

· 实验研究 ·

雷帕霉素对缺氧损伤视网膜神经节细胞的保护作用及其机制

任静 秦波 邹畅 何靖 刘身文

510632 广州,暨南大学第一临床医学院眼科(任静);518040 深圳市眼科医院 暨南大学附属深圳眼科医院 深圳大学眼视光学院 深圳眼科学重点实验室 深圳眼外伤治疗与干细胞定向分化公共服务平台(秦波、何靖、刘身文);518000 深圳市人民医院临床研究中心(邹畅)

通信作者:秦波,Email:qinbozf@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.05.004

【摘要】 背景 研究表明雷帕霉素(Rapa)可延缓人大脑细胞的衰老,改善大鼠局灶性脑缺血时脑组织代谢活动,对中枢神经细胞具有保护作用。视神经和视网膜神经节细胞(RGCs)属于中枢神经组织,但 Rapa 是否可对外伤后 RGCs 具有保护作用尚不清楚。目的 探讨 Rapa 对氯化钴(CoCl_2)诱导的缺氧损伤大鼠 RGCs 的保护作用,并探讨其可能的作用机制,为外伤性视神经病变(TON)的治疗提供新的思路。方法 用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养大鼠 RGC-5 细胞,倒置相差显微镜下观察培养细胞的形态学变化。将细胞分为正常对照组及 50、100、200、400 和 600 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组,于细胞培养后 24 h 和 48 h 采用细胞生长分析系统检测各组细胞存活率。采用 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理细胞以诱导建立 RGC-5 细胞缺氧损伤模型,然后将培养的细胞分为正常对照组、模型对照组和不同浓度 Rapa 干预组,Rapa 干预组在缺氧模型细胞培养液中添加 Rapa 使其终浓度分别为 0.1、0.4、1.6 和 6.4 $\mu\text{mol/L}$,处理细胞 24 h。采用细胞生长分析系统检测各组细胞的存活率;采用 AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术检测各组细胞凋亡率;采用 JC-1 染色技术检测各组细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)的变化;采用实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞促凋亡基因 *bax* mRNA 的相对表达量。结果 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 RGC-5 细胞后 24 h 细胞相对存活率为 $(70.51 \pm 5.00)\%$,与正常对照组的 $(100.00 \pm 3.29)\%$ 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),成功构建细胞缺氧损伤模型。正常对照组、模型对照组和 0.1、0.4、1.6、6.4 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞存活率的总体比较差异有统计学意义($F = 167.904$, $P = 0.000$),其中 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞存活率明显高于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。正常对照组、模型对照组和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞凋亡率分别为 25.4%、37.7% 和 25.3%,细胞线粒体膜电位分别下降了 0.4%、6.3% 和 1.4%。正常对照组、模型对照组和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞中 *bax* mRNA 相对表达量分别为 1.01 ± 0.21 、 3.52 ± 0.30 和 1.66 ± 0.20 ,总体比较差异有统计学意义($F = 88.034$, $P = 0.000$),其中模型对照组细胞中 *bax* mRNA 相对表达量均明显高于正常对照组和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 Rapa 可对 CoCl_2 诱导的缺氧 RGC-5 细胞发挥保护作用,其主要作用机制是下调细胞中促凋亡分子 *bax* 的表达,并提高 RGC-5 细胞存活率。

【关键词】 雷帕霉素;视网膜神经节细胞;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;细胞凋亡

基金项目:深圳市知识创新计划基础研究项目(JCYJ20150402152130696)

Protective effect of rapamycin on hypoxia-injured retinal ganglion cells and its mechanism Ren Jing, Qin

Bo, Zou Chang, He Jing, Liu Shenwen

Department of Ophthalmology, The First Clinical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China (Ren J); Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Joint College of Optometry of Shenzhen University, Ophthalmic Key Laboratory of Shenzhen, Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation Public Service Platform of Shenzhen, Shenzhen 518040, China (Qin B, He J, Liu SW); People's Hospital of Shenzhen, Clinical Research Centre, Shenzhen 518000, China (Zou C)

