中,直径为3.5 mm,直接间接对光反应灵敏。右眼晶状体皮质性混浊,左眼晶状体皮质性及后囊下混浊。复方托吡卡胺滴眼液[参天制药(中国)有限公司]扩瞳至7 mm后检查发现右眼晶状体前囊膜完整、光滑;左眼晶状体前囊膜中央区4 mm表面有透明玻璃纸样膜状物附着,一端与前囊膜连接,另一端卷曲游离于前房,随眼球转动而飘动(图1)。眼底检查:双眼视盘色泽正常,杯盘比为0.2,黄斑中心凹反射(+),