

α -硫辛酸对大鼠视网膜缺血再灌注损伤中 P53 和 Bax 表达的影响

戚雪¹, 庞东渤¹, 赵海雁², 谭歆¹, 黎笑楠¹

基金项目: 中国辽宁省教育厅科学技术研究基金资助项目(No. 2008404)

作者单位:¹(121000) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科;²(111000) 中国辽宁省辽阳市中心医院眼科

作者简介: 戚雪, 女, 硕士, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 庞东渤, 男, 博士, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病. pang2000@163. com

收稿日期: 2010-11-01 修回日期: 2010-12-10

Effect of α -Lipoic acid on Bax and P53 in rat retina after ischemia-reperfusion injury

Xue Qi¹, Dong-Bo Pang¹, Hai-Yan Zhao², Xin Tan¹, Xiao-Nan Li¹

Foundation item: Supported by Liaoning Education Department, China (No. 2008404)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, Liaoyang Central Hospital, Liaoyang 111000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong-Bo Pang, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. pang2000@163. com

Received: 2010-11-01 Accepted: 2010-12-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of α -lipoic acid (α -LA) on the retinal morphology expression of P53 and Bax during retinal ischemia-reperfusion injury.

• **METHODS:** A total of 72 SD rats were randomly divided into normal control group, ischemia-reperfusion model group and LA treatment group. The last two groups were subdivided in group 6 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours after reperfusion. The models of retinal ischemia-reperfusion injury were made by elevating intraocular pressure. Immunohistochemistry and Western-blot were used to measure changes of P53 and Bax protein levels in retinal tissue.

• **RESULTS:** No expression of P53 and Bax positive cells were found in normal group, at the ischemia-reperfusion groups. the expression of P53 and Bax began to increase at 6 hours after reperfusion, at 24 hours reached the peak, began to decrease at 48 hours, and weakened obviously at 72 hours. The therapy groups of α -lipoic acid have the same trend with the ischemic groups in each index, but the expressive intensity of each period weakened in evidence. There was significant difference ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** P53 and Bax play an important role in

the happening of retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI); α -LA can inhibit the expression of P53 and Bax cell apoptosis.

• **KEYWORDS:** α -lipoic acid; retina; ischemia-reperfusion injury; P53; Bax

Qi X, Pang DB, Zhao HY, et al. Effect of α -Lipoic acid on Bax and P53 in rat retina after ischemia-reperfusion injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):37-39

摘要

目的: 观察 α -硫辛酸在大鼠视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 过程中对 P53 和 Bax 表达的影响。

方法: 将 SD 大鼠 72 只随机分成正常组、视网膜缺血再灌注组和 α -硫辛酸干预组。同时后两组根据再灌注的时间不同分成 6、24、48 和 72h 组。通过前房灌注加压的方法制成 RIRI 动物模型, 采用 Western-blot 与免疫组织化学法测定在大鼠 RIRI 模型中的 P53 和 Bax 表达的变化。

结果: P53 和 Bax 在正常视网膜组织中几乎不表达, 在缺血灌注 6h 开始表达, 24h 达到高峰, 48h 开始下降, 72h 后表达已经明显减弱。 α -硫辛酸干预组各观察指标变化趋势基本与缺血再灌注组相似, 但表达明显减弱, 两组间比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

