

缺氧对鼠视网膜 Müller 细胞 GLAST 和 GS 表达及功能的影响 *

戴 敏 夏晓波 **

(中南大学湘雅医院眼科, 长沙 410006)

摘要 研究了缺氧对鼠视网膜 Müller 细胞谷氨酸转运体(L-glutamate/L-aspartate transporter, GLAST)和谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)表达的影响, 及对谷氨酸摄取的作用. 采用出生 3~7 天的鼠视网膜组织进行 Müller 细胞培养, 采用 125 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化钴(CoCl_2)溶液分别进行缺氧干预 6、12、24、48 和 72 h, 不加 CoCl_2 溶液培养的 Müller 细胞为正常对照. 采用 RT-PCR 法、Western blot 法和免疫细胞化学染色法检测 GLAST 和 GS 的表达, 并检测谷氨酸摄取及细胞凋亡情况. 结果显示, 缺氧早期 GLAST 表达较正常对照组增强($P < 0.001$), CoCl_2 溶液干预 12 h 后达到最强($P < 0.05$), 之后逐渐降低. CoCl_2 溶液干预 72 h 后 GLAST 表达与正常对照组相比无明显差异($P > 0.05$). 而缺氧也使 GS 的表达较正常对照组增加($P < 0.001$), CoCl_2 溶液干预 48 h 后 GS 表达最强($P < 0.001$), 之后开始下降. 缺氧促进 Müller 细胞对谷氨酸的摄取, CoCl_2 溶液干预 48 h 后 L-[3, 4- ^3H]-谷氨酸的摄取量最大($P < 0.005$), 之后开始下降. CoCl_2 溶液干预后, Müller 细胞死亡数较正常对照组无明显差异($P > 0.05$). 结果表明, 在一定时间范围内缺氧能够增强 Müller 细胞 GLAST 及 GS 的表达, 增加谷氨酸的摄取. 但持续缺氧最终会引起 Müller 细胞功能失代偿, 从而导致谷氨酸的代谢能力降低.

关键词 缺氧, 视网膜 Müller 细胞, 谷氨酸转运体, 谷氨酰胺合成酶, 谷氨酸

学科分类号 R774

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00292

谷氨酸是视网膜中主要的神经递质, 然而在病理状态下, 神经元受缺血或高压的影响, 导致细胞缺氧, 可引起谷氨酸释放增多, 摄取减少, 从而造成神经元的损伤和死亡^[1-2]. Müller 细胞是视网膜最主要的神经胶质细胞, L-谷氨酸/L-天门冬氨酸转运体(L-glutamate/L-aspartate transporter, GLAST)是表达在视网膜 Müller 细胞(retinal müller cells, RMCs)膜上最主要的谷氨酸转运体^[3]. 谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)是 Müller 细胞主要的谷氨酸代谢酶, 在生理状态下, 细胞间隙中的谷氨酸通过 GLAST 转运至 Müller 细胞中, 由 GS 将其转化为谷氨酰胺释放到细胞间隙, 被神经元摄取后转化为谷氨酸进入下一循环^[4]. 因此, GLAST 和 GS 在维持谷氨酸平衡和保护神经元免受谷氨酸兴奋毒性损伤中发挥着重要作用. 在我们前期的研究中发现, 转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)^[5], 脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)^[6]加入正常

体外培养的 Müller 细胞中, 能够促进 GLAST 表达上调. 而我们要寻找病理状态下有效保护神经元的途径, 必须先了解 Müller 细胞处于病理状态时, GLAST 和 GS 的表达是否会发生变化, 能否正常发挥其功能. 以往有研究报道在急性高眼压大鼠模型中 Müller 细胞 GLAST 及 GS 表达上调^[7], 而慢性高眼压模型中 Müller 细胞 GLAST 表达下降^[8]. 然而缺氧对于 Müller 细胞中 GLAST 及 GS 的影响目前鲜有报道. 因此本文采用氯化钴(CoCl_2)溶液进行化学法缺氧干预 Müller 细胞, RT-PCR 法检测 mRNA 表达, Western blot 法及免疫细胞化学方法检测蛋白质的表达变化, 并采用 [^3H] 标记的谷氨酸检测 Müller 细胞对谷氨酸的摄取情况, 从而明确

* 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0684).

