

MK-801 对大鼠慢性高眼压视网膜神经节细胞的保护作用

李琳玲, 冯敏

基金项目: 中国十堰市科技局 2008 年资助项目
作者单位: (442000) 中国湖北省十堰市, 湖北医药学院附属太和医院眼科
作者简介: 李琳玲, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 青光眼、眼眶整形。
通讯作者: 李琳玲. lilinling2009@sina.com
收稿日期: 2012-03-02 修回日期: 2012-04-09

Protective effect of MK-801 on retinal ganglion cells of chronic ocular hypertension rats

Lin-Ling Li, Min Feng

Foundation item: 2008 Shiyan Municipal Science and Technology Bureau Project

Department of Ophthalmology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Lin-Ling Li. Department of Ophthalmology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China. lilinling2009@sina.com

Received: 2012-03-02 Accepted: 2012-04-09

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of MK-801 on retinal ganglion cells (RGC) of SD rats with chronic ocular hypertension.

• **METHODS:** To prepare chronic ocular hypertension model of SD rats, 36 SD rats were randomly divided into 3 groups: blank control group, chronic elevated intraocular pressure + saline control group, chronic elevated intraocular pressure + MK-801 treatment group ($n = 12$). The glutamate acid content, retinal thickness and the inner layer thickness, number of retinal ganglion cell, retinal ganglion cell apoptosis of each group were observed and compared at different time points (1 day, 4, 7 and 10 days after treatment).

• **RESULTS:** Retinal glutamate acid levels increased ($P < 0.05$) in SD rats with chronic elevated intraocular pressure and those in MK-801 treatment group were significantly lower than the same period in normal saline control group ($P < 0.05$). HE staining showed that retinal thickness and the inner layer thickness of MK-801 treatment group and blank control group were greater than the saline control group ($P < 0.05$), the numbers of RGC were higher than the saline control group ($P < 0.05$). The positive expression of apoptotic RGC in MK-801 treated group were less than the saline control group.

• **CONCLUSION:** MK-801 could protect the RGC of chronic elevated intraocular pressure by blocking the glutamate-

mediated neurotoxicity.

• **KEYWORDS:** MK-801; retinal ganglion cells; chronic ocular hypertension

Li LL, Feng M. Protective effect of MK-801 on retinal ganglion cells of chronic ocular hypertension rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12(5): 823-825

摘要

目的: 探讨 MK-801 对大鼠慢性高眼压视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGC) 的保护作用。

方法: 制备 SD 大鼠慢性高眼压模型, 36 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、慢性高眼压+生理盐水对照组、慢性高眼压+MK-801 处理组, 各组 12 只。观察并比较各组大鼠在不同时间点 (处理后 1, 4, 7 和 10d) 谷氨酸含量、视网膜总厚度和内层厚度、RGC 数目及 RGC 凋亡情况。

结果: 在各时间点, 慢性高眼压大鼠 (MK-801 处理组和生理盐水对照组) 视网膜谷氨酸含量均较空白对照组高 ($P < 0.05$); MK-801 处理组视网膜谷氨酸含量比同期生理盐水对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HE 染色表明 MK-801 处理组和空白对照组视网膜总厚度和内层厚度均大于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), RGC 数目高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$)。MK-801 处理组 RGC 层凋亡阳性细胞的表达少于生理盐水对照组。

结论: MK-801 可通过阻断谷氨酸介导的神经毒性作用, 对慢性高眼压 RGC 起到保护作用。

关键词: MK-801; 视网膜神经节细胞; 慢性高眼压

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.05.05

李琳玲, 冯敏. MK-801 对大鼠慢性高眼压视网膜神经节细胞的保护作用. 国际眼科杂志 2012; 12(5): 823-825

0 引言

青光眼是一种可导致视神经不可逆性损伤的致盲性眼病, 随着科研工作者对青光眼发病机制研究的逐步深入, 谷氨酸对视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGC) 的毒性作用被逐渐认识。谷氨酸是哺乳动物最主要的兴奋性氨基酸, 也是中枢神经系统兴奋性神经突触所释放的主要神经递质。在青光眼的病程中, 长期的高眼压和缺血会引起眼内谷氨酸的浓度增加, 高浓度的谷氨酸诱导 RGC 凋亡。因此, 干扰谷氨酸产生神经毒性的中间环节可以对视神经产生保护作用。MK-801 是近年来研究较多的甲基天门冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体的非竞争性拮抗剂, 其在脑缺血再灌注后对神经元的保护作用已得到初步证实^[1,2]。本研究拟通过对不同状态下视网膜上 NMDA 受体表达的检测, 明确 MK-801 对 NMDA 受体的抑制作用, 探讨 MK-801 对慢性高眼压 RGC 的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠36只,购自湖北医药学院动物试验中心,体质量200~250g,雌雄不限。MK-801(Sigma, USA),TUNEL试剂盒(武汉博士德生物试剂公司)。Tonopen眼压计(Medtronic Solan公司)、Olympus光学显微镜和HMIAS-2000型全自动医学彩色图像分析系统。

