

# 促红细胞生成素对大鼠急性缺血视网膜节细胞的保护作用

丁国鹏<sup>1</sup>, 沈学峰<sup>2</sup>, 雷 姝<sup>3</sup>, 毛治平<sup>1</sup>, 任勇刚<sup>1</sup>, 王 涛<sup>2</sup>, 张欲凯<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(721000)中国陕西省宝鸡市人民医院眼科 宝鸡市眼科中心;<sup>2</sup>(710032)中国陕西省西安市,第四军医大学全军神经科学研究所;<sup>3</sup>(721000)中国陕西省宝鸡市妇幼医院药剂科  
作者介绍:丁国鹏,硕士,主治医师,研究方向:视网膜与视神经疾病的发病机制和治疗。

通讯作者:丁国鹏.dingyaayaa@yahoo.cn

收稿日期:2010-08-10 修回日期:2010-09-26

## Protection of recombinant human erythropoietin on the retinal ganglion cells in retina ischemia reperfusion injury in rats

Guo-Peng Ding<sup>1</sup>, Xue-Feng Shen<sup>2</sup>, Shu Lei<sup>3</sup>, Zhi-Ping Mao<sup>1</sup>, Yong-Gang Ren<sup>1</sup>, Tao Wang<sup>2</sup>, Yu-Kai Zhang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Baoji, Baoji 721000, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Institute of Neuroscience, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; <sup>3</sup>Department of Pharmacy, Baoji Women and Children Hospital, Baoji 721000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Guo-Peng Ding. Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Baoji, Baoji 721000, Shaanxi Province, China. dingyaayaa@yahoo.cn

Received:2010-08-10 Accepted:2010-09-26

## Abstract

• AIM: To evaluate the effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) to the retinal ganglion cell (RGC) in retina ischemia reperfusion injury (RIR) in rats.

• METHODS: The RIR model was modeled by retinal artery's 30 minutes occlusion in 20 female SD rats. 6μL/10U rhEPO was injected in left eyes and physiological saline was injected in right eyes as vehicle controls at 1 hour before modeling. 20 rats were divided into four groups(1 day, 4, 7, 14 days) by the time of drawing the optic bulb after modeling. The survival RGCs was observed. The fluorogold (FG) tracing technique was used at 4 days before drawing the optic bulb in both eyes.

• RESULTS: The quantity of the RGCs in eyes treated with the rhEPO were significantly higher than those in control group.

• CONCLUSION: The rhEPO has protective effect on the RGCs in RIR in rats.

• KEYWORDS: recombinant human erythropoietin; retina ischemia reperfusion injury; retinal ganglion cell; protection

Ding GP, Shen XF, Lei S, *et al.* Protection of recombinant human erythropoietin on the retinal ganglion cells in retina ischemia reperfusion injury in rats. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10(11):2071-2073

## 摘要

目的:探讨重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)对大鼠视网膜缺血再灌注损伤(retina ischemia reperfusion injury, RIR)中视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)的保护作用。

方法:成年雌性SD大鼠20只,采用夹闭视网膜动脉30min造成大鼠双眼缺血再灌注模型。所有大鼠均于建模前1h给予左眼rhEPO 10U(6μL),右眼给予同等剂量眼用平衡盐液。按照建模后眼球取材时间不同(1, 4, 7, 14d)分为4组,每组5只,均于取材前4d利用荧光金(fluorogold, FG)逆行标记大鼠RGC,视网膜铺片RGC计数,比较双眼存活RGC数量。

结果:rhEPO治疗眼RGC存活数多于平衡盐液对照眼。

结论:rhEPO对大鼠视网膜急性缺血后RGC具有保护作用。

关键词:重组人促红细胞生成素;视网膜缺血再灌注损伤;视网膜神经节细胞;保护

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.11.009

丁国鹏,沈学峰,雷姝,等.促红细胞生成素对大鼠急性缺血视网膜节细胞的保护作用.国际眼科杂志2010;10(11):2071-2073

## 0 引言

视网膜缺血是眼科常见的病理过程,常造成视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)的损伤,影响患者视力。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种重要的调节血细胞生成的细胞因子。中枢神经元中含有EPO及EPO受体(erythropoietin receptor, EPOR),同时EPO对大脑神经元具有保护作用<sup>[1]</sup>,RGC作为中枢神经系统的一个重要组成部分,也相继发现有EPO及EPO受体的表达<sup>[2]</sup>,因此推测EPO可能会对视网膜缺血缺氧损伤也具有一定的保护作用。我们通过夹闭大鼠视网膜动脉的方法观察重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)对正常眼压下急性视网膜缺血时RGC是否具有保护作用,旨在为这类疾病的临床治疗提供有益线索。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康成年SD大鼠20只,雌雄不限,体质量220~250g,由第四军医大学实验动物中心提供。Fluoro Gold(Sigma, USA),rhEPO(成都地奥制药),大鼠脑立体定位仪(Narishge, Japan),手术显微镜(Leica M651, Germany),荧光显微镜(Olympus BX-51, Japan)。