结论: α -硫辛酸可抑制 P53 和 Bax 的表达, 对大鼠 RIRI 有保护作用。

关键词: α -硫辛酸; 视网膜; 缺血再灌注损伤; P53; Bax

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.013

戚雪, 庞东渤, 赵海雁, 等. α -硫辛酸对大鼠视网膜缺血再灌注损伤中 P53 和 Bax 表达的影响. 国际眼科杂志 2011;11(1):37-39

0 引言

视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是临床上广泛关注的问题, 常见于青光眼急性发作降眼压治疗、视网膜血管栓塞性疾病溶栓治疗以及影响视网膜血流的各种眼科手术过程中。研究表明, RIRI 可导致视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 及内核层细胞 (inner nuclear layer, INL) 凋亡^[1]。细胞凋亡受许多基因调控, P53, Bax 基因均为其中重要的凋亡调控基因。 α -硫辛酸 (α -lipoic acid, α -LA) 是丙酮酸脱氢酶的辅助因子, 它使丙酮酸转变为乙酰辅酶 A, 生成 FADH, 是参与三羧酸循环过程中不可缺少的物质^[2]。它也是代谢性的抗氧化剂, 在改善人的体质、抗氧化、糖代谢、糖尿病并发症和其他多种疾病治疗方面倍受关注^[3]。目前的研究主要集中在 α -LA 的抗氧化作用以及在多种疾病中的预防和治理上, 而在缺血再灌注早期, 外源性补充 α -LA 的

抗氧化及抑制凋亡作用的报道多集中在脑和心肌细胞的损伤模型中,对 RIRI 的保护作用国内外报道较少。我们将 α -LA 应用于大鼠 RIRI 模型,探讨 α -LA 对 RIRI 的保护作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年大鼠 SD 72 只,由辽宁医学院实验动物中心提供,雌雄不限,体质量(220 ± 20)g,无眼疾。随机分为 A:正常组 8 只,不做任何处理,常规饲养;B:视网膜缺血再灌注(RIR)组 32 只;C:RIR + α -LA 组 32 只。造模前 3d 开始 ip LA 注射液 100mg/kg,1 次/d,直至处死。再根据造模成功后观察期的不同各分为再灌注后 6,24,48,72 h 组。LA 注射液(亚宝药业太原制药有限公司),SABC 免疫组织化学试剂盒(包括兔抗大鼠 P53 多抗,兔抗大鼠 Bax 多抗、生物素化山羊抗兔抗体,北京中杉生物公司)Trizol,逆转录试剂,蛋白提取液,Biorad 公司的电泳系统、转膜系统和凝胶成像系统等。

1.2 方法 采用前房灌注升高眼压致缺血的方法,以 10g/L 水合氯醛 3mL/kg,ip 麻醉,满意后,将大鼠取俯卧位固定于鼠台上,随机选取每只大鼠一眼造模,复方托吡卡胺散瞳,滴盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉,眼表面麻醉后将连有生理盐水输液瓶灌注的 4.5 号头皮针沿颞侧角巩膜缘刺入大鼠眼前房,针头斜面向上以免损伤虹膜和晶状体,胶布固定头皮针于大鼠同侧耳缘处。缓慢升高输液瓶至与大鼠实验眼垂直距离为 150cm,此时眼压为 110mmHg,可见球结膜及虹膜迅速变白,视网膜苍白,视网膜中央动脉的供血完全阻断。氯霉素滴眼液滴眼以保持角膜湿润并预防感染。持续 60min 后逐渐降低输液瓶高度至动物眼球水平,恢复视网膜血供,关闭输液器拔出前房灌注针头,虹膜及球结膜颜色迅速恢复正常,眼底视网膜呈橘红色,说明阻断的血管重新开放,形成再灌注,即为 RIR 模型建立成功。术毕结膜囊涂红霉素眼膏,待清醒后回笼。缺血再灌注后 6,24,48,72h 处死动物,摘除眼球。生理盐水冲洗,每组取 4 只大鼠分离出视网膜,放入 1.5mL EP 管,-80℃冷冻保存。剩下每组 4 只通过颈动脉灌注固定(固定液使用 40g/L 中性甲醛)约 30min,取出眼球继续浸泡固定于 40g/L 中性甲醛溶液中过夜,取出后用流水缓慢冲洗 2h。乙醇梯度脱水。二甲苯透明石蜡包埋备用。

1.2.1 Western-blot 测定 P53 和 Bax 蛋白的表达 Western-blot 技术转移蛋白和比较不同样本中 P53 和 Bax 的含量,取冷冻的大鼠视网膜提取蛋白,并进行蛋白含量测定。上样后进行电泳、转膜。一抗 4℃ 孵育过夜,用 PBS 洗膜 3 次后,加入二抗孵育 1h,PBS 洗膜 3 次后。将显色试剂盒内的 NBT 与 BCIP 等体积混合,均匀滴在 PVDF 膜上,进行发光、显影、定影。

