

· 实验研究 ·

# 高糖对原代培养的视网膜神经节细胞中 Toll 样受体 4 表达的上调作用及其意义

胡丽丽 艾明 杨红霞 江双红

430060 武汉大学人民医院眼科中心

通信作者:艾明,Email:aiminghbwh@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.005

**【摘要】** 背景 研究发现糖尿病性视网膜神经病变的发生早于糖尿病视网膜病变(DR),视网膜神经节细胞(RGCs)的损伤是DR的早期特征性改变。研究表明,Toll样受体4(TLR4)在糖尿病大鼠视网膜中呈高表达,但TLR4与糖尿病性RGCs损伤的关系尚不明确。目的 研究高糖对原代培养的大鼠RGCs中TLR4表达的影响,为糖尿病性视网膜神经病变的预防和治疗以及靶向药物研究提供依据。方法 采用木瓜蛋白酶消化法从出生后1~3d的SPF级大鼠视网膜中分离RGCs并进行纯化培养,采用免疫荧光技术检测RGCs特异性标志物Brn3a的表达以鉴定培养的细胞。将培养的细胞分为正常对照组及10、20、30 mmol/L葡萄糖组,分别于不同浓度葡萄糖培养后24h及48h收集细胞,分别采用实时荧光定量PCR法和Western blot法测定RGCs中TLR4 mRNA及其蛋白的相对表达量。结果 细胞接种后贴壁生长并呈近圆形,纯化培养后24h细胞体积逐渐增大且呈聚集样岛状生长,可见突触和轴突。培养的细胞中Brn3a为阳性表达。葡萄糖培养后24h岛样细胞群周边细胞轮廓不清,反光弱,葡萄糖培养后48h部分细胞内结构消失,仅残留细胞轮廓,可见大量细胞碎片。细胞培养后24h,10、20和30 mmol/L葡萄糖组RGCs中TLR4 mRNA相对表达量分别为 $0.945 \pm 0.237$ 、 $1.180 \pm 0.193$ 和 $0.827 \pm 0.213$ ,培养后48h分别为 $1.509 \pm 0.422$ 、 $2.433 \pm 0.617$ 和 $1.435 \pm 0.410$ ,均明显高于正常对照组的 $0.600 \pm 0.099$ 和 $0.724 \pm 0.302$ ,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$ )。细胞培养后24h,10、20和30 mmol/L葡萄糖组RGCs中TLR4蛋白相对表达量分别为 $0.442 \pm 0.147$ 、 $0.626 \pm 0.128$ 和 $0.330 \pm 0.153$ ,培养后48h分别为 $0.464 \pm 0.121$ 、 $0.930 \pm 0.441$ 和 $0.394 \pm 0.158$ ,均明显高于正常对照组的 $0.090 \pm 0.050$ 和 $0.094 \pm 0.070$ ,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$ )。结论 高糖环境下大量体外培养的RGCs细胞内结构消失,同时细胞中TLR4表达量上调,提示RGCs中TLR4的过量表达可能与高糖诱导的RGCs损伤有关。

**【关键词】** 糖尿病视网膜病变; 视网膜神经节细胞/病理; 细胞死亡; Toll样受体4; 细胞培养; 葡萄糖/应用和剂量; 大鼠

基金项目:国家自然科学基金项目(81600722);湖北省医学临床研究中心项目(JX4D03)

## Regulation of high glucose to the expression of Toll-like receptor 4 in retinal ganglion cells and its significance

Hu Lili, Ai Ming, Yang Hongxia, Jiang Shuanghong

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

Corresponding author: Ai Ming, Email: aiminghbwh@163.com

**[Abstract]** **Background** Studies show that retinal neurodegeneration may precede retinal microvascular changes in diabetes mellitus. The apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs) is an early finding in retinal neurodegeneration. Toll-like receptor 4 (TLR4) is proved to be up-regulated in diabetic rats retina. However, the impact of TLR4 on RGCs damage in retinal neurodegeneration is poorly understood. **Objective** The aim of this study was to investigate the expressing change of TLR4 induced by high glucose in RGCs in order to offer a basis for the prevention diabetic retinal neurodegeneration and the study on targeting drugs. **Methods** RGCs were isolated and purified from the retinas of SPF SD rats aged postnatal 1-3 days by using papain digestion method and then were identified by immunofluorescence technology to detect the expression of Brn3a, a specific marker of RGCs. The cells were divided into normal control group and 10, 20, 30 mmol/L glucose groups. The expressions of TLR4 mRNA and

