

# 缺氧对视网膜 Müller 细胞水通道蛋白 4 表达的影响

陈迪 张秀茹 倪劲松

**【摘要】** 目的 观察体外培养兔视网膜 Müller 细胞在缺氧条件下水通道蛋白 4(AQP4)表达的变化。方法 本实验以体外培养的兔视网膜 Müller 细胞为研究对象,选定不同缺氧时间体外培养 Müller,并采用 AO/EB 染色检测 Müller 细胞的凋亡情况,根据细胞凋亡情况选定最适缺氧时间进行检测,利用免疫细胞化学染色、流式细胞术及 RT-PCR 的方法对实验组细胞 AQP4 的表达进行定性及定量测定。结果 Müller 细胞缺氧 24 h 为缺氧最大耐受时间。缺氧组 Müller 细胞 AQP4 表达明显低于正常对照组;流式细胞仪检测中波峰位置明显提前,AQP4 表达减少;RT-PCR 半定量分析显示:AQP4 mRNA 的表达比对照组明显降低( $P < 0.01$ )。结论 缺氧使体外培养兔视网膜 Müller 细胞 AQP4 表达下调,缺氧可能影响细胞代谢变化,引起  $K^+$  外流。

**【关键词】** 缺氧; 水通道蛋白 4; Müller 细胞

**Effect of hypoxia on AQP4 expression of retina Müller cell culture *in vitro*** CHEN Di,ZHANG Xiu-ru,NI Jin-song. Department of Pathology,Aerospace Center Hospital,Beijing 100049,China  
Corresponding author:NI Jin-song,Email:nijinsong168@hotmail.com

**【Abstract】** **Objective** To observe the effects of hypoxia on AQP4 expression of retina Müller cell. **Methods** The rabbits' retinal Müller cells were cultured *in vitro* by different hypoxia time. We detected the apoptotic Müller cell by AO/EB stain after hypoxia culture, and select the proper experimentic group. We detected AQP4 expression by immunocytochemical staining, FACS and RT-PCR. **Results** The best suit hypoxia time was 24 h. Green fluorescence of Müller cells/AQP4 expression in hypoxia group was weaker than the natural control group. FACS indicated the position of wave crest advanced obviously and AQP4 expression decreased. RT-PCR results: AQP4 mRNA expression was weaker than the expression in the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Hypoxia could decrease AQP4 expression of cultured retinal Müller cells, the possible mechanism is the change of cellular metabolism by hypoxia, which caused  $K^+$  flow-out.

**【Key words】** Hypoxia; Aquaporin 4; Müller cells

缺氧可导致组织的代谢、功能和形态结构发生异常变化。在我国,糖尿病的发病率很高,其并发症之一的糖尿病视网膜病变最终会引起患者失明。糖尿病视网膜病变的发病机制即为血管失调,引起视网膜的缺血缺氧,最终导致失明。视网膜 Müller 细胞是一种特化的神经胶质细胞,对缺氧反应敏感,缺氧可导致 Müller 细胞肿胀、死亡<sup>[1]</sup>。水通道蛋白(AQPs)是介导水转运的专一性通道蛋白,目前共发现了哺乳动物体内 AQPs 有 13 种成员(AQP 0~12),可表达于不同的组织和器官,其在多种器官中对水的跨膜转运进行调节<sup>[2]</sup>。研究表明<sup>[3]</sup>,AQP4 在眼内组织分布广泛,从视

网膜内界膜到外界膜均有表达,主要定位在视网膜 Müller 细胞。其主要作用是参与视觉活动,同时参与  $K^+$  的虹吸<sup>[4]</sup>。目前关于 AQP4 在 Müller 细胞表达方面的研究报道较多,但尚未见缺氧对其表达影响的报道。本实验研究了不同缺氧条件对体外培养兔视网膜 Müller 细胞 AQP4 表达的影响,揭示了 Müller 细胞分泌 AQP4 在糖尿病视网膜病变发生发展中的作用,为糖尿病视网膜病变的预防和治疗提供理论依据。