** 通讯联系人.

Tel: 15874898016, E-mail: xbxia@yahoo.com

收稿日期: 2010-09-11, 接受日期: 2010-11-17

视网膜 Müller 细胞处于缺氧状态时, GLAST 和 GS 的表达变化以及对谷氨酸摄取的影响。

1 材料与方法

1.1 Müller 细胞的培养及鉴定

取出生后 3~7 天的新生昆明小鼠(湖南东创实验动物科技服务部提供)视网膜组织, 采用胰酶消化法进行 Müller 细胞的原代培养^[9], 待细胞基本融合成单层后, 按 1:2 的比例约 6 天传代 1 次, 取第 3 代细胞进行实验。按照链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(streptavidin peroxidase, SP)免疫细胞化学染色方法进行细胞鉴定。一抗为 1:50 稀释的兔抗胶质纤维酸性蛋白多克隆抗体(glial fibrillary acidic protein, GFAP, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 二抗为 1:100 稀释的生物素标记的山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。阴性对照用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗。

1.2 实验分组

取来源于同一原代细胞的第 3 代细胞进行实验, 采用 CoCl_2 溶液进行化学法缺氧干预^[10-11], 在体外培养的 Müller 细胞中分别加入 125 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 (美国 Sigma 公司)溶液干预 6、12、24、48 和 72 h; 不加 CoCl_2 溶液培养的 Müller 细胞为正常对照。

1.3 RT-PCR 法检测 GLAST 及 GS mRNA 表达

Trizol RNA 提取液(美国 Invitrogen 公司)提取总 RNA, 按照逆转录试剂盒(加拿大 Fermentas 公司)说明将 1.5 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA, 反应条件为 42℃ 60 min, 70℃ 5 min, 然后进行 PCR 反应。GLAST 引物(上海生工生物工程有限公司): 上游 5' TCAAGTTCTGCCACCCTACC 3', 下游 5' CGAGTTCCCCATTTCAACAT 3', 扩增片段长度 447 bp。GS 引物(上海生工生物工程有限公司): 上游引物 5' CTGCCATACCAACTTCAGCA 3', 下游引物 5' AAAGGGAAGAGCTGGGAGAG 3', 扩增后片段长度 413 bp。β-actin 引物(上海生工生物工程有限公司): 上游 5' CAGGAGATGGCCAC-TGCCGCA 3', 下游 5' CTCCTTCTGCATCCTGTCAGCA 3', 扩增片段长度 276 bp。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min 预变性; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 以上 3 步 22 个循环; 72℃ 终末延伸 10 min。扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭显色后行图像分析。

1.4 Western blot 法检测 GLAST 及 GS 蛋白质表达

取出预处理好的细胞, 加入蛋白质抽提裂解液充分裂解细胞, 进行超声处理后, 采用 BCA 法蛋白质定量试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)进行蛋白质定量。每孔加入总蛋白 25 μg , 以 10% SDS-PAGE 胶电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入兔抗谷氨酸转运体 GLAST 多克隆抗体(1:400 稀释, 美国 Santa Cruz 公司)或兔抗谷氨酰胺合成酶 GS 多克隆抗体(1:400 稀释, 美国 Santa Cruz 公司), 4℃ 孵育过夜, 二抗采用的是生物素化的山羊抗兔 IgG(1:10 000 稀释, 美国 Jackson immuno Research 公司)室温孵育 1 h, 最后用 ECL 化学发光法(美国 GE 公司)检测。以 α-tubulin (1:10 000 稀释, 美国 Sigma 公司)为内参。

1.5 免疫细胞化学染色法检测 GLAST 及 GS 蛋白质表达

按照文献[5]的方法, 采用 SP 法免疫细胞化学染色检测不同时间点 CoCl_2 溶液对 Müller 细胞 GLAST 蛋白质表达的影响。一抗为 1:50 稀释的兔抗谷氨酸转运体 GLAST 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)或兔抗谷氨酰胺合成酶 GS 多克隆抗体(1:50 稀释, 美国 Santa Cruz 公司), 二抗选用 1:100 稀释的生物素标记的山羊抗兔 IgG。PBS 代替一抗作阴性对照。结果在显微镜下进行拍照(显微镜: 莱卡公司 Wetzlar Jmb H, 相机: 莱卡公司, DFC3000 FX, 德国)。

1.6 L-[3,4-³H]-谷氨酸摄取实验

取出预处理好的细胞, PBS 洗涤 2 次后将孔内液体吸干, 加入含 1.85×10^4 Bq/ml L-[3,4-³H]-谷氨酸(放射性比活度: 1.835×10^{12} Bq/ml, 美国 PerkinElmer 公司)的 DMEM 1 ml 后, 置于 37℃ 的 5% CO_2 培养箱中培养 15 min。弃培养液, 采用预冷的 PBS 洗 3 遍。每孔加入 300 μl 0.3 mol/L 的 NaOH, 于 37℃ 的 5% CO_2 培养箱中放置 15 min, 充分裂解细胞。5 000 r/min 离心 10 min。取 200 μl 上清液, 加入 8ml 闪烁液(中南大学湘雅医学院核医学研究中心提供), 液体闪烁计数仪(美国 Beckman 公司)测定每分钟脉冲数(cpm)。取剩下 100 μl 上清液进行 BCA 法蛋白定量, 结果用 cpm/(mg·ml)表示。

1.7 细胞凋亡检测

按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明进行实验。取约

10^5 个细胞, 加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液 (1 $\times$) 轻轻重悬, 再加入 5 μl Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 室温避光孵育 10 min. 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 190 μl Annexin V-FITC 结合液 (1 $\times$) 轻轻重悬细胞, 再加入 10 μl 碘化丙啶 (PI) 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置, 随即进行流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测.