protein in the cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot analysis in 24 and 48 hours after addition of glucose. All procedures performed in studies were in accordance with the Association for National Institutes of Health (NIH) Statement for the Care and Use of Laboratory Animals recommendations. The protocol was approved by the Ethics Committee of Renmin Hospital of Wuhan University. Every effort was made to minimize animal discomfort and stress. **Results** The normal cells grew well with the shape of near roundness after inoculation. The cells were gradually enlarged and clustered with obvious axons and dendrites 24 hours after purifying. Brn3a showed the positive expression in cultured cells. At 24 hours and 48 hours after glucose culture, the cell structures were gradually invisible in most cells. The expressions of TLR4 mRNA in the cells were  $0.945 \pm 0.237$ ,  $1.180 \pm 0.193$  and  $0.827 \pm 0.213$  at 24 hours and  $1.509 \pm 0.422$ ,  $2.433 \pm 0.617$  and  $1.435 \pm 0.410$  at 48 hours after culture in the 10, 20 and 30 mmol/L glucose groups, respectively, which were significantly higher than  $0.600 \pm 0.099$  and  $0.724 \pm 0.302$  in the normal control group (all at  $P < 0.01$ ). The expressions of TLR4 protein in the cells were  $0.442 \pm 0.147$ ,  $0.626 \pm 0.128$  and  $0.330 \pm 0.153$  at 24 hours and  $0.464 \pm 0.121$ ,  $0.930 \pm 0.441$  and  $0.394 \pm 0.158$  at 48 hours after culture in the 10, 20 and 30 mmol/L glucose groups, respectively, which were significantly higher than  $0.090 \pm 0.050$  and  $0.094 \pm 0.070$  in the normal control group (all at  $P < 0.01$ ). **Conclusions** A large number of RGCs die in a high-glucose environment *in vitro*, meanwhile, the expression of TLR4 up-regulates in the cells, indicating that TLR4 maybe participate in the damage of RGCs induced by high glucose.

[**Key words**] Diabetic retinopathy; Retinal ganglion cells/pathology; Cell death; Toll-like receptor 4; Cells, cultured; Glucose/administration & dosage; Rats

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81600722); Clinical Research Center Project of Hubei Province of China (JX4D03)

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是世界范围内 50 岁以上人群的主要致盲眼病,严重影响糖尿病患者的生存质量,加重社会经济负担。长期以来,对于 DR 的研究多着重于视网膜微血管病变,并形成了相对完善的诊疗方案<sup>[1]</sup>。曾有研究表明糖尿病性视网膜神经病变的发生早于糖尿病视网膜微血管病变<sup>[2-4]</sup>,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的功能和形态异常是糖尿病性视网膜神经病变的早期表现<sup>[5-7]</sup>,但其机制尚未完全明了。研究表明,高糖可诱导体外培养的 RGCs 凋亡<sup>[8-10]</sup>,而 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 也被证实与视网膜缺血-再灌注损伤所致的 RGCs 凋亡有关<sup>[11]</sup>,而高糖诱导的 RGCs 凋亡是否与 TLR4 通路有关有待研究。本研究中观察高糖培养的 RGCs 中 TLR4 的表达变化,为探讨糖尿病患者 RGCs 的损伤机制和 DR 的防治靶点提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 出生后 1~3 d SPF 级 SD 大鼠[武汉大学实验动物中心提供,质量合格证:SCXK(鄂)2014-0004],雌雄不限。实验动物的饲养和使用遵循美国 NIH 的《实验动物管理及使用指南》。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMDM/F12 培养基、胎牛

血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司);5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、尿苷、D-葡萄糖、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、左旋谷氨酸、多聚赖氨酸(美国 Sigma 公司);木瓜蛋白酶(美国 Worthington Biochemical 公司);Trizol(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、SYBR Green PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);兔抗鼠 TLR4 一抗(BA1717,武汉博士德生物公司);兔抗鼠 GAPDH 一抗(ab37168,美国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(KPL 074-1506,美国 KPL 公司);山羊抗鼠 Brn3a 一抗(sc-31984,美国 Santa Cruz 公司);Cy3 标记驴抗山羊二抗(A0502,上海 Beyotime 公司);DAPI(上海 Biosharp 公司)。生物安全柜、细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司);实时荧光定量 PCR 仪、梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司);核酸蛋白检测仪(美国 Beckman 公司)。