## 材料与方 法

1. 材料及试剂:成年大耳白兔由吉林大学基础医学院实验动物中心提供。H-DMEM 培养液(Gibco 公司);AO/EB 染料(鼎国公司);生物素标记羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记卵白素(SP 试剂盒,博士德公司);鼠抗兔神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)(博士德公

司,稀释度 1:100);DAB 显色剂(迈新公司);多克隆 AQP4 抗体(美国旧金山医学院助理教授杨宝学博士惠赠);RT-PCR 检测试剂盒购于沈阳联星公司。

2. Müller 细胞原代培养:采用组织块悬浮法培养<sup>[5]</sup>,无菌取出兔眼球,沿锯齿缘后约 1 mm 处环行剖开眼球,去除晶状体和玻璃体,留后半眼球壁置于改良 H-DMEM 培养液中剥离视网膜,将其撕碎成 1 mm × 1 mm 小碎片。加足量的 DMEM 培养液,置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 孵箱。经过 2 周,细胞从组织块周边爬出,达到 80% 融合可进行传代培养。

3. 细胞鉴定:免疫细胞化学染色:将处理过的盖玻片放入 24 孔培养板,取融合生长的第 2 代细胞玻片,待细胞生长达 80% 融合时,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断 20 min,正常山羊血清封闭 20 min,加鼠抗兔神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP),对照组加 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2),4 °C 过夜, PBS 洗脱,分别加生物素标记羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记卵白素, DAB 显色,细胞质呈棕色为阳性。

4. 实验分组:第 2 代细胞爬片后,3 d 左右细胞达到 80% 融合时,换无血清培养液培养 24 h,放入低氧培养箱分别培养 3、6、12、24、48、72 h 作为实验组,正常对照组置正常 CO<sub>2</sub> 孵箱培养相同时间。

5. AO/EB 染色检测 Müller 细胞在缺氧条件下细胞凋亡情况:取实验组和对照组细胞,0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 漂洗两遍,加入 AO/EB 染料,490 nm 激发波长的荧光显微镜下观察细胞形态并计数。根据实验结果判定 Müller 细胞的最适缺氧时间,此时间段的细胞作为接下来 AQP4 研究的实验组。

6. AQP4 免疫荧光染色:一抗为羊抗兔多克隆 AQP4 抗体,二抗为 FITC 标记鼠抗羊荧光素,加二抗后孵育 30 min, PBS 洗脱,甘油封片,其余步骤同细胞鉴定。细胞质显示绿色荧光为阳性。

7. 流式细胞仪测定 AQP4 的表达:分别取实验组和对照组细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,离心,弃上清;4% 多聚甲醛固定,4 °C,30 min;加入羊抗兔 AQP4 多克隆抗体孵育,4 °C,30 min。PBS 洗一次加入 1:10 稀释 FITC 鼠抗羊荧光素;0.5 ml PBS 重新悬浮细胞,流式细胞仪检测。结果判定,将阳性细胞数设为 P1,阳性率通过流式细胞仪计算峰值,通过峰值位置观察阳性率的高低。

8. RT-PCR 检测:按 RT-PCR 试剂盒说明操作,退火温度为 72 °C,2 min。内参照:兔 β-actin 上游引物:5'-ACCCACACGGTGTCCATCT-3',下游引物:5'-GCTCGTTGCCGATGTTGAT-3'。兔 AQP4 上游引物:5'-CGGACTGATGTCCTGGTTC-3',下游引物:5'-

GGTCTTTCCCTTCTTCTCC-3'。结果判定:条带亮度通过凝胶成像系统分析,强度绘制曲线。

9. 统计学分析:数据采用 SPSS 10.0 软件处理,结果用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 *t* 检验方法进行统计学分析,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 结 果