Corresponding author: Qin Bo, Email: qinbozf@163.com

【Abstract】 **Background** Studies showed that rapamycin (Rapa) plays a protective effect on central nervous system by improving the aging of human brain tissue and ameliorating rat cerebral metabolism after ischemia. Optical nerve and retinal ganglion cells (RGCs) are central nerve, however, whether Rapa can protect hypoxia-injured RGCs is still unclear. **Objective** This study was to explore the protective role of Rapa on hypoxia RGC-5, a rat RGC line, and its underlying mechanism in order to provide a new strategy for the treatment of traumatic optic neuropathy. **Methods** Rat RGC-5 cells were cultured using DMEM with 10% fetal bovine serum, and the cells were observed

under the inverted phase contrast microscope. The cells were treated by 50, 100, 200, 400 and 600 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 for 24 hours and 48 hours, respectively, and Clone Select Imager was employed to assess the survival rate. The CoCl_2 -induced hypoxia cell models were established by adding 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 in the medium for 24 hours, and then the 0.1, 0.4, 1.6, 6.4 $\mu\text{mol/L}$ Rapa was used to treat the models for 24 hours in the Rapa intervention group, respectively. The cells cultured by DMEM with 10% fetal bovine serum served as the normal control group. The survival rate of the cells was evaluated by Clone Select Imager; the apoptotic rate of the cells was assayed by AnnexinV-FITC/PI double-staining flow cytometry; JC-1 probe was used to detect the mitochondrial trans-membrane potential, and the expression of bax mRNA in the cells was detected by real-time fluorescence quantitative PCR.

Results The survival rate of the cells was $(70.51 \pm 5.00)\%$ in the 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 -treated group, which was significantly lower than $(100.00 \pm 3.29)\%$ in the normal control group ($P < 0.01$). The survival rate of the cells was significantly different among the normal control group and 0.1, 0.4, 1.6, 6.4 $\mu\text{mol/L}$ Rapa intervention groups ($F = 167.904, P = 0.000$), and the survival rate was evidently higher in the 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa intervention group than that in the model control group ($P < 0.05$). The apoptotic rate was 25.4%, 37.7% and 25.3%, while mitochondrial trans-membrane potential reduced by 0.4%, 6.3% and 1.4% in the normal control group, model control group and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa intervention group, respectively. The relative expression of bax mRNA in the cells was 1.01 ± 0.21 , 3.52 ± 0.30 and 1.66 ± 0.20 in the normal control group, model control group and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa intervention group, showing a significant difference among the groups ($F = 88.034, P = 0.000$), and the relative expression of bax mRNA in the model control group was considerably elevated in comparison with the normal control group and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa intervention group (both at $P < 0.05$). **Conclusions** Rapa protects the RGC-5 cells against CoCl_2 -induced hypoxic damage primarily by down-regulating the expression of bax in the cells and improving the survival rate of RGC-5 cells *in vitro*.

[Key words] Rapamycin; Retinal ganglion cells; Mammalian target of rapamycin; Apoptosis

Fund program: the Basic Research Project of Knowledge Innovation Program in Shenzhen (JCYJ20150402152130696)