### 1.2 大鼠 RGCs 的培养及鉴定

**1.2.1 大鼠 RGCs 的分离及培养** 参照文献[9-10, 12]中的方法分离大鼠 RGCs。SD 大鼠经体积分数 75% 乙醇消毒处理后颈椎脱臼法处死,无菌显微无齿镊钝性分离眼球,置于无菌 PBS 中漂洗去除血渍并转移至完全 DMEM/F12 中,解剖显微镜下用维纳斯剪沿角巩膜缘剪除角膜及眼前段组织,用显微有齿镊分离完整视网膜神经上皮层,转移至温育酶解液中,置于细

胞培养箱酶解 20 min。然后弃上清,完全 DMEM/F12 漂洗 3 次,加入完全 DMEM/F12,用玻璃试管轻轻敲打视网膜约 50 次制备细胞悬液,用锥虫蓝染色法评估细胞活力,400 目筛网过滤,用血细胞计数板进行细胞计数,用完全 DMEM/F12 将细胞悬液密度调整至  $10 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ ,接种至 6 孔板,每孔 2 ml,于倒置电子显微镜下观察各孔细胞浓度及贴壁情况。置于 37 °C、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中原代培养 24 h。取出 6 孔板,观察细胞生长及贴壁情况。5-FU 和尿苷混合储备液稀释 10 倍加入培养液,每孔 200  $\mu\text{l}$ ,置于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。取出 6 孔板,观察细胞呈长条状局部融合状态后弃去原培养基,37 °C 条件下 PBS 轻柔漂洗贴壁细胞,弃去 PBS,加入无糖完全 DMEM/F12,置于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。

**1.2.2 免疫荧光法检测细胞中 Brn3 的表达以鉴定培养的大鼠 RGCs** 细胞培养后 72 h 于超净工作台内,弃去原培养基,用预冷 PBS 洗 3 次,每次 5 min。质量分数 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。加 1 ml 破膜工作液,室温下孵育 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加体积分数 3% 过氧化氢溶液 1 ml,室温下避光孵育 20 min,弃 3% 过氧化氢溶液,加 PBS (pH 7.4) 在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。晾干后滴加一抗 Brn3a (1:50,用质量分数 5% BSA 稀释) 500  $\mu\text{l}$  覆盖贴壁细胞,4 °C 孵育过夜。加 PBS (pH 7.4) 在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。晾干后加 Cy3 标记的驴抗山羊二抗 (1:50,用 5% BSA 稀释) 1 ml 覆盖贴壁细胞,室温下孵育 50 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入非特异性 DAPI 1 ml,室温下孵育 5 min。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。滴加适量的抗荧光淬灭剂,荧光显微镜下观察。实验设置 2 个复孔,重复 3 次。

**1.2.3 高糖模型的建立及实验分组** 原代培养的 RGCs 连续培养 48 h 时换液并分为不同浓度葡萄糖组和正常对照组。正常对照组培养液中不加葡萄糖,葡萄糖组培养液中葡萄糖浓度分别为 10、20 和 30 mmol/L,分别于培养后 24 h 和 48 h,观察贴壁细胞状态。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测各组 RGCs 中 TLR4 mRNA 的表达** (1) 细胞总 RNA 的提取 分别于培养后 0、24 和 48 h 收集各组细胞,弃去原培养基, PBS 漂洗 1 次。每孔加入 Trizol 800  $\mu\text{l}$ ,无 RNA 酶枪头吹打数次。室温下放置 15 min。加入氯仿,每孔 160  $\mu\text{l}$ ,剧烈振荡 15 s,室温下放置 15 min,转移至 EP 管中,4 °C 条件下  $12\,000 \times g$  离心 15 min。样品分为底层的黄色有机相、上层的无色水相和中间层。将水相转移到