1. Müller 细胞的鉴定:(1) HE 染色:见胞体呈长梭形,胞质丰富,胞核位于胞体中央,椭圆形,染色淡,2 个或 2 个以上核仁(图 1)。

(2) 免疫细胞化学染色:GFAP 免疫细胞化学染色鉴定原代培养细胞,80% 以上为阳性细胞,表现为胞质内出现棕黄色的丝网状结构。传代后 1 周左右细胞融合,具有原代细胞相似的细胞形态,GFAP 鉴定 90% 以上为阳性细胞(图 2)。

2. AO/EB 染色检测细胞凋亡:正常对照组大部分细胞形态结构正常,呈黄色荧光;缺氧 3 h,个别细胞形态结构发生变化,并且核染色质出现橘红色荧光,提示出现早期凋亡细胞,随着缺氧时间的延长,凋亡细胞逐渐增多。缺氧 48 h 凋亡细胞达到 23%,细胞凋亡率大于 20% 说明细胞凋亡明显,因此我们认为 24 h 是 Müller 细胞所能承受的最适缺氧时间,选择缺氧 24 h 进行 AQP4 的实验研究。

3. 缺氧条件下 Müller 细胞 AQP4 免疫荧光染色结果:正常对照组 Müller 细胞 AQP4 呈阳性表达,呈现较强绿色荧光;缺氧条件下 Müller 细胞 AQP4 的表达比正常对照组明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ) (图 3,4,表 1)。

表 1 不同缺氧条件下培养 Müller 细胞 AQP4 表达结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	检测方法	
	免疫荧光	流式细胞仪
正常对照组	175.6 ± 0.7	950 ± 3.6
缺氧 24 h 组	159.8 ± 7.1 <sup>a</sup>	395 ± 7.4 <sup>a</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$

4. 流式细胞仪检测缺氧条件下 AQP4 在 Müller 细胞的表达结果:实验组波峰在荧光强度 380 nm 的位置,正常对照组波峰在荧光强度 950 nm 的位置,峰值明显提前( $P < 0.01$ ) (图 5,6,表 1)。

5. RT-PCR 检测缺氧条件下 AQP4 在 Müller 细胞的表达结果:RT-PCR 半定量结果显示,缺氧条件下 AQP4 mRNA 表达(灰度值为 63.7 ± 4.2)比对照组(灰度值为 99.5 ± 3.7)明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ) (图 7)。



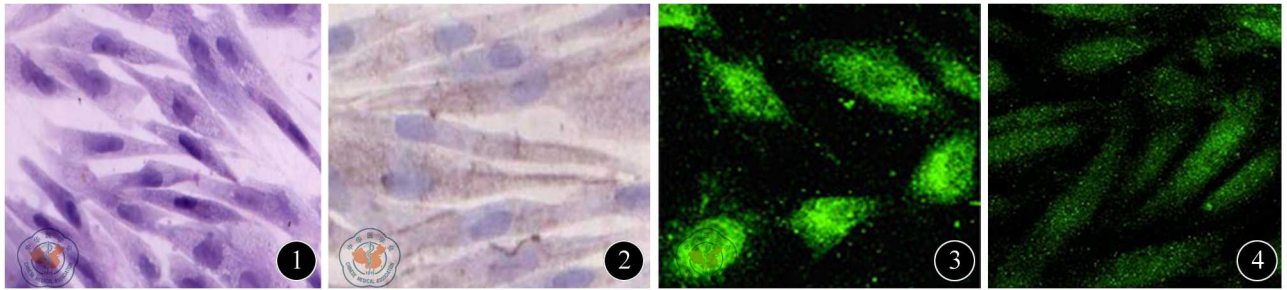


图1 Müller细胞(HE ×400) 图2 Müller细胞GFAP表达(免疫组织化学染色 ×400) 图3 正常对照组Müller细胞AQP4(免疫荧光染色 ×400) 图4 缺氧24 h组Müller 细胞AQP4(免疫荧光染色 ×400)