1.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS16.0 统计软件进行统计学分析. 采用单因素方差分析对组间数据进行比较. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 视网膜 Müller 细胞的培养及鉴定结果

原代培养的 Müller 细胞约 8~10 天细胞基本融合成单层, 细胞多呈星形、梭形、多角形等形态, 胞浆丰富, 核膜清晰, 胞核呈椭圆形多位于细胞中央, 呈镶嵌样排列 (图 1a). 之后按 1:2 的比例约 6 天传代 1 次. 取传代第 3 代鼠视网膜 Müller 细胞进行细胞鉴定, 显微镜下随机连续观察 5 个高

倍视野, 每处视野计数 100 个细胞, 统计阳性细胞率得出, 90% 以上细胞 GFAP 抗体染色阳性, 表现为胞浆内出现棕黄色丝网状或颗粒状物质 (图 1b).

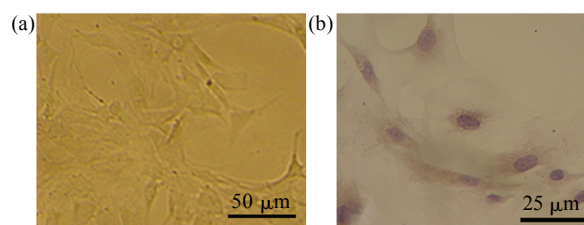


Fig. 1 Images of retinal Müller cells (RMCs)

(a) Light micrograph of cultural RMCs *in vitro*. (b) Images of RMCs identification by GFAP.

2.2 缺氧对 Müller 细胞 GLAST 表达的影响

2.2.1 缺氧对 Müller 细胞 GLAST mRNA 表达的影响. 如图 2a, 447 bp 处为 GLAST mRNA 表达条带, 276 bp 处为内参 β -actin 的表达条带. CoCl_2 溶液干预 Müller 细胞后, GLAST mRNA 表达条带逐渐增强, CoCl_2 溶液干预 12 h 后 GLAST 表达条带最

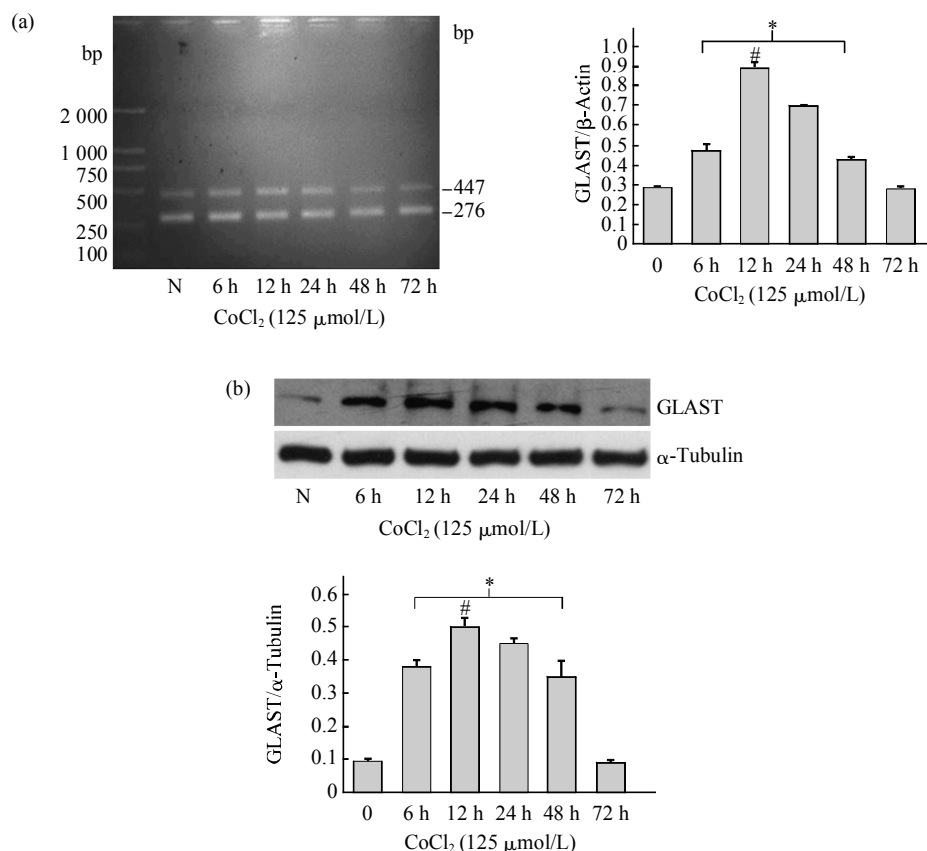


Fig. 2 The effect of hypoxia on expression of GLAST were examined by RT-PCR analysis and Western blot analysis

(a) RT-PCR analysis of GLAST mRNA in RMCs by treated with CoCl_2 . (b) Western blot analysis of GLAST protein in RMCs by treated with CoCl_2 . GLAST mRNA and protein showed the maximal increase after 12 h of hypoxia, $*P < 0.001$ relative to RMCs not exposed to hypoxia, $^{\#}P < 0.05$ relative to all other groups.