1.2.2 SABC 免疫组织化学法测定 P53 和 Bax 蛋白表达 切片常规脱蜡后,0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液中进行热修复抗原,滴加体积分数 30mL/L H₂O₂,室温处理 15min 灭活内源性酶。滴加 50g/L 山羊血清封闭液封闭 15min。一抗 4℃ 孵育过夜,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 水浴 30min,DAB 显色。苏木素轻度复染,脱水、透明、中性树脂胶封片后显微镜下观察。设阴性对照:以 PBS 代替一抗,其余步骤不变。

统计学分析:采用 SPSS 16.0 分析软件对组间不同时间点作单因素方差分析,数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

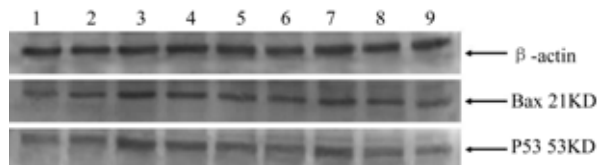


图 1 大鼠视网膜 Bax 和 P53 的表达 1:正常组;2:RIR 6h 组;3:RIR 24h 组;4:RIR 48 h 组;5:RIR 72h 组;6:RIR + α -LA 6h 组;7:RIR + α -LA 24h 组;8:RIR + α -LA 48h 组;9:RIR + α -LA 72h 组。

表 1 大鼠 Bax 和 P53 的蛋白表达(电泳条带 A/内参积分 A)

| | | $\bar{x} \pm s$ | | |
|-----|-----|----------------------------|---------------|----------------------------|
| | t/h | Normal | RIR | RIR + α -LA |
| Bax | 6 | 0.232 ± 0.047 ^b | 0.358 ± 0.012 | 0.287 ± 0.003 ^a |
| | 24 | 0.231 ± 0.041 ^b | 0.552 ± 0.024 | 0.486 ± 0.034 ^b |
| | 48 | 0.232 ± 0.039 ^b | 0.477 ± 0.014 | 0.343 ± 0.007 ^b |
| | 72 | 0.228 ± 0.027 ^b | 0.414 ± 0.021 | 0.285 ± 0.002 ^b |
| P53 | 6 | 0.412 ± 0.019 ^b | 0.467 ± 0.010 | 0.433 ± 0.009 |
| | 24 | 0.419 ± 0.024 ^b | 0.854 ± 0.074 | 0.675 ± 0.022 ^b |
| | 48 | 0.389 ± 0.016 ^b | 0.668 ± 0.058 | 0.544 ± 0.027 ^a |
| | 72 | 0.406 ± 0.023 ^b | 0.613 ± 0.011 | 0.233 ± 0.005 ^b |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs RIR 组。

2 结果

2.1 Western-blot 法中 P53 和 Bax 表达的改变 在正常大鼠视网膜中均检测到了 P53 和 Bax 蛋白的表达,RIR 各时间段 P53 和 Bax 的表达均比正常组升高,RIR + α -LA 组 P53 和 Bax 的表达较正常组高,但比 RIR 组低(图 1)。除了 P53 在 RIR 6h 组和 RIR + α -LA 6h 组间比较没有显著统计学差异外,其余 RIR + α -LA 组与 RIR 组各时间段的 Bax 和 P53 的蛋白表达结果比较,差异均有显著统计学意义,RIR 24h P53 和 Bax 比正常组表达升高,RIR + α -LA 组比 RIR 组明显下降($P < 0.05$,表 1)。