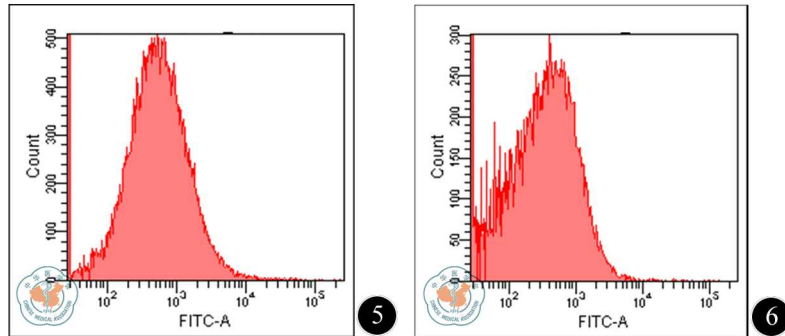


图5 正常对照组Müller 细胞AQP4流式细胞仪结果 图6 缺氧24 h组Müller 细胞AQP4流式细胞仪结果

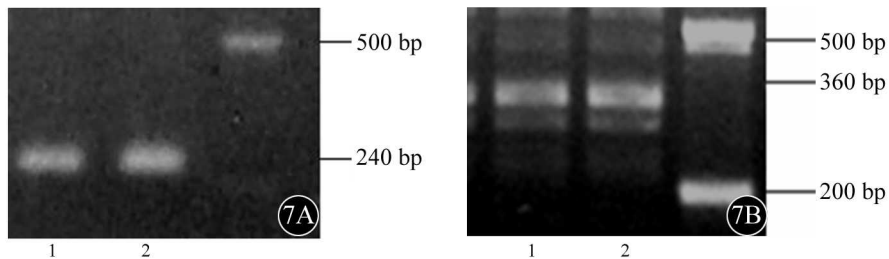


图7 RT-PCR检测Müller细胞AQP4的表达。7A: β-actin mRNA; 7B: AQP4 mRNA。注: 1. 缺氧24 h组; 2. 正常组

## 讨 论

糖尿病视网膜病变是常见且严重的糖尿病微血管并发症,据统计,在糖尿病患者中糖尿病视网膜病变的发生率可高达70%。视网膜Müller细胞是一种特化的神经胶质细胞,作为视网膜主要的营养和支持细胞,具有维持视网膜的正常结构,参与调节神经突触传递,构成血-视网膜屏障等多种生理功能,而且参与视网膜的多种病理生理过程。视网膜组织对缺氧非常敏感,许多视网膜病变是由于组织急性或慢性缺血缺氧所致。AQP4最早在1994年由Yamauchi等<sup>[6]</sup>从大鼠肺中克隆出来,广泛存在于哺乳动物体内,主要分布于肺、脑、眼等组织内,在眼部主要分布于睫状体无色素上皮和视网膜。AQP4的功能是调节细胞内外水分的平衡及水分转运相关的各项生理活动,参与调节细胞外间隙大小以及细胞外间隙中的K<sup>+</sup>浓度<sup>[7-8]</sup>。因此观察AQP4在缺氧条件下视网膜Müller细胞中表达的变化,

将进一步探讨缺氧时视网膜的病理反应及发病机制提供实验依据。

本实验首先通过AO/EB染色检测细胞在缺氧条件下的凋亡情况,结果显示随着缺氧时间的延长,凋亡细胞逐渐增多。我们选择凋亡细胞20%以下的缺氧时间(48 h以内)作为研究对象,确保了缺氧条件下一定的活细胞数量,从而排除了过多的细胞凋亡因素对实验结果的影响。我们又采用体外培养的Müller细胞作为模型,运用低流量持续缺氧(5% O<sub>2</sub>、95% CO<sub>2</sub>)模拟糖尿病视网膜慢性缺氧时的体内环境,观察了AQP4在Müller细胞缺氧24 h条件下的表达变化。结果显示,缺氧可以诱导Müller细胞AQP4的表达下降。Amiry等研究表明成年鼠脑短暂缺血后3 h,小血管周围和胶质细胞末端足突AQP4明显减少,这种减少与缺血中心严重的血管周围水肿有关。Manley等对AQP4基因敲除的小鼠进行脑缺血实验研究发现,敲除AQP4基因鼠缺血后脑水肿减轻,神经功能缺陷程度也减轻。Verk-