强. 之后随 CoCl_2 溶液干预时间延长, GLAST 表达条带逐渐减弱. 根据统计分析结果: CoCl_2 溶液干预 6、12、24 及 48 h 后, GLAST mRNA 表达的相对灰度值与正常对照组相比差异有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.001$); CoCl_2 溶液干预 72 h 后, GLAST mRNA 表达相对灰度值与正常对照组相比差异无统计学意义 ($n=3$, $P > 0.05$); 而 CoCl_2 溶液干预 12 h 后, GLAST mRNA 的相对表达量与其他各组相比差异均有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.001$).

2.2.2 缺氧对 Müller 细胞 GLAST 蛋白质表达的影响. GLAST 蛋白约 65 ku 大小, 内参 α -tubulin 蛋白约 54 ku, 由图 2b 可以看到 CoCl_2 溶液干预 Müller 细胞后, GLAST 蛋白表达趋势与 mRNA 水

平表达趋势一致. 根据统计分析结果: CoCl_2 溶液干预 6、12、24 及 48 h 后, GLAST 蛋白质相对表达量与正常对照组相比差异有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.001$); CoCl_2 溶液干预 72 h 后, GLAST 蛋白质相对表达量与正常对照组相比差异无统计学意义 ($n=3$, $P > 0.05$); 而 CoCl_2 溶液干预 12 h 后, GLAST 蛋白质相对表达量与其他各组相比差异均有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.05$). 由免疫细胞化学结果可见, 视网膜 Müller 细胞核被苏木素染成蓝色, 细胞膜及细胞浆的棕黄色丝网状或颗粒状物质为 GLAST 蛋白阳性表达. CoCl_2 溶液干预组及正常对照组均有 GLAST 蛋白质表达, CoCl_2 溶液干预 6、12、24 及 48 h 组较正常对照组细胞染色深(图 3).

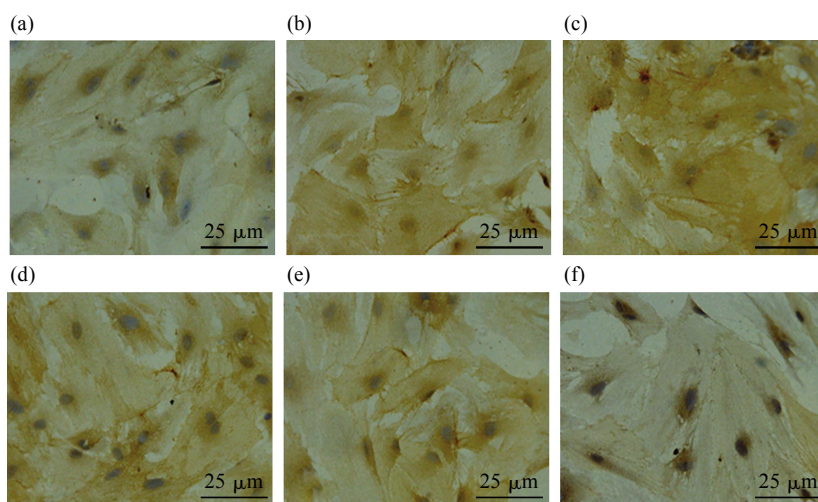


Fig. 3 The expression of GLAST protein in RMCs by treated with CoCl_2 were examined by immunocytochemical stain (SP)

RMCs nucleus(blue) counterstained with hematoxylin, RMCs can express GLAST (buffy) in plasmalemma and cytoplasm. (a) Normal control group. (b)~(f) hypoxia groups (pretreated with CoCl_2 for 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h).

2.3 缺氧对 Müller 细胞 GS 表达的影响

2.3.1 缺氧对 Müller 细胞 GS mRNA 表达的影响. 如图 4a, 413 bp 处为 GS mRNA 表达条带, 276 bp 处为内参 β -actin 的表达条带. CoCl_2 溶液干预 Müller 细胞后, GS mRNA 表达条带逐渐增强, 在 CoCl_2 溶液干预 48 h 后 GS 的表达条带最强, 之后开始减弱. 根据统计学分析结果: CoCl_2 溶液干预不同时间(6、12、24、48 和 72 h)后, GS mRNA 表达的相对灰度值与正常对照组相比差异有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.001$); 而 CoCl_2 溶液干预 48 h 后, GS mRNA 的相对表达量与其他各组相比差异均有

统计学意义 ($n=3$, $P < 0.001$).