2.2 P53 和 Bax 免疫组织化学结果 P53 阳性表达为黄色或棕黄色染色,位于细胞核内。正常大鼠视网膜组织中几乎没有 P53 蛋白表达,RIR 6h 开始在 RGC 有少量表达,每高倍视野(21.9 ± 0.7)个,24h 达到高峰,此时除了在 RGC 及 NFL 有强表达外,IPL 也有散在表达,每高倍视野(51.3 ± 1.1)个,48h 组仍持续强表达,每高倍视野(41.6 ± 1.0)个,72h 组已经明显下降,但是较正常组为高,每高倍视野(31.5 ± 1.2)个,阴性对照组未见阳性染色。RIR + α -LA 组相应各时间段 P53 阳性表达较 RIR 组减弱,6h 组为每高倍视野(19.0 ± 0.8)个,24h 组每高倍视野(45.1 ± 1.0)个,48h 组每高倍视野(31.2 ± 0.8)个,72h 组每高倍视野(24.6 ± 0.8)个。RIR + α -LA 组与 RIR 组各时间段的 P53 蛋白阳性表达结果进行比较,差异均有显著统计学意义($P < 0.01$,图 2)。Bax 蛋白阳性表达为黄色或棕黄色染色,主要位于细胞质中。正常组视网膜组织中几乎无 Bax 蛋白阳性表达,RIR 6h 开始在 RGC 有少量表达,每高倍视野(20.9 ± 1.8)个,再灌注后 24h 阳性表达量显著,GCL、内丛状层、INL 及 NFL 均可见棕黄色染色,每高倍视野(41.4 ± 3.3)个,再灌注后 48h 表达下降,每高倍视野(37.1 ± 1.6)个,再灌注后 72h 表达量变少,但仍比正常组高,每高倍视野(24.1 ± 1.1)个。阴性对照组未见阳性染色。RIR + α -LA 组各时间段 Bax 蛋白表达较 RIR 组有所下降,相应时间段每高倍视野阳性细胞数分别为 18.3 ± 0.9,33.6 ± 1.2,30.3 ± 0.7,20.5 ± 1.1。RIR + α -LA