外伤性视神经病变 (traumatic optic neuropathy, TON) 常继发于头部钝伤或开放性外伤, 可导致视力严重下降或丧失, 尤其是在双侧视神经均受累的情况下^[1]。TON 常见治疗方法包括糖皮质激素治疗、手术治疗 (如视神经管减压术) 或药物与手术联合治疗, 但治疗后患者视功能改善并不理想, 因此寻找有效的治疗药物是目前相关研究的热点^[2]。雷帕霉素 (rapamycin, Rapa) 是新型大环内酯类免疫抑制药物, 近年来的研究表明其对中枢神经系统细胞具有保护作用, 低剂量 Rapa 可延缓脑老化过程^[3]。研究表明, Rapa 可影响局灶性脑缺血大鼠脑组织代谢活动, 并促进大鼠脊髓损伤后功能的修复等^[4-5]。视神经属于中枢神经系统的一部分, 视神经病变与脑组织病变可能有共同的发病机制和病理基础。视神经由视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 及其发出的轴突构成, RGCs 死亡是导致不可逆的视功能障碍的主要原因, 虽然已有较多研究证实 Rapa 对中枢神经系统的功能具有保护作用, 但 Rapa 在视神经损伤后对视功能的恢复是否可发挥促进作用鲜有报道。本研究拟探讨 Rapa 对 RGCs 的保护作用及可能机制, 为 TON 的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠 RGC-5 细胞株 (广州吉妮欧生物科技有限公司); Rapa (瑞士 Alexis 公司); 氯化钴 (CoCl_2) (美国 Sigma 公司); DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (上海 Excell Bio 公司); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) (南京凯基生物公司); Mini BEST Universal RNA Extraction Kit、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (日本 Takara 公司); SYBR Green qPCR master mix (日本 TOYOBO 公司)。CO₂ 培养箱 (德国 Labotect 公司); 超净工作台 (新加坡 ESCO 公司); 荧光倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司); 离心机 (美国 Thermo 公司); 细胞生长分析系统 (Clone Select Imager) (美国 Molecular Devices 公司); 分选型流式细胞仪 FACS Aria III (美国 Becton Dickinson 公司); CFX96 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RGC-5 细胞的培养 将大鼠 RGC-5 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂、湿度 90% 的培养箱。将 RGC-5 细胞以不同密度 (20 000、15 000、10 000、8 000、6 000、5 000、3 000、2 000、1 000 和 500/孔) 接种至 96 孔板, 倒置相差显微镜下观察不同时段细胞生长情况及形态变化并拍照。采用细胞生长分析系统检测细胞活力。

1.2.2 RGC-5 细胞缺氧模型的建立 将培养细胞分

为正常对照组(常规培养液培养)和不同浓度 CoCl_2 干预组, CoCl_2 干预组分别于培养液中添加 CoCl_2 使其终浓度分别为 50、100、200、400 和 600 $\mu\text{mol/L}$, 各组细胞均分别培养 24 h 和 48 h, 采用细胞生长分析系统检测各组细胞活力, 筛选 CoCl_2 有效作用浓度和最作用时间。每组设 3 个复孔。

1.2.3 筛选 Rapa 对缺氧 RGC-5 模型作用的最适剂量 根据 1.2.2 的结果用 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作为缺氧模型建立的最适浓度处理细胞 24 h 以建立缺氧细胞模型。将培养细胞分为正常对照组(常规培养液培养)、模型对照组和 Rapa 干预组, Rapa 干预组分别于缺氧模型组培养液中添加 Rapa 使其终浓度分别 0.1、0.4、1.6 和 6.4 $\mu\text{mol/L}$ 。各组细胞均培养 24 h, 采用细胞生长分析系统检测各组细胞活力, 确定 Rapa 最适浓度。每组设 3 个复孔。

1.2.4 细胞生长分析系统测定细胞存活率 本研究中采用细胞生长分析系统测定细胞的生长状况。采用细胞生长分析系统和配套计算机及其软件测定, 通过对微孔板中的贴壁细胞和沉降于微孔板底部的细胞快速拍照, 实现对细胞密度和细胞生长的监控, 估算细胞数目, 并进行单克隆验证以及细胞迁移分析。通过仪器的可视系统在 3 min 内对 6、12、48 和 96 孔培养板进行一次扫描; 通过扫描微孔板获取一系列微孔板视图, 直观呈现微孔板上每孔细胞生长变化情况, 并获取细胞融合度和细胞数目情况的数据, 根据导出的数据进行统计分析, 评估细胞增生或细胞毒性的效果。操作时先校准微孔板上细胞数目和细胞类型, 然后在此校准基础上对细胞进行计数, 采用无标记的白光成像对细胞融合率和细胞数目进行连续监测, 以评估细胞存活率。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡 依据 1.2.3 的结果, 将 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 作为后续实验最适剂量。将培养细胞分为正常对照组、模型对照组和 Rapa 干预组, 将 RGC-5 细胞以 20 000/孔的密度接种于 6 孔板中, 各组细胞培养 24 h, 用不含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化, 收集细胞; 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次 5 min; 离心半径 3 cm, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每组各收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞; 用去离子水配制 1 倍结合缓冲液。各组细胞中分别加入 500 μl 1 倍结合缓冲液悬浮细胞; 取 100 μl 细胞悬液于 5 ml 的流氏管中, 先加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后, 再加入 5 μl PI, 轻轻混匀; 室温下避光孵育 5 ~ 15 min; 于 1 h 内上机行流式细胞仪检测, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 530 nm。Annexin V 绿色荧光通过 FITC 通道检测, PI 红色荧光通过 PI 通道检测。使用

