

引文格式: 魏丽娟, 张金嵩, 李福祯, 周利晓. 利鲁唑对脂多糖诱导眼内炎中谷氨酸代谢的影响[J]. 眼科新进展, 2015, 35(11): 1010-1013. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0276

【实验研究】

利鲁唑对脂多糖诱导眼内炎中谷氨酸代谢的影响[△]

魏丽娟 张金嵩 李福祯 周利晓

作者简介: 魏丽娟, 女, 1985年10月出生, 河南人, 主治医师, 在读博士。联系电话: 15903671142; E-mail: wlijua@163.com

About WEI Li-Juan: Female, born in October, 1985. Attending doctor. Tel: 15903671142; E-mail: wlijua@163.com

收稿日期: 2015-04-02
修回日期: 2015-06-09
本文编辑: 周志新

[△]基金项目: 国家自然科学基金联合项目(编号: U1304812)

作者单位: 450052 河南省郑州市, 郑州大学第五附属医院眼科(魏丽娟, 周利晓); 450052 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院眼科(张金嵩, 李福祯)

通讯作者: 张金嵩, E-mail: jszhang2@hotmail.com

Received date: Apr 2 2015
Accepted date: Jun 9 2015

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: U1304812)

From the Department of Ophthalmology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University (WEI Li-Juan, ZHOU Li-Xiao), Zhengzhou 450052, Henan Province, China; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University (ZHANG Jin-Song, LI Fu-Zhen), Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Responsible author: ZHANG Jin-Song, E-mail: jszhang2@hotmail.com

Effects of riluzole on glutamate metabolism in endophthalmitis induced by lipopolysaccharide

WEI Li-Juan, ZHANG Jin-Song, LI Fu-Zhen, ZHOU Li-Xiao

【Key words】 lipopolysaccharide; endophthalmitis; riluzole; glutamate; Müller cell

【Abstract】 Objective To explore the effects of riluzole on glutamate (Glu) metabolism in endophthalmitis induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: BSS group (Group 1), LPS inoculated group (Group 2), LPS inoculated with riluzole treatment group (Group 3), 35 cases in each group. The right eyes of rats in group 2 and group 3 were injected with LPS, and the BSS rats received intravitreal injections of balanced salt solution, respectively. Intraperitoneal injections of riluzole were given to the rats in group 3 before and after LPS inoculation, once daily during the next three days. The levels of Glu in the vitreous humor and retinal glutamine synthetase (GS) expression were investigated.

Results The concentration of Glu increased after endophthalmitis induced by LPS. The levels of Glu in vitreous of group 1, 2, 3 at 6 hours after modeling were (15.32 ± 0.11) μmol · L⁻¹, (49.51 ± 4.15) μmol · L⁻¹ and (49.81 ± 2.12) μmol · L⁻¹, respectively, there was no statistical difference between group 2 and group 3, but there were statistical differences between above two groups and group 1 (both P < 0.05). The concentration of Glu in the vitreous humor peaked at 48 hours, then gradually decreased, group 2 slightly increased at 5 days, then gradually decreased. At each time points after 6 hours, the concentration of Glu in the vitreous humor of group 3 were all lower than those of group 2 (all P < 0.05), but were higher than those of group 1 (all P < 0.05). The expression of GS in group 2 increased, which mainly expressed in ganglion layer and inner nuclear layer. There were statistical differences in the expression of GS at 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours between group 2 and group 3 (all P < 0.05), the group 3 were lower than group 2, but still higher than group 1.

Conclusion Riluzole can decrease the content of Glu in the vitreous humor of endophthalmitis induced by LPS, inhibit the müller cells activation, which suggests that riluzole may play the protective role in the endophthalmitis.