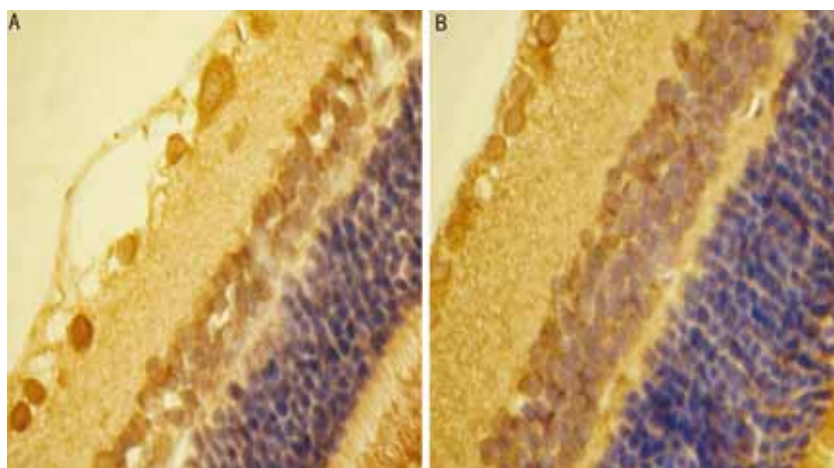


图2 大鼠视网膜 P53 蛋白表达 (SABC ×400) A: RIR 24h 组; B: RIR + α -LA 24h 组。

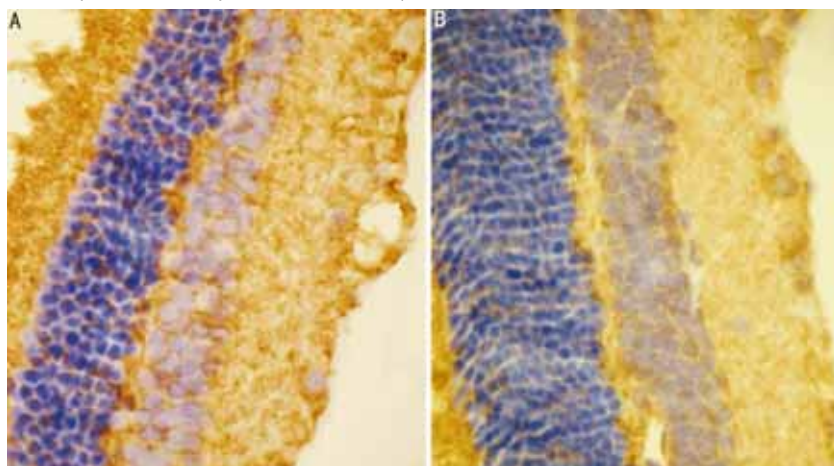


图3 大鼠视网膜 Bax 蛋白表达 (SABC ×400) A: RIR 24h 组; B: RIR + α -LA 24h 组。

组与 RIR 组各时间段的 Bax 蛋白阳性表达结果进行比较, 差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3)。

3 讨论

RIR 是青光眼、视网膜中央动脉及静脉栓塞等眼病的重要病理机制。有研究证实, RIR 是通过诱发细胞凋亡引起神经元死亡所致^[1], 最终的结局均是 RGC 的凋亡。P53 和 Bax 为其中重要成员, 体外实验和动物实验证实, 神经细胞发生凋亡时伴随着 P53 基因高水平的表达, 应用 P53 基因的抑制物可防止细胞凋亡, 提示 P53 基因在神经细胞凋亡过程中起重要作用。Bax 基因位于染色体 19q13.3 ~ 13.4, 含有 6 个外显子, 许多学者提出 Bax 是受 P53 调控的下游基因, 有研究证明 P53 可能依赖 Bax 通过诱导神经节细胞凋亡, 参与了 RIRI 的发生^[4,5]。

LA 是一种高效亲脂的自由基清除剂, 在水相和脂质相中溶解性较好, 外源性 α -LA 可在体内转化为二氢硫辛酸, 后者可以进一步清除超氧自由基、过氧自由基, 修复自由基引起的脂质过氧化对细胞膜的伤害, 减轻机体损伤。我们的实验运用 Western-blot 法和免疫组织化学法检测 RIR 组与 RIR + α -LA 组视网膜组织发现: Bax 和 P53 蛋白在 RIR 后 6h 即有表达, 24h 达到高峰, 48h 开始下降, 但仍维持较高的水平, 至 72h 明显减少, 与文献研究结果相似^[6]。同 RIR 组在 24h 与 48h 两个时间段比较, RIR + α -LA 组 P53 及 Bax 表达均明显减弱, 提示 LA 具有一定的抗调

亡作用, 并且可能与抑制 P53 及 Bax 蛋白的表达有关。其它时间段虽有减少, 但差异无显著性, 可能由于其表达不是很强导致。而 P53 蛋白、Bax 表达明显降低可能是 LA 治疗 RIRI 的作用机制之一, 因为 P53 和 Bax 蛋白在 RIRI 中的变化有相似的趋势, 而二者都与细胞凋亡有关系。综合上述研究, LA 对 RIRI 有一定的保护作用, 这一保护作用可能是直接抑制 P53 和 Bax 蛋白的表达, 或者通过其抗氧化作用间接抑制 P53 和 Bax 蛋白的表达从而达到抑制 RIRI 中 RGC 的凋亡, 但目前 LA 对 RIR 损伤抑制作用的具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. Brain response to injury and neurodegeneration; endogenous neuroprotective signalling. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053:137
- 2 吕玉刚, 胡卫国. 体操. 北京: 北京体育大学出版社 2007; 42
- 3 Bian ZM, Elnor SG, Elnor VM. Thrombin-induced VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48 (6): 2738-2746
- 4 王新月, 马静. 缺血-再灌注损伤后视网膜形态学改变和 Bcl-2/Bax 表达. *医学新知杂志* 2007; 17(4): 1004-511
- 5 张薇, 许建华, 李若溪. Wortmannin 对视网膜缺血再灌注后 HIF-1 α 表达的影响. *中国误诊学杂志* 2008; 8(5): 1019
- 6 毕燃, 庞东渤. α -硫辛酸对视网膜缺血再灌注损伤中 Caspase-3 表达的影响. *眼科新进展* 2008; 28(9): 665-670