正常细胞作为对照行荧光补偿调节。细胞凋亡数为早期凋亡细胞(右下象限 Q4)与晚期凋亡细胞(右上象限 Q2)之和。

1.2.6 JC-1 荧光探针检测细胞线粒体膜电位的变化 将 RGC-5 细胞以 20 000/孔接种于 6 孔板中, 按 1.2.5 中的步骤进行干预和分组。收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次 5 min; 离心半径 3 cm, 2 000 r/min 离心 5 min; 用灭菌去离子水配制 1 倍孵化缓冲液, 混匀并预热至 37 $^{\circ}\text{C}$; 500 μl 1 倍孵化缓冲液中加入 1 μl JC-1, 混匀配成 JC-1 工作液; 取 500 μl JC-1 工作液将细胞轻轻吹打成混悬液, 于 CO_2 培养箱中孵育 15 ~ 20 min; 2 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 1 倍孵化缓冲液洗涤细胞 2 次; 用 500 μl 1 倍孵化缓冲液再次悬浮细胞; 用流式细胞仪(激发波长为 488 nm, 发射波长 530 nm)检测细胞凋亡比例, 绿色荧光通过 FL1 通道检测, 红色荧光通过 FL2 通道检测, 双变量流式细胞仪的散点图上, 右下象限 Q4 区的细胞为线粒体跨膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)下降的细胞比例。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 bax mRNA 的表达 按 1.2.5 步骤中的方法进行分组和干预, 各组细胞培养 24 h, 提取各组细胞中总 RNA, 将 mRNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 应用 SYBR Green 实时定量 PCR 法检测细胞中 bax mRNA 的表达。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环反应。内参为 β -actin。Bax 上游引物序列: 5'-CCCCACATGGCAGACAGT-3'; Bax 下游引物序列: 5'-CCAAGGCAGCAGGAAGC-3', 扩增片段长度为 97 bp。 β -actin 上游引物序列: 5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'; 下游引物序列: 5'-AACACAGCCTGGATGGCTAC-3', 扩增片段长度为 195 bp。反应结束后得到标本的扩增曲线和溶解曲线, 系统自动计算出每个反应管内的荧光信号达到荧光阈值所经历的循环数, 即 Ct 值。目的基因相对于内参表达的比例以 ΔCt 表示, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的}} - \text{Ct}_{\text{内参}}$, 用 $2^{-\Delta\text{Ct}} \pm s$ 值代表各组 bax mRNA 相对表达量。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计, 不同浓度 CoCl_2 组和不同浓度 Rapa 组细胞存活率的差异比较以及正常对照组、模型对照组和 Rapa 干预组间细胞中 bax mRNA 相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的形态学观察

细胞接种后 4 h 贴壁生长, 培养后 24 h 细胞呈扁平多边形, 呈单层排列, 边界清晰, 折光性好, 基本完全贴壁, 部分细胞可见短小的突起。培养后 30 h 细胞体积逐渐增大, 伸出突起, 相互连接, 快速聚集增长, 生长状态良好(图 1)。

2.2 各组细胞增生情况

细胞不同接种密度培养后 18 h 细胞汇合度情况见图 2。根据细胞形态学及细胞生长分析系统对细胞增生的测定结果, 96 孔板中 3 000 ~ 5 000/孔的细胞密