【关键词】 脂多糖; 眼内炎; 利鲁唑; 谷氨酸; Müller细胞

【摘要】 目的 观察利鲁唑对脂多糖诱导大鼠眼内炎中谷氨酸 (glutamate, Glu) 代谢的影响。**方法** 将SD大鼠随机分为3组, 每组35只, 1组为生理盐水对照组, 2组为眼内炎组, 3组为眼内炎利鲁唑干预组。2组、3组通过玻璃体内注射大肠杆菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 建立大鼠眼内炎模型, 3组腹腔注射利鲁唑进行干预。紫外分光光度法检测玻璃体中Glu含量的变化, 免疫组织化学方法测定谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 在视网膜组织的表达变化及分布。**结果** LPS诱导眼内炎后玻璃体内Glu浓度均显著增高。造模后6h玻璃体内Glu浓度即较对照组明显增加, 1组玻璃体Glu浓度为(15.32 ± 0.11) μmol · L⁻¹, 2组为(49.51 ± 4.15) μmol · L⁻¹, 3组为(49.81 ± 2.12) μmol · L⁻¹, 2组和3组差异无统计学意义, 二者与1组相比差异均有统计学意义 (均为 P < 0.05)。玻璃体内Glu浓度于48h达高峰后逐渐下降。2组在5d时Glu浓度较之前出现小幅回升(297.59 ± 1.03) μmol · L⁻¹, 然后逐渐下降。6h后的各时间点, 3组玻璃体Glu浓度均明显低于2组, 差异均有统计学意义

14 Rada JA, Brenza HL. Increased latent gelatinase activity in the sclera of visually deprived chicks [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36(8): 1555-1565.

15 Chen ZT, Wang IJ, Liao YT, Shih YF, Lin LL. Polymorphisms in steriodogenesis genes, sex steroid levels, and high myopia in the Taiwanese population [J]. *Mol Vis* 2011, 17(16): 2297-2310.

16 Ogueta SB, Schwartz SD, Yamashita CK, Farber DB. Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene expression [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(9): 1906-1911.

17 时青云, 闫琦. 雌孕激素与免疫作用的相互关系研究进展 [J]. 新乡医学院学报 2000, 17(1): 71-73.

18 Suzuki T, Kinoshita Y, Tachibana M, Matsushima Y, Kobayashi Y, Adachi W et al. Expression of sex steroid hormone receptors in human cornea [J]. *Curr Eye Res* 2001, 22(1): 28-33.

义(均为 $P < 0.05$),但较1组仍明显增高(均为 $P < 0.05$)。GS在2组表达升高,主要表达于内颗粒层、神经节细胞层 Müller 细胞胞浆中。2组、3组在6 h、12 h、24 h、48 h、72 h的GS表达差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。3组GS的表达明显低于2组,但仍高于1组。结论 利鲁唑可以降低LPS诱导眼内炎中玻璃体Glu含量,抑制Müller细胞活化,提示其在细菌性眼内炎中具有保护作用。

苯并噻唑类药物利鲁唑是一种新型的抗谷氨酸 (glutamate, Glu) 药物,最早作为Glu拮抗剂广泛应用于肌萎缩性脊髓侧索硬化患者的治疗,后又发现其在稳定细胞内外离子(钠、钾、钙)浓度方面具有广泛作用,在神经保护、抗惊厥、抗抑郁等方面显示了广泛的价值,根据其抑制钠通道激活、减少Glu释放等药理机制,我们推测其可能在控制眼内炎中起到积极作用。本研究观察利鲁唑对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导大鼠眼内炎中Glu代谢的干预作用,并对其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立与分组 105只SD大鼠随机分为3组,每组35只,1组为生理盐水对照组,2组为眼内炎组,3组为眼内炎利鲁唑干预组。2组、3组SD大鼠用 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛注射液($1.7 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉后,左氧氟沙星滴眼液滴右眼5 min 1次,共4次,清洁结膜囊。盐酸奥布卡因滴眼液、复方托吡卡胺滴眼液滴右眼,局部麻醉、散瞳后于显微镜下使用30 G针头的 $10 \mu\text{L}$ 微量注射器抽取LPS溶液 $5 \mu\text{L}$,于颞上方角巩膜缘后1 mm向玻璃体中心内注射,诱导建立实验模型。相同方法向1组大鼠右眼内注入 $5 \mu\text{L}$ 无菌生理盐水。所有大鼠均取右眼为实验眼,左眼为自身对照。3组大鼠在LPS注射前12 h、术中及术后连续3 d每天腹腔内注射利鲁唑($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行干预。