新 EP 管中,每管加入异丙醇 0.25 ml,室温下放置 10 min。4 °C 条件下  $12\,000 \times g$  离心 10 min,离心后见管底出现胶状沉淀,移去上清,每管加入 75% 乙醇 1 ml,4 °C 条件下  $12\,000 \times g$  离心 10 min,弃上清。室温放置待 RNA 沉淀干燥后每管加入 DEPC 水 10  $\mu\text{l}$ ,用无酶枪头吹打数次,55 ~ 60 °C 放置 10 min 使 RNA 溶解。(2) RNA 的纯度检测 用 756 型紫外分光光度计测定波长为 260 nm 和 280 nm 处的吸光度 (A),  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8 ~ 2.0 表明所提取的 RNA 蛋白污染少,纯度较高,可用于后续的逆转录反应。(3) 逆转录反应 按照逆转录试剂盒说明将提取的总 RNA 进行去除基因组 DNA 反应及逆转录反应,生成 cDNA。(4) SYBR Green 荧光定量 PCR 检测引物序列 应用 ABI 7500 (美国应用生物系统公司) 进行 PCR 反应,反应体系为 20  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 40 s,进行 40 个循环。在每个循环延伸步骤收集荧光信号,反应结束后根据测得样品的循环阈值 (Ct 值),以 GAPDH 作为内参照,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析目的基因的相对表达量。实验设置 2 个复孔,重复 5 次。各基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物信息	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
TLR4	NM019178	F: TGGCATCATCTTCATTGTCC	115
TLR4		R: CAGAGCATTGTCCTCCC	
GAPDH	NM017008.4	F: TTCCTACCCCAATGTATCCG	281
GAPDH		R: CATGAGGTCCACCACCTGTT	

注: TLR: Toll 样受体

**1.2.5 Western blot 法检测 TLR4 蛋白的表达水平**

(1) 细胞总蛋白的提取 分别于培养后 0、24 和 48 h 用 TBS 缓冲液润洗贴壁细胞 2 ~ 3 次,吸干残留液。加入适量细胞总蛋白提取试剂 (使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂) 于培养板裂解 3 ~ 5 min,晃动培养板使试剂与细胞充分接触。用细胞刮刀将细胞及试剂刮下并收集到 1.5 ml 离心管中。冰水浴 30 min,期间用枪头反复吹打,确保细胞完全裂解。4 °C 条件下  $12\,000 \text{ r}/\text{min}$  离心 5 min,收集上清。(2) 蛋白浓度定量 使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。(3) SDS-PAGE 电泳 分别取各组蛋白 40 mg,加入适量 5 倍蛋白上样缓冲液,95 ~ 100 °C 沸水浴 5 min。将样品加入聚丙烯酰胺凝胶点样孔中。按浓缩胶 80 V、分离胶 120 V 进行恒压电泳,至溴酚蓝到达胶板下沿。(4) 转膜及抗体孵育 200 mA 恒流转膜 2.5 h,将蛋白转印至 PVDF 膜。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;将转好的膜



置于质量分数 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。除去封闭液,用一抗稀释液稀释一抗(GAPDH 1:10 000, TLR4 1:500),将膜完全浸入一抗内 4 ℃ 过夜。回收一抗,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。TBST 稀释二抗(1:10 000),与膜共同置于培养皿中,室温下振荡孵育 30 min, TBST 室温下振荡洗膜 4 次,每次 5 min。(5) 化学发光检测并分析 滴加新鲜配制的 ECL 混合液到膜的蛋白面侧,暗室中曝光。根据不同的光强度调整曝光条件,显影、定影。将胶片进行扫描存档,AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标条带的吸光度(A)值。TLR4 蛋白相对表达量 =  $TLR4 A_{TLR4} / A_{GAPDH}$ 。实验设置 2 个复孔,重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件(美国 IBM SPSS 公司)进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组两因素干预多水平研究设计,正常对照组及 10、20、30 mmol/L

葡萄糖组细胞培养后 24 h 和 48 h RGCs 中 TLR4 mRNA 及其蛋白相对表达量的总体差异比较采用两因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 培养细胞的形态特征及鉴定

细胞接种后大部分贴壁,细胞呈近圆形,2 个细胞之间间隔 2~3 个细胞,偶见细胞突触。培养后 24 h 细胞体积增大,一端有钝圆形突起,可见细胞聚集生长呈孤岛状。细胞纯化培养后 24 h 可见多数细胞聚集生长且相互融合,各孤岛间相互连接,呈岛桥样分布,轮廓清晰,可见突触和轴突。用葡萄糖培养后 24 h,岛样细胞群的周边细胞轮廓不清,可见少量细胞碎片。用葡萄糖培养后 48 h,岛样细胞群中的周边细胞消失仅残留轮廓,可见大量细胞碎片(图 1)。免疫荧光染色结果显示,培养的细胞细胞核呈蓝色荧光,Brn3a 呈红色荧光(图 2)。