1.2 方法

1.2.1 慢性高血压大鼠模型的建立和实验分组 SD大鼠36只分为3组,每组12只。A组:空白对照组,不加任何实验干预手段;B组:慢性高血压+生理盐水对照组;C组:慢性高血压+MK-801组。B组和C组大鼠分别用1mL注射器抽取(400U/0.2mL) α -糜蛋白酶溶液,从9:00位角巩膜缘进针,经瞳孔至对侧虹膜下注入后房, α -糜蛋白酶溶液后房内注射可获得长期中等高的眼压升高的青光眼模型。每日用Tonopen眼压计测眼压,眼压在30mmHg以上为造模成功。B组动物造模成功后ip生理盐水5mL,C组动物造模成功后ip MK-801(0.3mg/kg),两组分别在注射后第1,3,5和7d各处死老鼠3只,取眼球标本进行检测。

1.2.2 样品谷氨酸含量测定 采用聚合TMPAB-OSu柱前衍生-整体柱微萃取技术高效液相色谱检测样品谷氨酸含量,Hypersil ODS柱(15cm \times 4.6mm);流动相:甲醇:25mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH=6.85):二氯甲烷=45:52:3;柱温:20 $^{\circ}$ C;进样量10 μ L/次;荧光光度检测器(激发波长497nm,发射波长509nm),测定样品中的氨基酸。通过标准品的测定比较,根据氨基酸的色谱峰面积采用外算法计算样品中的谷氨酸含量。

1.2.3 组织病理学检查 取各组眼球标本作HE染色并进行图像分析。各组标本以戊二醛固定眼球壁18h后,乙醇梯度脱水,常规石蜡包埋,选取颞下方后极部视网膜以3 μ m厚度连续切片,HE染色,在 \times 200倍光学显微镜下观察并照相。采用HMIAS-2000型全自动医学彩色图像分析系统分析,在每张切片任选150 μ m长的3个不同视网膜片段,计数RGC数目,并任选4个点测量视网膜总厚度及内层厚度(指视网膜内界膜到外核层和外网状层交界处之间的距离),每眼分析3张切片。

1.2.4 TUNEL法检测RGC凋亡 将石蜡包埋后的切片以0.01mol/L PBS漂洗,3min \times 3次,以蛋白酶K消化5min后再次漂洗。以1mL/L Triton X-100液浸透,平衡缓冲液孵育5min。然后依次加入生物素化的核苷酸复合物及TdT酶,37 $^{\circ}$ C孵育1h;加2 \times SSC(1:10稀释)室温孵育15min后漂洗;3mL/L双氧水孵育3min后再次漂洗;加HRP标记的抗生物素链菌素(PBS 1:500)稀释,室温孵育30min漂洗,DAB显色。当标本出现深褐色时终止反应,脱水、透明和封片后镜检。

统计学分析:数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,SPSS 11.0统计分析软件进行方差分析和SNK-*q*检验处理,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 视网膜谷氨酸含量 各时间点MK-801处理组、生理盐水对照组和空白对照组视网膜谷氨酸的含量见表1。在各时间点,慢性高血压大鼠(MK-801处理组和生理盐水对照组)视网膜谷氨酸含量均较空白对照组高($P<0.05$);在各时间点,MK-801处理组的视网膜谷氨酸含量比生理盐水对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 MK-801对慢性高血压大鼠组织病理学形态的影响

空白对照组SD大鼠的视网膜在光镜下可观察到10层结构,RGC层为单层细胞,外核层细胞数最多(图1A)。MK-801处理组视网膜厚于生理盐水对照组,接近空白对照组视网膜,RGC数目较生理盐水对照组多而比空白对照组少(图1B)。生理盐水对照组视网膜明显薄于空白对照组的正常视网膜,RGC数量明显减少(图1C)。各组视网膜总厚度和内层厚度以及RGC数目比较见表2。MK-801处理组和空白对照组的视网膜总厚度和内层厚度都大于生理盐水对照组($P<0.05$),MK-801处理组的视网膜总厚度和内层厚度都较空白对照组薄,但差异无统计学意义($P>0.05$)。MK-801处理组和空白对照组RGC数目多于生理盐水对照组($P<0.05$),MK-801处理组RGC数目和空白对照组对比差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 MK-801对慢性高血压大鼠凋亡细胞的影响 空白对照组神经节细胞层中鲜有凋亡阳性细胞的表达(图2A),MK-801处理组神经节细胞层凋亡阳性细胞的表达少于生理盐水对照组(图2B),生理盐水对照组神经节细胞层可见大量凋亡阳性细胞的表达(图2C)。