1.2 试剂与仪器 谷氨酸试剂盒(南京凯基),兔抗鼠谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)多克隆抗体(Santa Cruz公司),SP免疫组织化学染色试剂盒(北京中杉生物试剂公司),UV2800型紫外分光光度仪(尤尼柯上海仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 玻璃体标本采集 于造模后6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、5 d及7 d,三组分别取3只大鼠,过量麻醉处死后迅速摘除眼球,置于干冰急冻,沿角膜缘剪开,去除角膜、晶状体后采集玻璃体,置于EP管中。按 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 玻璃体质量加入冰生理盐水,冰浴下超声波粉碎制成匀浆。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $16\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心

10 min,取上清液置 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存。

1.3.2 紫外分光光度计法检测Glu含量 使用南京凯基Glu试剂盒根据 $\text{Glu} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \alpha\text{-oxo-glutarate} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+$ 原理测定Glu的含量。

1.3.3 免疫组织化学检查 各组造模后于各时间点使用 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛过量麻醉处死大鼠(各2只),摘取右眼球,去除周围软组织,手术显微镜下用显微剪沿角膜缘做一切口,置入多聚甲醛固定液中3 d后以流动水冲洗24 h,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,连续切片(厚约 $5 \mu\text{m}$)。收取组织切片,置恒温箱烤片4 h。采用卵白素-生物素系统免疫组织化学染色法(SP法),按照说明书步骤进行免疫组织化学染色。以PBS代替一抗作为阴性对照。应用Image pro Plus 5.0软件测定GS免疫反应的光密度(OD)值,每个标本随机选取视网膜组织切片各5个,扣除背景OD值,计算GS阳性产物在组织中的实际OD值,以进行GS在视网膜组织中表达的定量分析。

1.4 统计学方法 所有数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用统计软件SPSS 13.0进行数据处理,3组定量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 玻璃体内Glu浓度对比 LPS诱导眼内炎后,实验眼玻璃体内Glu浓度显著增高。造模后6 h观察到2组、3组大鼠实验眼玻璃体内Glu含量较1组明显增加,2组和3组差异无统计学意义($P > 0.05$),与1组相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。玻璃体内Glu浓度于48 h达高峰,然后逐渐下降。2组在5 d时Glu浓度较之前出现小幅回升,然后逐渐下降。6 h后的各时间点,3组玻璃体Glu浓度明显低于2组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),但仍明显高于1组(均为 $P < 0.05$,见表1)。

2.2 免疫组织化学染色结果 2组、3组GS主要分布于内颗粒层,散在分布,着染呈多边形,可见多个突起,外核层少量着染,神经节细胞层中环绕节细胞

Table 1 Comparison of Glu concentration in the vitreous humor at each time point among three groups

Group	$(\bar{x} \pm s, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$						
	6 hours	12 hours	24 hours	48 hours	72 hours	5 days	7 days
1	15.32 \pm 0.11	18.04 \pm 1.38	21.73 \pm 1.32	22.33 \pm 0.22	17.31 \pm 0.43	15.74 \pm 0.28	14.74 \pm 0.13
2	49.51 \pm 4.15 [#]	135.25 \pm 4.04 [#]	226.34 \pm 5.34 [#]	324.01 \pm 2.47 [#]	290.64 \pm 7.49 [#]	297.59 \pm 1.03 [#]	209.80 \pm 4.48 [#]
3	49.81 \pm 2.12 [#]	125.69 \pm 5.50 ^{#*}	191.42 \pm 3.14 ^{#*}	253.95 \pm 10.76 ^{#*}	203.98 \pm 1.61 ^{#*}	181.93 \pm 13.50 ^{#*}	160.76 \pm 3.74 ^{#*}

Note: Compared with group 1 at the same time point, [#] $P < 0.05$; Compared with group 2 at the same time point, ^{*} $P < 0.05$

胞体形成圆形或椭圆形染色,1组未见明显着染(图1)。造模后6h即可观察到2组、3组内颗粒层黄褐色阳性产物,呈弥散而均匀着染,与1组相比表达明显增强,各时间点OD值差异均有统计学意义(均为表2各时间点三组间视网膜GS表达的OD值比较

$P < 0.05$)。与2组相比,3组6h、12h、24h、48h、72h时GS表达明显降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。5d、7d时差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$,见表2)。