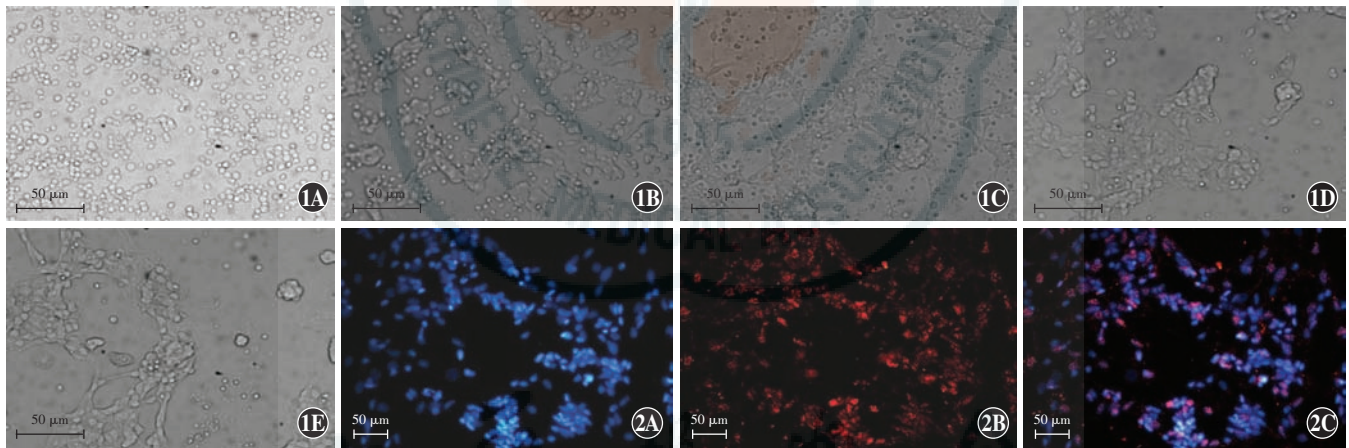


图 1 原代培养的 RGCs 细胞形态( $\times 400$ , 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) A: 细胞接种后立即观察可见大部分细胞贴壁,细胞呈近圆形 B: 细胞培养后 24 h 体积增大,部分细胞一端有钝圆形突起 C: 纯化培养后 24 h 细胞相互融合,呈岛桥样分布,可见突触和轴突结构 D: 20 mmol/L 葡萄糖培养后 48 h 岛样细胞群周边细胞轮廓不清,反光弱 E: 30 mmol/L 葡萄糖培养后 48 h,岛样细胞群的周边细胞反光消失,仅残留细胞轮廓,可见大量细胞碎片  
图 2 原代培养 RGCs 的免疫学鉴定( $\times 200$ , 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) A: DAPI 染色可见培养细胞的细胞核呈蓝色荧光 B: 培养的细胞中 Brn3a 为阳性表达,呈红色荧光 C: 图 A 和图 B 的融合图,可见大部分细胞呈红蓝双色着染

### 2.2 各组细胞中 TLR4 mRNA 的表达

正常对照组及 10、20、30 mmol/L 葡萄糖组细胞培养后 24 h 和 48 h, RGCs 中 TLR4 mRNA 相对表达量的总体比较差异有统计学意义( $F_{\text{时间}} = 45.914, P = 0.000; F_{\text{分组}} = 25.000, P = 0.000$ ); 细胞培养后 24 h, 10、20、30 mmol/L 葡萄糖组 RGCs 中 TLR4 mRNA 表达量明显高于正常对照组,差异均有统计学意义( $P = 0.001, 0.000, 0.018$ ); 细胞培养后 48 h, 10、20、30 mmol/L 葡萄糖组 RGCs 中 TLR4 mRNA 的表达量较正常对照组明显升高,差异均有统计学意义( $P =$

0.001, 0.000, 0.002)(表 1)。正常对照组细胞培养后 24 h 和 48 h, RGCs 中 TLR4 mRNA 的表达水平与培养后 0 h 比较差异均无统计学意义( $P = 0.334, 0.890$ ),培养后 24 h 与培养后 48 h RGCs 中 TLR4 mRNA 的表达量比较,差异无统计学意义( $P = 0.271$ ); 20 mmol/L 葡萄糖组细胞培养后 24 h 和 48 h, RGCs 中 TLR4 mRNA 表达量明显高于培养后 0 h, 培养后 48 h TLR4 mRNA 表达量明显高于培养后 24 h, 差异均有统计学意义( $P = 0.034, 0.000, 0.000$ )(表 2)。