erman 等对视网膜缺血再灌注小鼠的 Müller 细胞 AQP4 基因敲除实验研究也表明, AQP4 基因敲除可以减少细胞水通透性和  $K^+$  转运, 从而降低细胞膨胀, 对视网膜是一种神经保护作用。本实验结果显示缺氧 24 h 时, AQP4 的表达随着缺氧时间的延长逐渐降低, 其机制可能是由于视网膜缺血缺氧引起 Müller 细胞谷氨酸盐释放、水和离子转运障碍, 细胞去极化, 丢失大部分  $K^+$  到细胞外间隙, 导致细胞外高  $K^+$ ; 由于  $K^+$  通道和 AQP4 同时存在于  $K^+$  传导较高的细胞膜区域, 提示 AQP4 介导水转运可能伴有  $K^+$  流出, 参与 Müller 细胞  $K^+$  虹吸作用, 通过足突将过多的  $K^+$  泵入细胞, 并伴有水从细胞内外流, 以代偿渗透性的改变。另一方面, 缺氧可能通过细胞间隙  $K^+$ 、 $H^+$  及谷氨酰胺等兴奋性氨基酸浓度上升, 从而激活 Müller 细胞 PKC, AQP4 发生磷酸化反应, 使其生物活性降低。可见, 缺氧条件下 AQP4 在 Müller 细胞表达下降是机体对视网膜损伤的一种保护性反应, 以达到减轻缺血-视网膜损伤和视网膜水肿的目的。本实验探讨了 AQP4 在缺氧条件下的表达变化及可能的作用机制, 从而为临床防治糖尿病视网膜病提供了一定的理论和实验依据。

#### 参 考 文 献

[1] Cbaranjit K, Viswanatban S, Wallace SF, et al. Cellular and vascular

changes in the retina of neonatal rats after an acute exposure to hypoxia. *IOVS*, 2009, 50:5364-5374.

- [2] Lin K, Nagase H, Huang CG, et al. Purification and functional characterization of aquaporin28. *Biol Cell*, 2006, 98:153-161.
- [3] Zhao M, Bousequet E, Valamanesh F, et al. Differential regulation of AQP4 and Kir4.1 by triamcinolone acetonide and dexamethasone in the healthy and inflamed retina. *Inv Ophthalmol*, 2011, 52:6340-6347.
- [4] Rutkowsky JM, Wallace BK, Wise PM, et al. Effects of estradiol on ischemic factor-induced astrocyte swelling and AQP4 protein abundance. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301:C204-212.
- [5] 王越辉, 宋鄂. 兔视网膜 Müller 细胞的原代培养. *吉林大学学报: 医学版*, 2003, 29:367-369.
- [6] Yamauchi Y, Watanabe T, Hinakata A, et al. Localization and ontogeny of aquaporin-1 and -4 expression in iris and ciliary epithelial cells in rats. *Cell Tissue Res*, 2006, 325:101-109.
- [7] Nemeth-Cahalan KL, Kalman K, Hall JE. Molecular basis of pH and  $Ca^{2+}$  regulation of aquaporin water permeability. *J Gen Physiol*, 2004, 123:573-580.
- [8] Ruiz-Ederra J, Zhang H, Verkman AS. Evidence against functional interaction between Aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Müller cells. *J Biol Chem*, 2007, 282:21866-21877.

(收稿日期:2011-08-26)

(本文编辑:戚红丹)

陈迪, 张秀茹, 倪劲松. 缺氧对视网膜 Müller 细胞水通道蛋白 4 表达的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(8):2095-2098.

中 华 医 学 会