2.3.2 缺氧对 Müller 细胞 GS 蛋白质表达的影响. GS 蛋白约 49 ku 大小, CoCl_2 溶液干预 Müller 细胞后, GS 蛋白质表达趋势与 mRNA 水平表达趋势一致(图 4b). 根据统计学分析结果: CoCl_2 溶液干预 6、12、24、48 及 72 h 后, GS 蛋白质相对表达量与正常对照组相比差异有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.001$); 而 CoCl_2 溶液干预 48 h 后, GS 蛋白质相对表达量与其他各组相比差异均有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.001$). 由免疫细胞化学结果可见, 视网膜 Müller 细胞核被苏木素染成蓝色, 细胞浆中

的棕黄色丝网状或颗粒状物质为 GS 蛋白阳性表达。CoCl₂ 溶液干预组及正常对照组均有 GS 蛋白

质表达, 各 CoCl₂ 溶液干预组较正常对照组细胞浆染色深(图 5)。

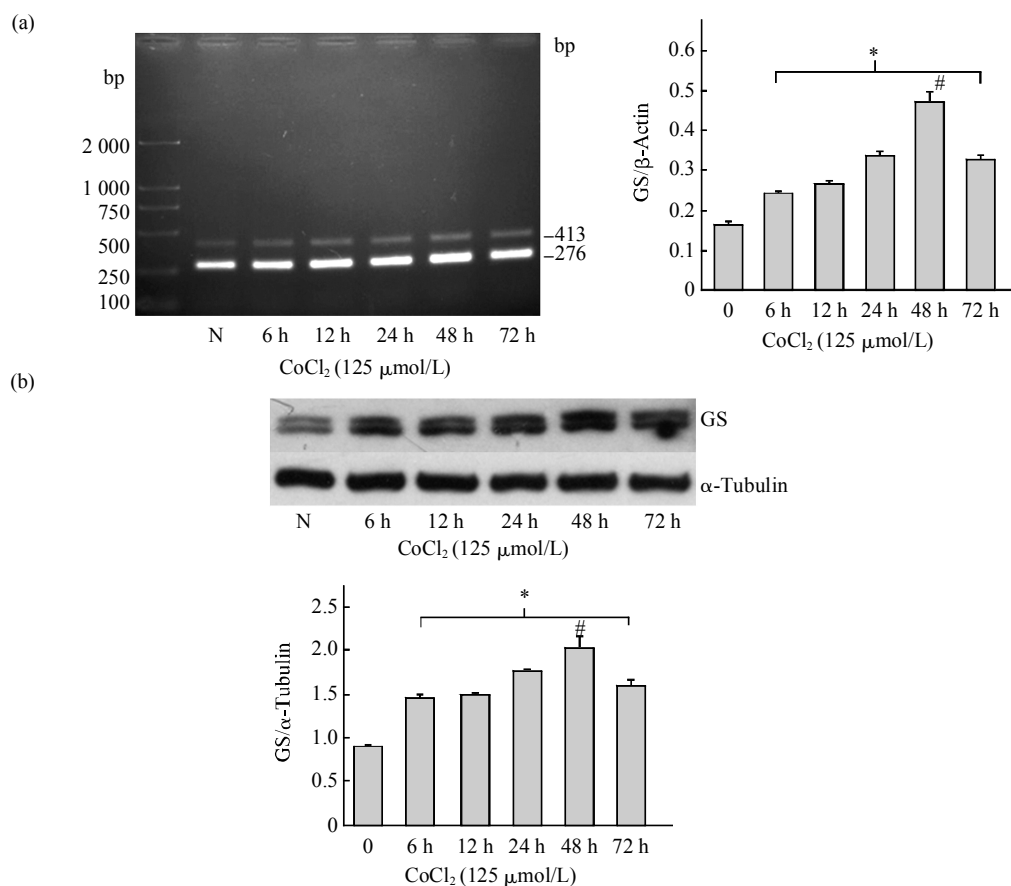


Fig. 4 The effect of hypoxia on expression of GS were examined by RT-PCR analysis and Western blot analysis

(a) RT-PCR analysis of GS mRNA in RMCs by treated with CoCl₂. (b) Western blot analysis of GS protein in RMCs by treated with CoCl₂. GS mRNA and protein were maximal after 48 h. * $P < 0.001$ relative to RMCs not exposed to hypoxia, # $P < 0.001$ relative to all other groups.