**表 2 各组细胞培养不同时间点 RGCs 中 TLR4 mRNA 表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )**

组别	样本量	培养后不同时间点 TLR4 mRNA 表达量		
		0 h	24 h	48 h
正常对照组	9	0.708±0.246	0.600±0.099	0.724±0.302
10 mmol/L 葡萄糖组	9	0.707±0.275	0.945±0.237 <sup>a</sup>	1.509±0.422 <sup>a</sup>
20 mmol/L 葡萄糖组	9	0.730±0.353	1.180±0.193 <sup>a,c</sup>	2.433±0.617 <sup>d,e</sup>
30 mmol/L 葡萄糖组	9	0.742±0.269	0.827±0.213 <sup>b</sup>	1.435±0.410 <sup>a</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 25.000, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 45.914, P = 0.000$ 。与各自时间点正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自组内 0 h 比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 与各自组内 24 h 比较, <sup>e</sup> $P < 0.01$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) RGCs: 视网膜神经节细胞; TLR: Toll 样受体

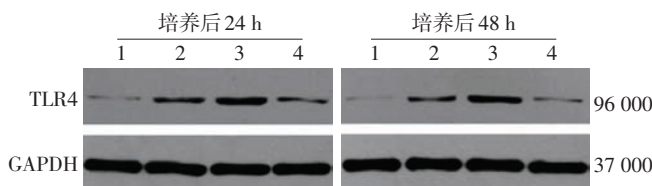
**表 3 各组细胞培养不同时间点 RGCs 中 TLR4 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, A$  值)**

组别	样本量	培养后不同时间点 TLR4 蛋白相对表达量		
		0 h	24 h	48 h
正常对照组	9	0.082±0.100	0.090±0.050	0.094±0.070
10 mmol/L 葡萄糖组	9	0.080±0.140	0.442±0.147	0.464±0.121
20 mmol/L 葡萄糖组	9	0.074±0.220	0.626±0.128	0.930±0.441
30 mmol/L 葡萄糖组	9	0.096±0.010	0.330±0.153	0.394±0.158

注:  $F_{\text{分组}} = 35.928, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 4.365, P = 0.040$ 。与各自组内 0 h 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与各自组内 24 h 比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与各自时间点正常对照组比较, <sup>d</sup> $P < 0.01$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) RGCs: 视网膜神经节细胞; TLR: Toll 样受体

### 2.3 各组 RGCs 中 TLR4 蛋白的表达

细胞培养后 24 h 和 48 h, 正常对照组 RGCs 中 TLR4 蛋白表达条带微弱, 10 mmol/L 葡萄糖组和 20 mmol/L 葡萄糖组 RGCs 中 TLR4 蛋白表达条带逐渐增强, 30 mmol/L 葡萄糖组 RGCs 中 TLR4 蛋白表达条带减弱, 但仍强于正常对照组 (图 3)。正常对照组及 10、20、30 mmol/L 葡萄糖组细胞培养后 24 h 和 48 h, RGCs 中 TLR4 蛋白相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 35.928, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 4.365, P = 0.040$ )。10、20、30 mmol/L 葡萄糖组培养后 24 h 和 48 h 细胞中 TLR4 蛋白表达量明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (24 h:  $P = 0.000, 0.000, 0.007$ ; 48 h:  $P = 0.000, 0.000, 0.002$ )。正常对照组细胞培养后 24 h 和 48 h, RGCs 中 TLR4 蛋白的表达水平与培养后 0 h 比较, 差异均无统计学意义 ( $P = 0.563, 0.462$ ), 培养后 48 h, 细胞中 TLR4 蛋白的表达水平差异无统计学意义 ( $P = 0.873$ ); 20 mmol/L 葡萄糖组细胞培养后 24 h 和 48 h, RGCs 中 TLR4 蛋白相对表达量明显高于培养后 0 h, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.014, 0.000$ ), 培养后 48 h, TLR4 蛋白相对表达量明显高于培养后 24 h, 差异有统计学意义 ( $P = 0.029$ ) (表 3)。