度为最适密度。培养 24 h 和 48 h 后各组 RGC-5 细胞的存活率总体比较差异有统计学意义(24 h: $F = 27.470, P = 0.000$; 48 h: $F = 161.584, P = 0.000$), 细胞活力下降呈浓度依赖性, 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用细胞后 24 h 细胞存活率均较正常对照组下降, 但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 200、400 和 600 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用后 24 h 细胞存活率明显下降, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。50、100、200、400 和 600 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用后 48 h 细胞存活率均明显低于正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用后 24 h 可作为构建细胞缺氧损伤模型的最适浓度(表 1)。

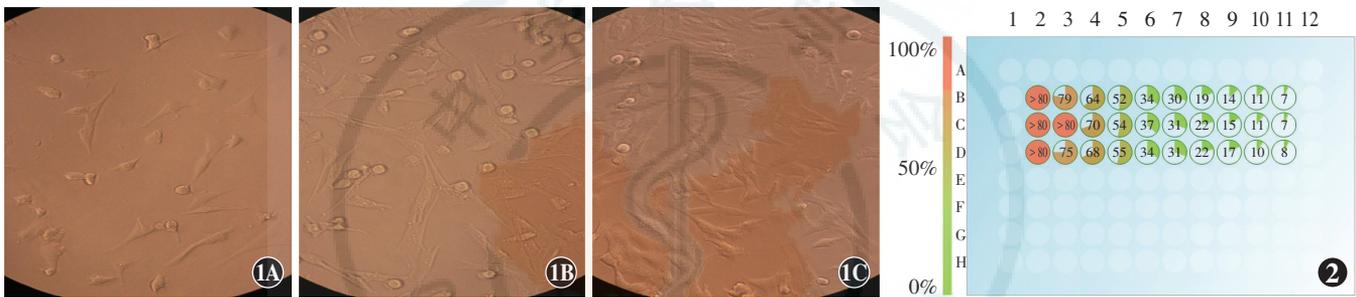


图 1 倒置相差显微镜下培养细胞的形态($\times 400$) A: 培养后 4 h 细胞呈贴壁生长 B: 培养后 24 h 细胞呈多边形 C: 培养后 30 h 可见细胞突起, 细胞间相互连接 图 2 细胞生长分析系统所得大鼠 RGC-5 细胞增生图 红色示高密度生长区, 绿色示低密度生长区, 1 ~ 12 代表设定的细胞密度

表 1 不同浓度 CoCl_2 作用后不同时间点细胞存活率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	不同时间点细胞存活率	
		24 h	48 h
正常对照组	3	100.00 \pm 3.29	100.00 \pm 2.77
50 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组	3	87.03 \pm 6.70	83.68 \pm 4.59 ^a
100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组	3	85.81 \pm 8.73	73.98 \pm 5.46 ^a
200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组	3	70.51 \pm 5.00 ^a	59.27 \pm 0.70 ^a
400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组	3	57.92 \pm 5.87 ^a	38.11 \pm 1.91 ^a
600 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组	3	56.11 \pm 3.37 ^a	35.45 \pm 3.23 ^a
F 值		27.470	161.584
P 值		0.000	0.000

注: 与同一时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验) CoCl_2 : 氯化钴

2.3 不同浓度 Rapa 作用后各组细胞的存活率

0.1、0.4、1.6 和 6.4 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组和模型对照组细胞存活率总体比较差异有统计学意义($F = 167.904, P = 0.000$), 不同浓度 Rapa 干预组和模型对照组细胞存活率均明显低于正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); 与模型对照组相比, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 6.4 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞的存活率明显下降, 1.6 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞的存活率无明显改变, 而 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞的存活率明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。0.1 $\mu\text{mol/L}$

Rapa 作为细胞凋亡检测的最适浓度(表 2)。

表 2 不同浓度 Rapa 作用后细胞存活率的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	细胞存活率
正常对照组	3	100.00 \pm 3.30
模型对照组	3	69.30 \pm 3.54 ^a
0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组	3	80.34 \pm 0.94 ^{ab}
0.4 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组	3	44.35 \pm 2.75 ^{ab}
1.6 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组	3	70.20 \pm 1.82 ^a
6.4 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组	3	59.08 \pm 1.74 ^{ab}
F 值		167.904
P 值		0.000