Table 2 Comparison of OD value of retinal GS expression at each time point among three groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	6 hours	12 hours	24 hours	48 hours	72 hours	5 days	7 days
1	0.041 ± 0.003	0.042 ± 0.031	0.041 ± 1.32	0.043 ± 0.001	0.042 ± 0.025	0.041 ± 0.019	0.041 ± 0.057
2	0.154 ± 0.012 [#]	0.162 ± 0.014 [#]	0.183 ± 0.013 [#]	0.191 ± 0.017 [#]	0.187 ± 0.012 [#]	0.174 ± 0.052 [#]	0.171 ± 0.021 [#]
3	0.149 ± 0.033 ^{#*}	0.151 ± 0.003 ^{#*}	0.167 ± 0.047 ^{#*}	0.163 ± 0.032 ^{#*}	0.169 ± 0.071 ^{#*}	0.169 ± 0.033 [#]	0.169 ± 0.015 [#]

Note: Compared with group 1 at the same time point, [#] $P < 0.05$; Compared with group 2 at the same time point, ^{*} $P < 0.05$

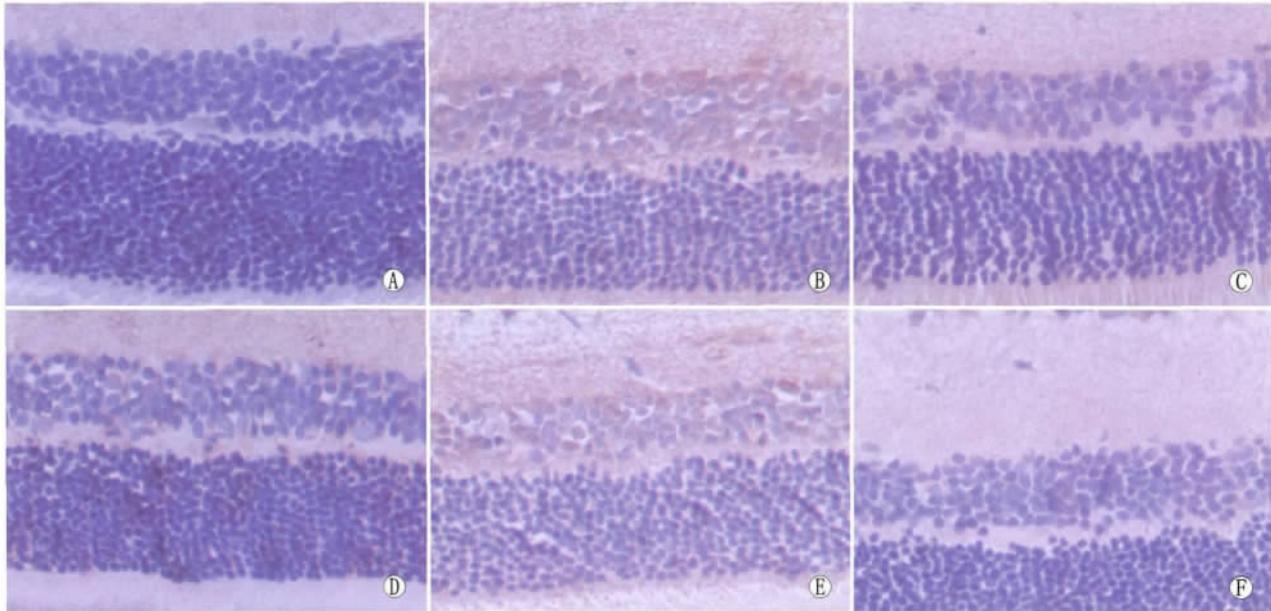


Figure 1 Immunohistochemical staining of retinal GS expression ($\times 400$). A: Group 1 6 hours; B: Group 2 6 hours; C: Group 3 6 hours; D: Group 1, 72 hours; E: Group 2, 72 hours; F: Group 3, 72 hours. GS免疫组织化学染色($\times 400$)。A: 1组6h; B: 2组6h; C: 3组6h; D: 1组72h; E: 2组72h; F: 3组72h

3 讨论

Glu浓度异常升高诱导的视网膜兴奋性毒性是多种致盲性眼病的共同病理状态。在缺血、缺氧条件下,能量耗竭,视网膜神经元释放Glu增加,重摄取减少,死亡细胞崩解溢出大量Glu,细胞间隙Glu浓度迅速增加^[1-2]。拮抗Glu兴奋性毒性作用是近年来研究热点^[3-4]。