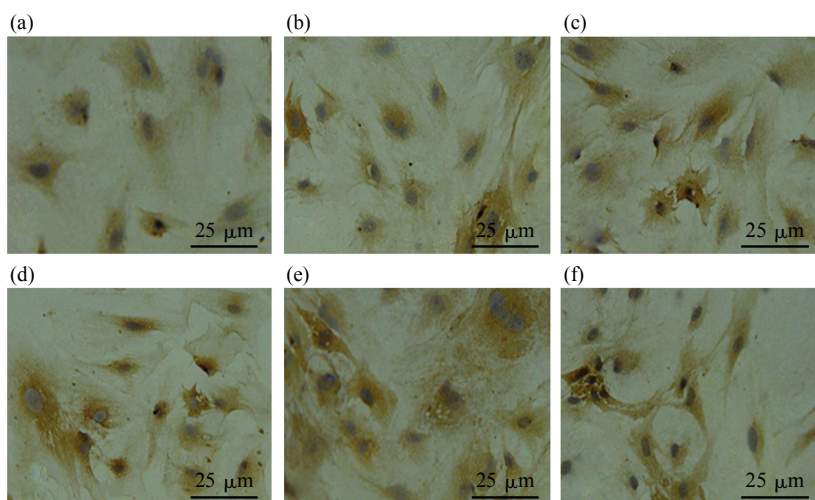


Fig. 5 The expression of GS protein in RMCs by treated with CoCl₂ were examined by immunocytochemical stain (SP)

RMCs nucleus(blue) counterstained with hematoxylin, RMCs can express GS (buffy) in cytoplasm. (a) Normal control group. (b)~(f) Hypoxia groups (pretreated with CoCl₂ for 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h).

2.4 缺氧对 Müller 细胞谷氨酸摄取功能的影响

采用 CoCl_2 溶液干预视网膜 Müller 细胞后, Müller 细胞对胞外的 L-[3, 4- ^3H]-谷氨酸相对摄取量均较正常对照组增加. 根据统计分析的结果, CoCl_2 溶液干预 6、12、24、48 及 72 h 后, 谷氨酸相对摄取量与正常对照组相比差异有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.05$). 其中, CoCl_2 溶液干预 48 h 后, 谷氨酸相对摄取量最大, 与其他各组相比差异均有统计学意义 ($n=3$, $P < 0.005$, 图 6).

2.5 细胞凋亡检测

仅 annexin V 标记的是早期凋亡的细胞, annexin V 和 PI 标记的是晚期凋亡的细胞, 仅被 PI 标记的为坏死的细胞. 结果发现, CoCl_2 溶液干预不同时间(12、24、48 及 72 h)后, 死亡的 Müller 细胞数(凋亡+坏死)与正常对照组相比, 差异无统计学意义 ($n=3$, $P > 0.05$, 图 7).

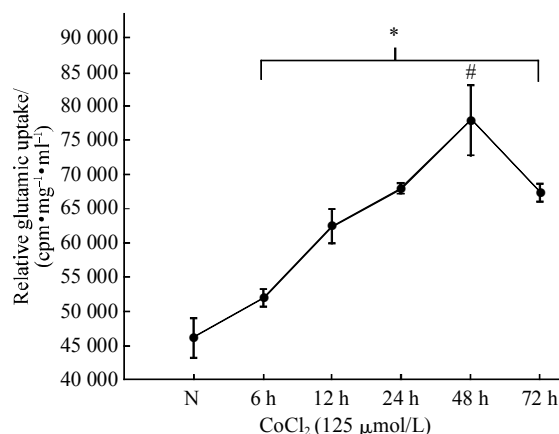


Fig. 6 L-[3, 4- ^3H]-glutamic acid uptake by RMCs after treated with CoCl_2

Hypoxia induced by CoCl_2 increased L-[3, 4- ^3H]-glutamic acid uptake by RMCs with the maximal effect observed at 48 h. * $P < 0.05$ relative to RMCs not exposed to hypoxia, # $P < 0.005$ relative to all other groups.

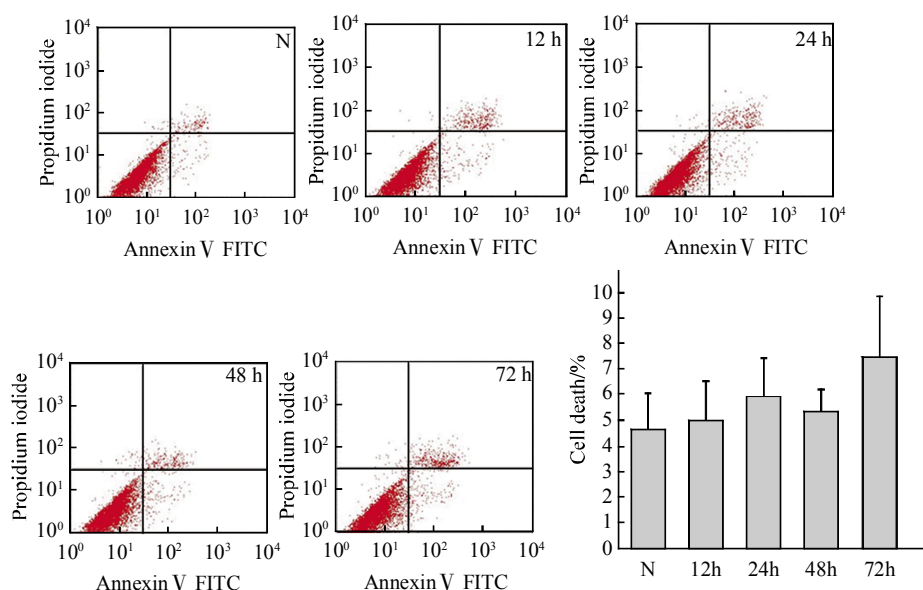


Fig. 7 Effect of CoCl_2 (125 $\mu\text{mol/L}$) on apoptosis in RMCs were examined by Annexin-V FITC/PI analysis