**图 3 Western blot 法检测各组细胞培养后不同时间点 RGCs 中 TLR4 蛋白表达量变化** 细胞培养后 24 h 和 48 h, 正常对照组 RGCs 中 TLR4 蛋白表达条带微弱, 10 mmol/L 和 20 mmol/L 葡萄糖组 RGCs 中 TLR4 蛋白表达条带逐渐增强, 30 mmol/L 葡萄糖组 RGCs 中 TLR4 蛋白表达条带减弱 1: 正常对照组 2: 10 mmol/L 葡萄糖组 3: 20 mmol/L 葡萄糖组 4: 30 mmol/L 葡萄糖组 TLR: Toll 样受体; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

### 3 讨论

长期以来, 对于糖尿病性视网膜微血管病变的发病机制及诊断治疗的研究一直是眼科防盲治盲工作的重点<sup>[13-14]</sup>。随着眼科诊疗技术的发展以及对 DR 研究的不断深入, 糖尿病患者早期视网膜神经元病变逐渐引起了人们的重视<sup>[15-16]</sup>。RGCs 是视觉细胞, 与视觉的形成和视觉信号传递密切相关<sup>[17-18]</sup>, 其退行性改变是早期糖尿病患者视力损伤的重要因素<sup>[19-20]</sup>。对于无明显糖尿病视网膜微血管病变且伴有视力损伤的糖尿病患者, 应及时进行眼的形态学和功能学检查, 如 OCT 和视网膜电图 (electroretinogram, ERG), 评估视网膜结构和功能的改变。有研究结果显示, 高糖可诱导原代培养的 RGCs 凋亡, 并伴有多种炎症因子表达的升高<sup>[8-9, 21]</sup>。

TLR4 是 TLR 受体超家族的一员, 属于 I 型跨膜蛋白<sup>[22]</sup>。TLR4 广泛分布于人体许多免疫细胞和非免疫细胞, 如单核细胞、淋巴细胞、角膜上皮细胞、微血管内皮细胞等以及多种神经元, 参与神经细胞生长的调节, 介导感染性及非感染性炎症反应<sup>[23-24]</sup>。实验研究表明, TLR4 表达于视网膜中并且与早期 DR 病理改变有关<sup>[25]</sup>, 但鲜有 TLR4 在高糖环境下原代培养 RGCs 中表达的报道。本研究从新生大鼠视网膜中分离 RGCs 并进行原代培养, 使用 5-FU 和尿苷混合液诱导非 RGCs 的细胞凋亡, 以实现 RGCs 的纯化培养, 经 DAPI 染色和 Brn3a 特异性免疫荧光标记鉴定证实纯化的细胞为 RGCs。

本研究结果发现, 10 ~ 30 mmol/L 葡萄糖可诱导原代培养的 RGCs 中 TLR4 表达量升高, 而以往的研究也表明, 高糖促进原代培养 RGCs 中 TLR4 的表达可能与高糖诱导的 RGCs 凋亡有关<sup>[1]</sup>, 均提示高糖环境下 RGCs 中 TLR4 表达上调可能促进 RGCs 的凋亡。本研究证实了高糖培养的 RGCs 中 TLR4 的表达变化, 但其

具体机制还有待进一步研究。本研究结果为抑制 TLR4 从而保护 DR 患者 RGCs 的靶向药物研究提供了细胞学基础,未来拟进行在体动物模型的相关实验工作,以进一步完善实验的维度。