玻璃体内注射LPS可诱导典型感染性眼内炎症反应,引起眼内组织的广泛炎症损害^[5]。我们推测,在眼内炎中血-视网膜屏障破坏、炎症细胞浸润、视网膜解剖结构破坏,以及Müller细胞的激活会导致眼内组织Glu代谢紊乱,Glu在细胞外液过量积聚,过度激活兴奋性氨基酸受体,产生毒性效应,进一步对视网膜内神经元细胞造成损伤,导致视功能的损害。利鲁唑作为Glu释放抑制剂用于治疗肌萎缩性脊髓侧索硬化症^[6],已有研究证实利鲁唑具有促进Glu摄取、抑制Glu从神经末梢释放、增加Glu与其转运体的结合活力等作用,从而对Glu兴奋性毒性

损伤有明显的保护作用^[7-9]。

本研究分析了LPS诱导眼内炎后玻璃体中Glu的含量,并证实利鲁唑可以减少LPS诱导眼内炎过程中Glu的释放。造模后各时间点,实验眼玻璃体内Glu含量较对照眼明显升高,表明LPS可扰乱Glu循环通路,使其代谢发生障碍,这可能引起视网膜细胞凋亡。眼内炎模型中玻璃体内Glu浓度的升高可能是炎症损伤致使视网膜神经细胞的突触囊泡功能受损,Glu释放增加,或是神经胶质细胞Glu转运体功能损伤,对Glu的重摄取减少所致,具体原因需要进一步研究。6h后的各时间点,3组玻璃体内Glu浓度明显低于2组,差异均有统计学意义,证实利鲁唑可能通过降低眼内炎中玻璃体Glu含量对视网膜组织起到保护作用。

在视网膜中,Müller细胞是神经节细胞和双极细胞中Glu的唯一来源,在调节神经细胞外Glu浓度时发挥着重要的作用^[10]。GS是Müller细胞的特异性标志物^[11]。同时,Müller细胞表达Toll样受体^[12-13],通过其识别病原体,激活细胞内的传导通路

活化诱导促炎因子产生,这些细胞因子通过募集活化的中性粒细胞,介导组织炎症反应。过度的炎症反应会导致眼内血管通透性增强,中性粒细胞、巨噬细胞迁移,蛋白渗漏,引起视网膜结构破坏性的改变,导致不可逆损伤^[14]。本研究采用免疫组织化学方法发现 LPS 注入玻璃体后,视网膜组织 GS 表达明显高于对照组,提示 Müller 细胞激活,而利鲁唑干预能一定程度上抑制 LPS 诱导的 GS 高表达,表明利鲁唑的干预可使眼内炎中 Müller 细胞的激活受到抑制,从而使其下游炎症因子的释放减少。根据利鲁唑稳定离子通道的药理作用及 Müller 的功能,推测利鲁唑可以稳定 Müller 细胞膜,减轻 LPS 对其直接损伤。但同时, Müller 细胞激活受到抑制, GS 表达减少, Müller 细胞对 Glu 的代谢能力下降,不利于 Glu 的清除,我们的研究同时证实利鲁唑可以抑制 LPS 诱导眼内炎玻璃体中 Glu 浓度的升高。由此推测,利鲁唑可同时作用于其他视网膜细胞,减少其损伤,降低 Glu 异常释放。

利鲁唑的拮抗 Glu 作用使其在中枢神经系统疾病中具有巨大的潜在价值^[15],虽然目前利鲁唑仅用于肌萎缩性脊髓侧索硬化症的治疗,但大量动物实验、临床及基础研究提示利鲁唑有较大的开发前景。本研究证实了其对 LPS 诱导眼内炎症中 Glu 代谢的影响,推测其在眼内炎中具有保护作用。

参考文献

- Januschowski K, Müller S, Krupp C, Spitzer MS, Hurst J, Schultheiss M et al. Glutamate and hypoxia as a stress model for the isolated perfused vertebrate retina[J]. *J Vis Exp* 2015 22:97.
- Wölfer J, Gorji A, Speckmann EJ, Wassmann H. Interstitial amino acid concentrations in rodent brain tissue during chemical ischemia