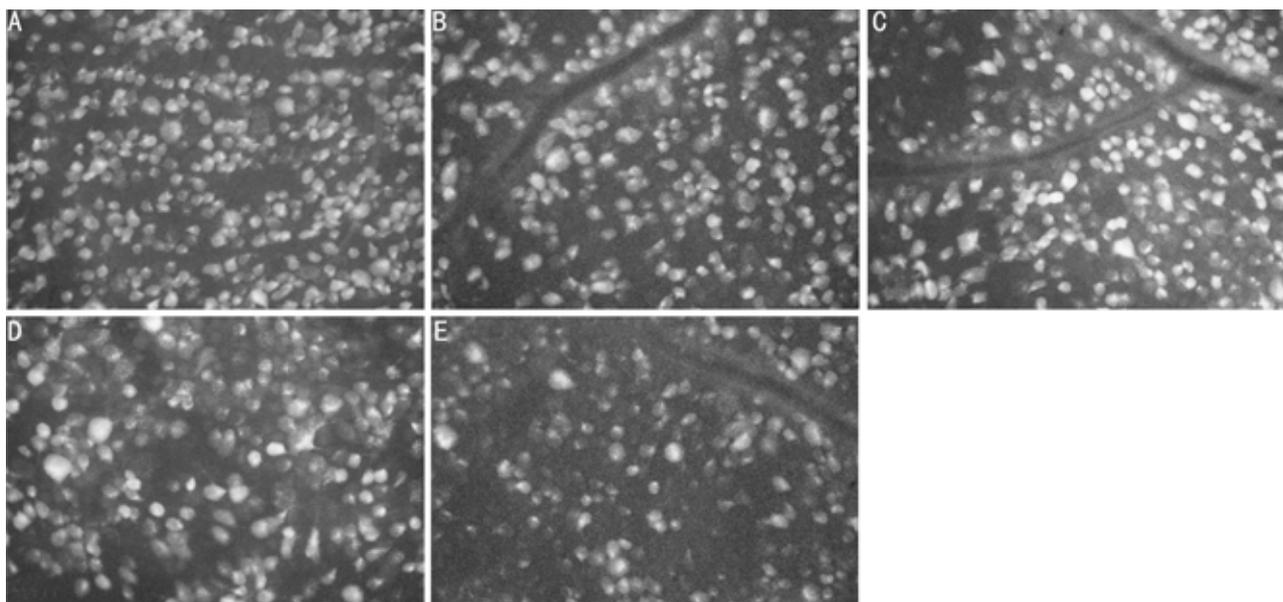


图1 大鼠视网膜 RGC(FG ×400) A:正常 RGC;B:急性缺血再灌注后 1d;C:急性缺血再灌注后 4d;D:急性缺血再灌注后 7d;E:急性缺血再灌注后 14d。

**1.2 方法** 大鼠于取材前 4d 向双上丘和双外侧膝状体注射 30g/L FG 各 1.5 $\mu$ L, 1min 内注射完毕, 留针 3~5min 后将微量进样器缓慢退出, 逆行标记双眼 RGC。RIR 建模前 60min 注射 rhEPO 悬液 10U (6 $\mu$ L) 于大鼠左眼玻璃体内, 留针数秒, 拔出微玻管, 右眼注射等量平衡盐水。10g/L 戊巴比妥钠注射液 (60mg/kg) ip 麻醉大鼠, 从双耳连线中点向前剪开皮肤至近鼻部, 暴露左眼眶部, 手术显微镜下沿左眶上缘向下做钝性分离, 暴露上直肌并用丝线向头侧牵拉, 暴露外直肌向尾侧牵拉, 向下分离至视神经根部, 反向镊于球后 2mm 视神经腹侧面钳夹视网膜动脉, 避免损伤视神经, 看眼底确认视网膜缺血, 30min 后松开反向镊子, 确认眼底视网膜血供恢复。右眼操作同左眼, 一次手术完成一只大鼠两只眼球的缺血模型。麻醉大鼠, 取眼球, 标记颞侧, 生理盐水冲洗 2s, 固定液 (0.5g/L 戊二醛、40g/L 多聚甲醛) 中视网膜铺片并后固定 3h, 视网膜正面向上, 分鼻上、鼻下、颞上、颞下 4 个象限对视网膜周边垂直视盘的切口以便视网膜平铺, 甘油封片。整个过程避光操作, 操作完成后即刻进行计数。荧光显微镜下放大 100 倍, 每个象限取距视盘 1/3, 2/3 半径处两个视野下的 RGC 进行计数, 每个时间点左眼/右眼各 3 只眼球, 按左右眼别及时间点分别求正常形态 RGC 数平均值 (个/视野)。