3 讨论

谷氨酸是视网膜内大多数神经元的兴奋性递质,在视网膜内核层和节细胞层有较高的含量,其在视网膜的生理与病理情况下均起着重要的调节作用。青光眼引起的RGC损伤以细胞凋亡为特征^[3],因而有关细胞凋亡的研究也被引入高血压所致视网膜损伤之中。本研究结果表明,在慢性高血压的动物模型中,谷氨酸含量较空白对照组明显升高($P<0.05$),高浓度的谷氨酸对RGC产生损害,导致细胞凋亡。高血压可导致视网膜缺血性损伤,谷氨酸从突触中过度释放,而摄取和降解不足,造成细胞外谷氨酸蓄积,高浓度的谷氨酸可持续刺激神经内膜上的NMDA受体,导致电压门控式钙离子通道持续开放,胞外 Ca^{2+} 内流而胞内 Ca^{2+} 超载, Ca^{2+} 和钙调蛋白激活一氧化氮合成酶产生大量NO,NO本身具有自由基作用,并诱导线粒体产生大量超氧阴离子,两者结合生成毒性很强的超氧亚硝酸根离子,诱导RGC凋亡^[4]。另外在 Ca^{2+} 内流介导的一系列反应中,通过严重耗尽细胞内能量而间接导致细胞死亡。在某些状况下,NO也可激活p53,最终导致RGC凋亡。基础研究及临床实验证实,干扰谷氨酸产生神经毒性的任何环节均对神经元具有保护作用。

目前对NMDA受体的研究,主要集中在非竞争性NMDA受体拮抗剂和竞争性NMDA受体拮抗剂的研究上。MK-801作为一种非竞争性NMDA受体拮抗剂,结合于NMDA受体离子通道内位点,亲和力大,作用强,具有剂量依赖性的特点,呈现慢阻滞-开放动力学特点和低电压依赖性。已有研究发现,MK-801可改善RGC死亡状态及抑制缺血所致的细胞核质内DNA的裂解^[5,6],可明显降低视网膜的损伤。

在SD大鼠慢性高血压模型,检测到高血压时视网膜谷氨酸含量明显增高,而MK-801处理后视网膜谷氨酸含量明显降低。本实验中,组织学检查发现慢性高血压下大鼠RGC层可见大量凋亡阳性细胞,视网膜总厚度及内层厚度显著变薄、RGC数明显减少,而MK-801处理后RGC层凋亡阳性细胞减少、视网膜总厚度及内层厚度接近正常视网膜。RGC数量和形态结构的损伤减轻,说明MK-801可在一定程度上增强RGC对抗高血压损害的能力,对慢

表1 慢性高血压大鼠腹腔注射后视网膜谷氨酸含量的变化 ($\bar{x}\pm s, 10^{-5}\text{mmol/g}, n=3$)

分组	时间点			
	1d	4d	7d	10d
空白对照组	1.35±0.21	1.32±0.23	1.31±0.25	1.37±0.12
生理盐水对照组	4.08±0.50	10.89±0.21	13.25±0.36	14.27±0.13
MK-801 处理组	1.95±0.51	7.46±1.25	8.45±0.41	11.75±0.57

表2 MK-801 对慢性高血压大鼠视网膜总厚度和内层厚度及 RGC 数目的影响 $\bar{x}\pm s$

分组	视网膜总厚度(μm)	内层厚度(μm)	RGC 数目(cells/450 μm)
空白对照组	288.50±1.61	172.60±1.90	24.50±0.87
生理盐水对照组	205.80±1.98 ^a	134.50±2.95 ^a	14.50±0.64 ^a
MK-801 处理组	275.40±1.16 ^c	164.20±0.45 ^c	21.20±0.45 ^c