- [J]. *J Neurosci Res* 2014 92(8):955-963.
- Zheng S, Yang H, Chen Z, Zheng C, Lei B, Lei B. Activation of liver X receptor protects inner retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015, 56(2):1168-1180.
- 胡丽荣,肖倩,王景春,李金明,杨峰,张爱军,等. 盐酸美金刚对兔受损视神经的保护作用[J]. *眼科新进展* 2012 32(7):617-619.
- 袁钊辉,龙崇德,汪振芳,林晓峰,张铁美,姜秉盛,等. 大肠杆菌内毒素诱导的大鼠眼内炎表现及细胞因子的表达[J]. *中华眼底病杂志* 2010 26(3):259-262.
- Haidet-Phillips AM, Maragakis NJ. Neural and glial progenitor transplantation as a neuroprotective strategy for Amyotrophic Lateral Sclerosis(ALS) [J]. *Brain Res* 2015, [Epub ahead of print].
- Carbone M, Duty S, Rattray M. Riluzole elevates GLT-1 activity and levels in striatal astrocytes[J]. *Neurochem Int* 2012 60(1):31-38.
- Yohay K, Tyler B, Weaver KD, Pardo AC, Gincel D, Blakeley J et al. Efficacy of local polymer-based and systemic delivery of the anti-glutamatergic agents riluzole and memantine in rat glioma models: Laboratory investigation[J]. *J Neurosurg* 2014 120(4):854-863.
- Hunsberger HC, Weitzner DS, Rudy CC, Hickman JE, Libell EM, Speer RR et al. Riluzole rescues glutamate alterations, cognitive deficits and tau pathology associated with P301L tau expression[J]. *J Neurochem* 2015, [Epub ahead of print].
- Chen C, Chen H, Xu C, Zhong Y, Shen X. Role of interleukin-1 β in hypoxia-induced depression of glutamate uptake in retinal Müller cells[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014 252(1):51-58.
- Dai M, Xia XB, Xiong SQ. BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Müller cells[J]. *J Cell Physiol* 2012 227(2):596-603.
- Rosenzweig HL, Planck SR, Rosenbaum JT. NLRs in immune privileged sites [J]. *Curr Opin Pharmacol* 2011 11(4):423-428.
- 秦勤, 瞿佳. Toll 样受体介导的信号通路及其与眼部感染性疾病的关系[J]. *眼科新进展* 2007 27(10):786-788.
- Kumar A, Pandey RK, Miller LJ, Singh PK, Kanwar M. Müller glia in retinal innate immunity: a perspective on their roles in endophthalmitis[J]. *Crit Rev Immunol* 2013 33(2):119-135.
- 赵建法, 于苏文. 利鲁唑——治疗运动神经元病的新药[J]. *江苏大学学报(医学版)* 2002 12(3):301-302.

《眼科新进展》杂志征订启事

《眼科新进展》杂志是由新乡医学院主办的眼科学高级学术刊物,创刊于1980年,大16开,100页,国内外公开发行。1999年加入国家科技部《万方数据系统科技期刊群》和《中国学术期刊(光盘版)》,1997年被上海医科大学图书馆选定为医学类核心期刊,2000年被美国《化学文摘》收录,2001年被俄罗斯《文摘杂志》收录,自2002年连续入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),自2008年连续入选中国中文核心期刊,并连续被评为河南省二十佳科技期刊。2009年入选WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM),并被评为RCCSE中国核心学术期刊。国际标准连续出版物号为:ISSN 1003-5141,国内统一刊号:CN 41-1105/R 邮发代号:36-42。

本刊辟有名家讲坛(述评)(Editorial)、实验研究(Experimental study)、应用研究(Applied study)、文献综述(Review article)、海外信息(Overseas information)、消息(News)、读者来信(Letters)等栏目。本刊读者对象主要是眼科学临床、科研和教学工作者。欢迎国内外眼科医学工作者踊跃投稿和订阅。国内每期定价10.00元,全年定价120.00元。如错过邮局订阅,可直接汇款到我刊编辑部。联系地址:河南省新乡市金穗大道601号,新乡医学院期刊社《眼科新进展》杂志编辑部,邮编:453003。联系电话:0373-3029404; E-mail: ykxjz@xxmu.edu.cn、ykxjz@163.com; 网址: http://www.ykxjz.com