统计学分析: 所有数据以均数  $\pm$  标准差表示, 应用 SPSS 16.0 软件包, 采用单因素方差分析, 独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  作为检验标准。

## 2 结果

**2.1 RGC 形态** FG 标记的正常 RGC 形态为圆形或三角形, 直径较大, 荧光主要分布在胞体, 少数细胞可见明显的突起, 细胞质中荧光明亮, 呈金黄色, 边界清楚, 细胞外无荧光染料渗漏。细胞分布较均匀, 靠近视盘处分布较周边部分布密集, 血管走行区无 RGC。急性缺血再灌注后 RGC 形态大小不一, 边界欠清楚, 胞质内荧光分布不均匀, 有荧光染料渗漏细胞外, 可见到吞噬了死亡 RGC 及荧光金的胶质细胞。RGC 数量随时间逐渐减少, 损伤后 14d RGC 数目明显少于前 3 组 (图 1)。

表 1 各组 RGC 计数比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 个/视野)

分组 t/d	rhEPO 组 (左眼)	平衡盐液组 (右眼)
1	206 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	185 $\pm$ 11
4	173 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	156 $\pm$ 14
7	127 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	110 $\pm$ 10
14	109 $\pm$ 12	103 $\pm$ 13

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 右眼。

**2.2 RGC 计数** 双眼 RGCs 的数随着缺血再灌注后时间的延长均逐渐减少, 除 14d 两组 RGCs 数量比较无统计学意外 ( $t = 0.759, P = 0.469$ ), 其余 3 个时间点, rhEPO 治疗眼 (左眼) 存活的 RGCs 数量均多于平衡盐液对照眼 (右眼), 具有统计学意义 ( $t = 2.558, P = 0.034, t = 2.46, P = 0.041, t = 2.824, P = 0.021$ , 表 1)。

## 3 讨论

青光眼、糖尿病视网膜病变、视网膜血管阻塞等疾病都与视网膜的缺氧性损伤有关, 对这类疾病, 目前的致病机制并不完全清楚, 同时也缺乏良好的治疗方法。一直以来 EPO 被认为是一种作用于骨髓造血细胞, 促红系祖细胞增生、分化、成熟的内分泌激素, 但最近的一系列研究表明 EPO 具有重要的促神经元生长和神经元保护的作用<sup>[1]</sup>。RGC 作为中枢神经系统的一个重要组成部分, 对氧的需求要远大于其它神经组织, 但是目前 EPO 在单纯视网膜缺血再灌注方面的相关研究还不多, 而另一方面临床实践中又存在着大量正常眼压下视网膜缺血缺氧性疾病。这些为我们深入研究 EPO 是否在缺氧应激过程中对视网膜具有保护作用提供了临床基础。大鼠正常及缺血后的视网膜内/外核层和 RGC 层都有 EPOR 表达。Yamasaki 等<sup>[2]</sup> 利用逆转录-聚合酶链反应技术进一步证实了 RGC 中 EPO 及 EPOR mRNA 的表达。随后的研究发现, 在增生型糖尿病视网膜病变和视网膜分支静脉阻塞及视网膜脱离等缺血性视网膜病变中, 玻璃体和视网膜中 EPO 浓度大量增加, 认为缺氧可以刺激 EPO 的生成<sup>[3,4]</sup>。而视神经横断实验显示, 增加眼内 EPO 的量或者采用 EPO 转基因小鼠的 RGC 存活数明显高于对照组<sup>[5,6]</sup>。在