FITC-fluorescence (x-axis) versus PI-fluorescence (y-axis) for determination of apoptotic death. CoCl_2 had no effect on apoptosis.

3 讨 论

过量的谷氨酸能够刺激神经元过表达谷氨酸受体, 并与之结合, 从而造成神经元的损伤, 而 GLAST 和 GS 对于突触间隙的谷氨酸清除起着重要的作用^[2]. 过量的谷氨酸促进体外培养的 RMCs 中 GLAST 的表达上调^[3], 而且能够引起鼠视网膜色素变性模型中光感受器细胞死亡, 并增加

GLAST 及 GS 的表达^[14]. 然而在慢性闭角型青光眼和开角型青光眼的患者视网膜中, GLAST 表达下降^[15]. 由于缺氧引起的神经细胞损伤会造成细胞间隙谷氨酸浓度增高^[1-2], 因此, 研究缺氧状态下 RMCs 对谷氨酸的代谢具有重要的意义.

在以往的实验中发现, 鼠 PC12 细胞缺氧 24 h 后, 谷氨酸转运体 EAAC1、GLT-1 以及 GS 表达上调, 并且细胞外谷氨酸的摄取量增加^[16]. 而长时

间缺氧会使大脑星形胶质细胞谷氨酸转运体 GLAST、EAAT2 表达降低, 导致细胞外谷氨酸的摄取量减少^[7]. 我们的研究发现, 作为 Müller 细胞参与谷氨酸代谢最重要的两种蛋白质, GLAST 和 GS 在 RMCs 缺氧早期表达上调, 并增加细胞外谷氨酸的摄取. GLAST 的表达在 RMCs 缺氧 12 h 后表达最强, 之后逐渐下降, 缺氧 72 h 后降至正常水平. GS 的表达及胞外谷氨酸摄取量在 RMCs 缺氧 48 h 后达到最强, 之后开始下降. 我们采用 125 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 溶液干预 72 h 后死亡的 RMCs 与正常对照组相比并没有明显的差异, 说明此时 Müller 细胞自身尚没有明显受损, Müller 细胞早期能够通过增加摄取和代谢胞外谷氨酸来保护神经元, 但随着缺氧时间延长, Müller 细胞保护功能失代偿, 这可能是由于^[18]: a. Müller 细胞线粒体内自由基的形成及脂质过氧化作用, 中断谷氨酸的转运; b. 氧化应激引起的谷氨酸转运功能失调; c. Müller 细胞上钾离子通道的减少, 导致当 Müller 细胞去极化时, 谷氨酸的转运效率降低; d. 氧化应激反应或 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体活化后产生炎症介质(花生四烯酸等)抑制 Na, K-ATP 酶活性, 引起细胞内钠超载, 而花生四烯酸自身也抑制 GLAST 的作用, 从而导致 Müller 细胞对谷氨酸摄取和代谢能力降低.

综上, 我们的研究表明, 在一定时间范围内缺氧能够增强 Müller 细胞 GLAST 及 GS 的表达, 增加谷氨酸的摄取, 这是 RMCs 在缺氧早期的一种代偿保护机制. 持续缺氧最终会引起 Müller 细胞功能失代偿, 从而导致谷氨酸的摄取和代谢能力降低. 因此, 探索缺氧条件下如何增强 Müller 细胞对谷氨酸摄取和代谢能力, 对于保护视网膜神经元免受谷氨酸兴奋毒性损伤作用具有重要意义.