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验) Rapa: 雷帕霉素

2.4 各组细胞凋亡率的比较

正常对照组细胞凋亡率为 25.4%, 模型对照组细胞凋亡率为 37.7%, 高于正常对照组, 而 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞凋亡率为 25.3%, 低于模型对照组(图 3)。

2.5 各组细胞 $\Delta\Psi_m$ 的比较

正常对照组细胞 $\Delta\Psi_m$ 下降了 0.4%, 模型对照组细胞 $\Delta\Psi_m$ 下降了 6.3%, 其下降值高于正常对照组, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa 干预组细胞 $\Delta\Psi_m$ 下降了 1.4%, 下降值低于模型对照组(图 4)。

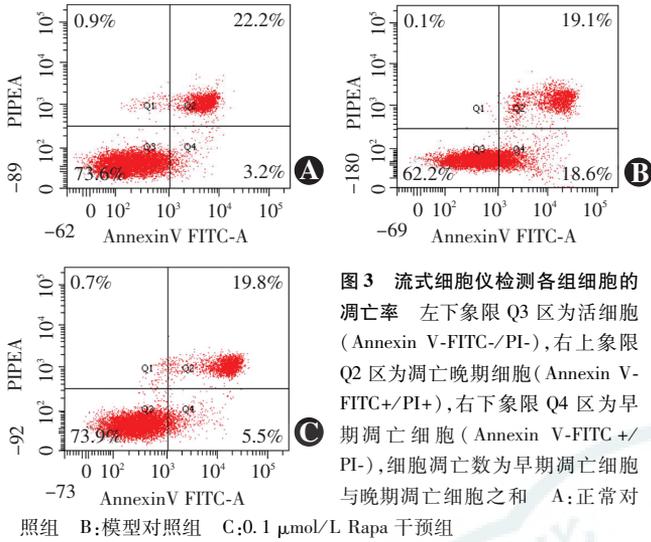


图 3 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率 左下象限 Q3 区为活细胞 (Annexin V-FITC-/PI-), 右上象限 Q2 区为凋亡晚期细胞 (Annexin V-FITC+/PI+), 右下象限 Q4 区为早期凋亡细胞 (Annexin V-FITC+/PI-), 细胞凋亡数为早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞之和 A: 正常对照组 B: 模型对照组 C: 0.1 μmol/L Rapa 干预组

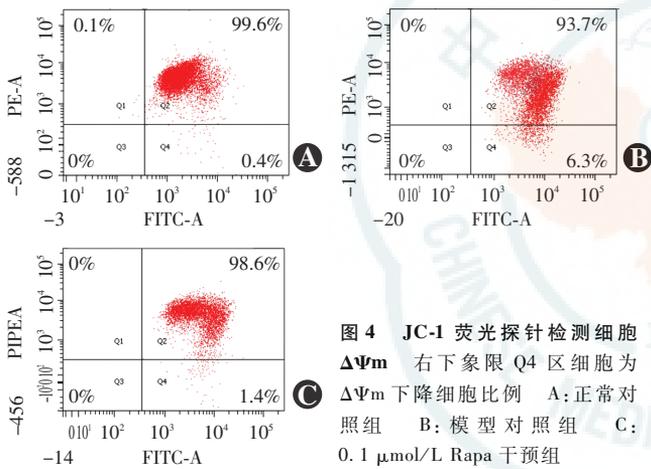


图 4 JC-1 荧光探针检测细胞 ΔΨm 右下象限 Q4 区细胞为 ΔΨm 下降细胞比例 A: 正常对照组 B: 模型对照组 C: 0.1 μmol/L Rapa 干预组

2.6 各组细胞中 bax mRNA 相对表达量的比较

正常对照组、模型对照组和 0.1 μmol/L Rapa 干预组细胞中 bax mRNA 的相对表达量分别为 1.01 ± 0.21, 3.52 ± 0.30 和 1.66 ± 0.20, 3 个组间总体比较差异有统计学意义 (F = 88.034, P = 0.000), 模型对照组细胞 bax mRNA 的相对表达量明显高于正常对照组和 0.1 μmol/L Rapa 干预组, 0.1 μmol/L Rapa 干预组也明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.01) (图 5)。