大鼠急性高眼压模型中 ip rhEPO 可对视网膜产生保护作用<sup>[7]</sup>,而采用 EPOR 中和眼内 EPO 后则会加重视网膜的损伤。视神经横断实验说明人为切断 RGC 的神经营养作用 EPO 可帮助其较长时间生存,而高眼压模型实验中却没有区分 EPO 是对压力损伤造成的 RGC 具有保护作用还是对单纯阻断了缺血再灌注过程中某一环节而产生细胞保护作用。虽然升高的眼压也能使视网膜眼底动脉暂时性压闭,但外源性液体的注入造成的高眼压及生理盐水本身就可能对眼内组织及 RGC 直接造成损害,但临床中有着大量正常眼压性视网膜缺血疾病。我们用夹闭大鼠视网膜动脉来建立模型,观察单纯视网膜缺血再灌注情况下 EPO 能否对 RGC 产生保护作用。RGC 对视网膜缺血损伤有着较好的代表性,目前研究也最充分,因此我们采用荧光金逆标技术标记 RGC,以正常存活 RGC 数目多少作为判断视网膜损伤程度的依据。FG 通过轴突运输,如过细胞死亡,RGC 无法被标记,而已经标记上的 RGC 如果发生坏死崩解,FG 释出细胞外从而失去细胞染色。因此,我们可以看到活着的 RGC 和胶质细胞吞噬了的 RGC。我们发现,眼内注射 rhEPO 能有效减少急性缺血再灌注中 RGC 的损伤,增加 RGC 存活数量,这与以往类似的实验结论相同<sup>[8,9]</sup>。rhEPO 是通过主动转运的方式进入视网膜,眼内注射 rhEPO 能提高视网膜内 rhEPO 的量,而 rhEPO 具有和天然 EPO 相同的生物学活性。视网膜急性缺氧产生大量兴奋性氨基酸和氧自由基等毒性物质,而注入眼球内的 rhEPO 可能增加了神经细胞中的某些抗氧化酶系从而起到保护细胞的作用。一些研究认为,增多的 EPO 通过降低丙二醛(MDA)水平,来抑制大脑神经元在缺氧时 NO 的产生,或者是通过 PI-3K/AKT 途径抑制细胞凋亡蛋白酶-3 的活性,从而减少了 RGC 的凋亡<sup>[5]</sup>。通过实验,我们考虑 rhEPO 可能缓解了缺血再灌注过程中的某个损伤环节,如对氧自由基和兴奋性氨基酸的中和,从而延缓细胞的凋亡,对 RGC 产生保护作用。但是具体的 EPO 对神经细胞产生保护作用的机制还是不清楚。也有学者认为,EPO 本身的生物特征决定了其在体内的多重

生物学功能,进而通过多种机制调节体内组织机能<sup>[10]</sup>。

虽然目前 rhEPO 在神经保护方面的具体机制还不清楚,但是 rhEPO 作为一种成熟的治疗血液系统疾病的药物应用于临床多年,由于其能通过血-脑屏障和血-视网膜屏障,因此对 EPO 神经保护保护机制的进一步研究可能会对此类疾病的治疗提供一种新的思路和方法,这还需要更多的分子和组织生物学方面的实验。

#### 参考文献

- 1 周卓妍,宋燕燕,林兴会,等. 联合应用促红细胞生成素和粒细胞集落刺激因子对早产鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用. 实用儿科临床杂志 2008;23(6):425-427
- 2 Yamasaki M, Mishima HK, Yamashita H, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res* 2005;1050(1-2):15-26
- 3 Inomata Y, Hirata A, Takahashi E, et al. Elevated erythropoietin in vitreous with ischemic retinal diseases. *Neuroreport* 2004;15(5):877-879
- 4 Xie Z, Wu X, Qiu Q, et al. Expression pattern of erythropoietin and erythropoietin receptor in experimental model of retinal detachment. *Curr Eye Res* 2007;32(9):757-764
- 5 Weishaupt JH, Rohde G, Pölking E, et al. Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(5):1514-1522
- 6 Kilic U, Kilic E, Soliz J, et al. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *FASEB J* 2005;19(2):249-251
- 7 郭燕,王万辉. 促红细胞生成素对急性高血压大鼠视网膜的保护作用. 国际眼科杂志 2007;7(3):688-691
- 8 Zhong L, Bradley J, Schubert W, et al. Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(3):1212-1218
- 9 Wang JM, Song YP, Sun NX, et al. Protection of systemic recombinant human erythropoietin on the ultrastructure of retina and optic nerve in an acute high intraocular pressure rabbit model. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2008;8(11):2221-2223
- 10 Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res* 2004;1000(1-2):19-31