^a $P<0.05$ vs 空白对照组; ^c $P<0.05$ vs 生理盐水对照组。

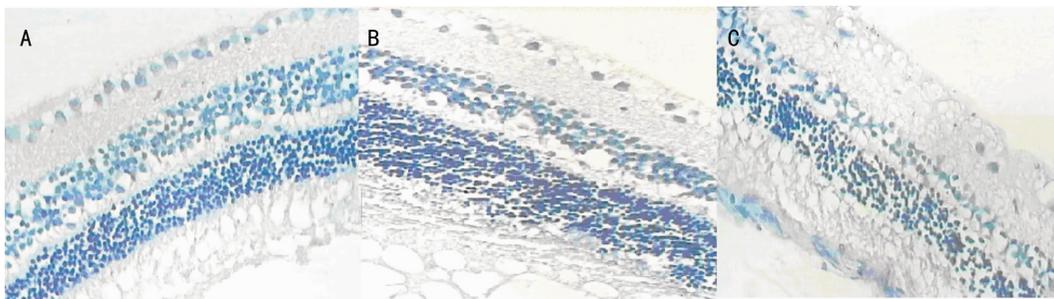


图1 MK-801 对慢性高血压大鼠组织病理学形态的影响 (HE×200) A:空白对照组;B:MK-801 处理组; C:生理盐水对照组。

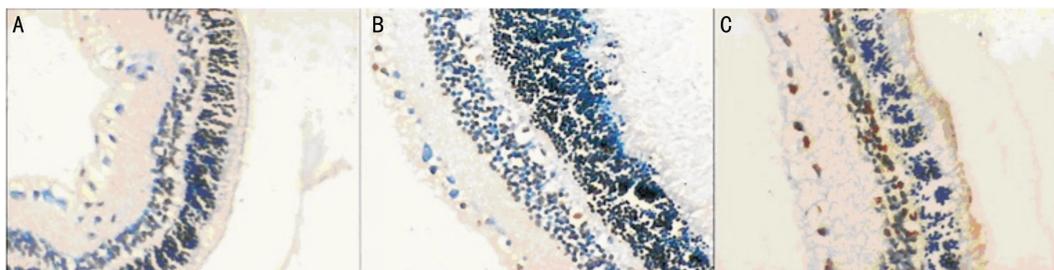


图2 MK-801 对慢性高血压大鼠凋亡细胞的影响 (TUNEL×200) A:空白对照组;B:MK-801 处理组; C:生理盐水对照组。

性高血压下大鼠视网膜具有保护作用。MK-801 是已知最强的 NMDAR 拮抗剂, MK-801 分子是水溶性的, 易通过血-脑屏障。NMDAR 主要位于神经元细胞胞体, 通过血-脑屏障的 MK-801 很容易与 NMDAR 结合, 可作用于 NMDAR 分子的 b 位点, 拮抗其生物学效应。MK-801 可通过阻断 NMDA 受体, 干涉 NMDA 受体与谷氨酸的结合来阻断谷氨酸介导的神经毒性作用, 对慢性高血压 RGC 起到保护作用^[2,7]。

MK-801 通过阻断 NMDA 受体与谷氨酸的结合, 减少 NMDA 受体介导的谷氨酸兴奋性毒性, 降低视网膜谷氨酸水平以达到新的平衡, 从而减少谷氨酸的兴奋性毒性实现对视网膜的保护作用。因此 MK-801 具有潜在的临床应用价值, 可望作为一种新型药物保护青光眼引起的视神经损害, 但其具体的作用机制及药物代谢动力学、毒性作用等还有待进一步深入研究。

参考文献

1 Lee T, Heo H, Kim Kwon Y. Effect of Berberine on Cell Survival in the Developing Rat Brain Damaged by MK-801. *Exp Neurobiol* 2010; 19 (3):140-145

2 Neuhaus W, Burek M, Djuzenova CS, *et al.* Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 2012;506(1):44-49

3 石晶明, 蒋幼芹. 兴奋性氨基酸与青光眼. *国际眼科杂志* 2004;4(4):668-674

4 Wamsley S, Gabelt BT, Dahl DB, *et al.* Vitreous glutamate concentration and axon loss in monkeys with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005;123(1):64-70

5 Hama Y, Katsuki H, Suminaka C, *et al.* Chloride-dependent acute excitotoxicity in adult rat retinal ganglion cells. *Neuropharmacology* 2008;55(5):677-686

6 Ju WK, Lindsey JD, Angert M, *et al.* Glutamate receptor activation triggers OPA1 release and induces apoptotic cell death in ischemic rat retina. *Mol Vis* 2008;14:2629-2638

7 Ahlgren H, Henjum K, Ottersen OP, *et al.* Validation of organotypical hippocampal slice cultures as an *ex vivo* model of brain ischemia: different roles of NMDA receptors in cell death signalling after exposure to NMDA or oxygen and glucose deprivation. *Cell Tissue Res* 2011;345(3):329-341