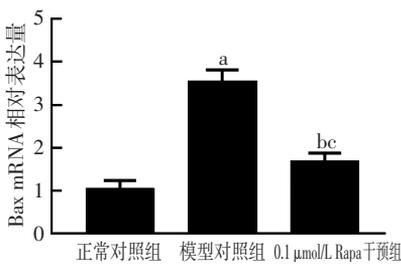


图 5 各组细胞中促凋亡分子 bax mRNA 的相对表达量 F = 88.034, P = 0.000. 与正常对照组比较, ^aP < 0.01, ^bP < 0.05; 与模型对照组比较, ^cP < 0.01 (单因素方差分析, Tukey 检验, n = 3) Rapa: 雷帕霉素

3 讨论

RGCs 的渐进性丢失是导致 TON 患者视功能损害的主要原因, 寻找预防或延迟 RGCs 损伤的药物是 TON 治疗的新策略。作为抗真菌药物, Rapa 最早被开发利用, 研究证实其有抗癌、抗移植排斥、洗脱药物支架及增强自噬等多种非抗生素的作用^[6-7]。Rapa 的多生物学特性归功于其特殊的作用靶点哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTORC) 1 的药理作用^[8]。Rapa 可结合细胞内 FKBP12 蛋白而抑制 mTORC1。mTORC1 是一种进化上相对保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞生长和分化中扮演重要角色^[9]。mTOR 信号通路是在中枢神经系统创伤性疾病中研究最多的信号通路, 作为经典的 mTOR 抑制剂, Rapa 通过增强自噬、抗炎及抑制细胞凋亡来实现对神经元的保护作用^[10-14], 但是其是否能够对创伤后的视神经发挥保护作用及其作用机制还不清楚。Rodríguezmuela 等^[15]研究发现, Rapa 通过抑制 mTOR 的增强自噬作用而对百草枯损伤的 RGC-5 细胞具有保护作用。Ichikawa 等^[16]报道 Rapa 减弱门冬氨酸 (N methyl D aspartate, NMDA) 导致的 RGCs 凋亡, 可能与 Rapa 抑制 mTOR 激活视网膜 Müller 细胞内 ERK 信号通路有关。也有研究报道活化 mTOR 可增强 RGCs 的存活, Rapa 反而加速 RGCs 的死亡。Zheng 等^[17]研究表明, 拉坦前列素通过前列腺素受体可激活 PI3K-Akt-mTOR 通路, 促进 RGC-5 细胞的存活, 而这种保护作用可被 mTOR 抑制剂 Rapa 所阻断。

外伤对视神经造成损伤的发病机制较为复杂, 本研究中选择用 CoCl₂ 构建体外 RGC-5 缺氧模型以模拟视神经损伤时缺血缺氧对 RGCs 造成的氧化应激损伤。结果显示, 缺氧模型细胞的存活率下降, 下降程度与 CoCl₂ 呈剂量和时间依赖性, 与 Tulsawani 等^[18]的研究结果基本一致。本研究中探索不同浓度 Rapa 对缺氧模型细胞存活率的影响, 发现 0.1 μmol/L Rapa 对缺氧模型细胞具有保护作用, 故将其用于探讨 Rapa 保护作用机制的研究。

视神经损伤包括原发性和继发性损伤, 继发性损伤在视神经损伤中扮演重要角色, 而 RGCs 凋亡是引起继发损伤的主要病理基础^[19], 因此减少 RGCs 凋亡是治疗 TON 的关键。本研究结果显示, Rapa 明显减少了缺氧模型细胞的凋亡, 表明 Rapa 能够对抗 CoCl₂ 引起的 RGC-5 损伤, 具有神经元保护作用。此外, 由于任何一种细胞凋亡检测方法都不是完美的, 单独采用某种方法会造成假阳性结果, 因此本研究中还选择