## 参考文献

- [1] Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy [J]. *Lancet*, 2010,376(9735):124-136. DOI:10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
- [2] Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014,25(1):23-33. DOI:10.1016/j.tem.2013.09.005.
- [3] Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(19):2655-2664. DOI:10.1073/pnas.1522014113.
- [4] Carrasco E, Hernandez C, Miralles A, et al. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(11):2902-2908. DOI:10.2337/dc07-0332.
- [5] Kern TS, Barber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes [J]. *J Physiol*, 2008,586(18):4401-4408. DOI:10.1113/jphysiol.2008.156695.
- [6] El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, et al. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(1):235-244. DOI:10.2353/ajpath.2006.050500.
- [7] Parisi V, Uccioli L. Visual electrophysiological responses in persons with type 1 diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2001, 17(1):12-18.
- [8] Cao Y, Wang L, Zhao J, et al. Serum response factor protects retinal ganglion cells against high-glucose damage [J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 59(2):232-240. DOI:10.1007/s12031-015-0708-1.
- [9] Cao Y, Li X, Wang CJ, et al. Role of NF-E2-related factor 2 in neuroprotective effect of L-carnitine against high glucose-induced oxidative stress in the retinal ganglion cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015,69:345-348. DOI:10.1016/j.biopha.2014.12.030.
- [10] Wang Y, Zhang H, Liu Y, et al. Erythropoietin (EPO) protects against high glucose-induced apoptosis in retinal ganglionic cells [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015,71(2):749-755. DOI:10.1007/s12013-014-0259-z.
- [11] Qi Y, Zhao M, Bai Y, et al. Retinal ischemia/reperfusion injury is mediated by Toll-like receptor 4 activation of NLRP3 inflammasomes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014,55(9):5466-5475. DOI:10.1167/iovs.14-14380.
- [12] Tsutsumi T, Iwao K, Hayashi H, et al. Potential neuroprotective effects of an LSD1 inhibitor in retinal ganglion cells via p38 MAPK activity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016,57(14):6461-6473. DOI:10.1167/iovs.16-19494.
- [13] Yu Y, Chen H, Su SB. Neuroinflammatory responses in diabetic retinopathy [J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12:141 [2016-12-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527131/>. DOI:10.1186/s12974-015-0368-7.
- [14] Aiello LP, Sun W, Das A, et al. Intensive diabetes therapy and ocular surgery in type 1 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(18):1722-1733. DOI:10.1056/NEJMoal409463.
- [15] Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease [J]. *Diabetes*, 2006, 55(9):2401-2411. DOI:10.2337/db05-1635.
- [16] Simo R, Hernandez C. Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(10):1285-1290. DOI:10.1136/bjophthalmol-2012-302005.
- [17] Mead B, Tomarev S. Evaluating retinal ganglion cell loss and dysfunction [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 151:96-106. DOI:10.1016/j.exer.2016.08.006.
- [18] Ghita AM, Parvu D, Sava R, et al. Electrophysiological changes in optic neuropathy of streptozotocin induced diabetic rats [J]. *J Med Life*, 2013,6(3):340-348.
- [19] Zhang X, Wang N, Barile GR, et al. Diabetic retinopathy: neuron protection as a therapeutic target [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(7):1525-1529. DOI:10.1016/j.biocel.2013.03.002.
- [20] Li Q, Zemel E, Miller B, et al. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations [J]. *Exp Eye Res*, 2002,74(5):615-625. DOI:10.1006/exer.2002.1170.
- [21] Cao Y, Li X, Shi P, et al. Effects of L-carnitine on high glucose-induced oxidative stress in retinal ganglion cells [J]. *Pharmacology*, 2014, 94(3-4):123-130. DOI:10.1159/000363062.
- [22] Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, et al. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 79(1):34-41. DOI:10.1124/mol.110.068064.
- [23] Zhao H, Zhang J, Yu J. HMGB-1 as a potential target for the treatment of diabetic retinopathy [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21:3062-3067. DOI:10.12659/MSM.894453.
- [24] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(8):675-680. DOI:10.1038/90609.
- [25] Wang YL, Wang K, Yu SJ, et al. Association of the TLR4 signaling pathway in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 253(3):389-398. DOI:10.1007/s00417-014-2832-y.

(收稿日期:2017-04-14)

(本文编辑:尹卫靖)

## 消息

### 2017 郑州·中国眼底病论坛·全国眼底病继续医学教育学习班通知(第一轮)

由河南省立眼科医院(河南省眼科研究所 河南省人民医院眼科)承办的“中国眼底病论坛·全国眼底病继续医学教育学习班”[项目编号:2017-07-02-260(国)]将于2017年8月9-14日在河南省郑州市举办。本届学习班由中国国际科技会议中心主办,中华医学会眼科学分会眼底病学组、北京星辰黄斑病公益基金会、中华眼底病杂志及中华实验眼科杂志协办。学习班授课老师主要为眼底病学组组长及委员,均为国内眼底病学界知名专家或学科带头人,授课内容精彩纷呈,课程设置涵盖眼底病的基本概念、常规检查和常见病多发病的诊断治疗,并且将为学员安排动物眼实训操作以及现场直播玻璃体视网膜手术。学习班结束后将颁发国家级继续医学教育学分证书(I类10分)。欢迎有意参加学习的眼科同道登陆中国眼底病论坛官网(网址:www.cofds.org)或登录河南省立眼科医院官网(网址:www.eyehospitalhn.com),填写注册表后发送至指定邮箱 zhouzhongqiang110@126.com,联系人:周钟强 电话:18768856970。报名截止日期:2017年8月2日。