参 考 文 献

- [1] Weinreb R N, Levin L A. Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma?. *Arch Ophthalmol*, 1999, **117**(11): 1540-1544
- [2] Rocha M, Martins R A, Linden R. Activation of NMDA receptors protects against glutamate neurotoxicity in the retina: evidence for the involvement of neurotrophins. *Brain Res*, 1999, **827**(1-2): 79-92
- [3] Rothstein J D, Martin L, Levey A I, *et al.* Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 1994, **13**(3):713-725
- [4] Danbolt N C. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 2001, **65**(1):1-105
- [5] 曾 琦, 夏晓波. 转化生长因子 α 对鼠视网膜 Müller 细胞谷氨酸转运体调控作用的研究. *中华眼底病杂志*, 2008, **24**(5): 371-374
Zeng Q, Xia X B. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2008, **24**(5): 371-374
- [6] 戴 敏, 夏晓波, 曾 琦. 脑源性神经营养因子对小鼠视网膜 Müller 细胞谷氨酸转运体表达的调控. *中华眼底病杂志*, 2010, **26**(3): 282-284
Dai M, Xia X B, Zeng Q. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2010, **26**(3): 282-284
- [7] 熊 鲲, 黄菊芳, 潘爱华, 等. 急性眼高压大鼠视网膜谷氨酸 / 天冬氨酸转运体和谷氨酰胺合成酶的表达. *解剖学杂志*, 2005, **26**(3): 308-310
Xiong K, Huang J F, Pan A H, *et al.* *Chin J Anatomy*, 2005, **26**(3): 308-310
- [8] Martin K R, Levkovitch-Verbin H, Valenta D, *et al.* Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, **43**(7): 2236-2243
- [9] 王 芳, 赛因·贺西格, 于振珏, 等. 大鼠 Müller 细胞的体外培养及免疫组织化学鉴定. *解剖学杂志*, 2005, **28**(5): 599-601
Wang F, Hexige S Y, Yu Z J, *et al.* *Chin J Anatomy*, 2005, **28**(5): 599-601
- [10] Liu F Q, Liu Y, Lui V C, *et al.* Hypoxia modulates lipopolysaccharide induced TNF- α expression in murine macrophages. *Exp Cell Res*, 2008, **314**(6): 1327-1336
- [11] Shirato K, Kizaki T, Sakurai T, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α suppresses the expression of macrophage scavenger receptor 1. *Pflugers Arch*, 2009, **459**(1): 93-103
- [12] Choi D W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1988, **1**(8): 623-634
- [13] Taylor S, Srinivasan B, Wordinger R J, *et al.* Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells. *Mol Brain Res*, 2003, **111**(1-2): 189-197
- [14] Delyfer M N, Forster V, Neveux N, *et al.* Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Mol Vis*, 2005, **11**: 688-696
- [15] Naskar R, Vorwerk C K, Dreyer E B. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, **41**(7): 1940-1944
- [16] Kobayashi S, Millhorn D E. Hypoxia regulates glutamate metabolism and membrane transport in rat PC12 cells. *J Neurochem*, 2001, **76**(6): 1935-1948
- [17] Dallas M, Boycott H E, Atkinson L, *et al.* Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J Neurosci*, 2007, **27**(15): 3946-3955
- [18] Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, *et al.* Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int*, 2009, **54**(3-4): 143-160

Effect of Hypoxia on The Glutamate Transporter and Glutamine Synthetase in Mouse Retinal Müller Cells*

DAI Min, XIA Xiao-Bo**

(Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410006, China)

Abstract The effect of hypoxia on expression and function of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase(GS) was investigated in mouse retinal Müller cells(RMCs). Mouse RMCs were cultured by enzymatic digestion method. RMCs cultures were treated with CoCl_2 (125 $\mu\text{mol/L}$) for 6 h, 12 h, 24 h, 48 h or 72 h respectively *in vitro*. RMCs cultures were maintained without CoCl_2 in normal control group. The expression of GLAST and GS was determined by RT-PCR, Western blotting and immunocytochemical staining. L-[3,4- ^3H]-glutamic acid uptake was used to quantify glutamate uptake function of RMCs. The apoptosis of RMCs was confirmed by annexin V-FITC/PI staining. In early-stage of CoCl_2 -induced hypoxia (treated with CoCl_2 for 6 h, 12 h, 24 h or 48 h), the expression of GLAST was up-regulated ($P < 0.001$) and reached the maximum when RMCs have been treated with CoCl_2 for 12 h ($P < 0.05$). After RMCs having been treated with CoCl_2 for 72 h, the expression of GLAST had no difference compared to normal control ($P > 0.05$). CoCl_2 -induced hypoxia (treated with CoCl_2 for 6 h, 12 h, 24 h, 48 h or 72 h) also up-regulated the expression of GS ($P < 0.001$) which reached the maximum when RMCs have been treated with CoCl_2 for 48h ($P < 0.001$). The L-[3,4- ^3H]-glutamic acid uptake of hypoxia groups were the higher than normal control group ($P < 0.05$), and after having treated RMCs with CoCl_2 for 48 h, the L-[3,4- ^3H]-glutamic acid uptake was the highest ($P < 0.005$). Treatments with CoCl_2 did not induce apoptosis in RMCs. In early hypoxia stage, GLAST and GS were up-regulated and extracellular glutamate uptake increased. However, continued hypoxia causes gradual dysfunction and reduction of GLAST and GS, as well as glutamate uptake.

Key words hypoxia, retinal Müller cells, glutamate transporter, glutamine synthetase, glutamic acid

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00292

*This work was supported by a grant from Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-05-0684).

**Corresponding author.

Tel: 86-15874898016, E-mail: xbxia@yahoo.com

Received: September 11, 2010 Accepted: November 17, 2010