

白藜芦醇对兔急性高眼压视网膜节细胞 NF- κ B 表达和 IL-6 浓度的影响

韩 昀, 鲁建华, 张文芳, 律 鹏

作者单位:(730030) 中国甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院眼科
作者简介:韩昀,女,在读硕士研究生,住院医师,研究方向:角膜病、青光眼。

通讯作者:鲁建华,男,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:角膜病、青光眼. lujianhua266@sina. com

收稿日期:2011-04-01 修回日期:2011-05-05

Effect of resveratrol on expression of NF- κ B and IL-6 concentration in acute ocular hypertension rabbits model

Yun Han, Jian-Hua Lu, Wen-Fang Zhang, Peng Lü

Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Jian-Hua Lu. Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. lujianhua266@sina. com

Received:2011-04-01 Accepted:2011-05-05

Abstract

• AIM: To observe the effect of resveratrol on expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and IL-6 concentration in acute ocular hypertension rabbits model.

• METHODS: The New Zealand rabbits were randomly divided into treated group, control group and normal group. Before setting up the model of acute high intraocular pressure, the resveratrol 30mg/kg (3mL) was injected into abdominal cavity of treated group's rabbits for 7 days, an acute ocular hypertension model of 90 mmHg (1kPa = 7.5mmHg) was induced after 90 minutes' anterior chamber infusion at the eighth day. Specimen was obtained at 24 hours after the ocular hypertension. In control group normal saline was used instead of resveratrol; For the normal group, specimen was obtained without the above treatment. The specimen was removed for microscopic examination, and the expression of NF- κ B was studied by immunohistochemical examination, and blood serum was collected to detect IL-6 concentration.

• RESULTS: Compared with the normal group, the expression of NF- κ B in retinal ganglial cells (RGC) and IL-6 concentration in treated group and control group were significantly up-regulated; Compared with the control group, the expression of NF- κ B in RGC and IL-6 concentration in treated group were significantly decreased.

• CONCLUSION: Through decreasing the expression of NF- κ B and IL-6 concentration, resveratrol can reduce the RGC damages. It may play a protective role on the retina in glaucoma pathology.

• KEYWORDS: resveratrol; acute ocular hypertension; nuclear factor-kappa B; interleukin-6

Han Y, Lu JH, Zhang WF, et al. Effect of resveratrol on expression of NF- κ B and IL-6 concentration in acute ocular hypertension rabbits model. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(6):958-960

摘要

目的:观察白藜芦醇(resveratrol, Res)对兔急性高眼压条件下视网膜节细胞(retinal ganglial cells, RGC)核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)表达及血清中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)浓度的影响。

方法:将新西兰大白兔随机分成处理组、对照组和正常组。处理组于急性高眼压模型建立前7d,每天给予 Res 30mg/kg(3mL) ip,第8d经前房灌注升高眼压达90mmHg(1kPa = 7.5mmHg),持续90min,24h后取材;对照组用等剂量的生理盐水代替 Res 给予 ip,余同处理组;正常组不做上述处理直接取材。观察兔视网膜组织病理学结果,免疫组织化学检测 RGC 中 NF- κ B 表达及血清中 IL-6 浓度的变化。

结果:与正常组相比,处理组和对照组表达在 RGC 的 NF- κ B 明显增加,外周血清中 IL-6 浓度明显增高($P < 0.05$);与对照组相比,处理组 NF- κ B 的表达明显减少,外周血清中 IL-6 浓度明显降低($P < 0.05$)。

结论:Res 通过降低兔急性高眼压 RGC 中 NF- κ B 的表达和血清中 IL-6 浓度,减轻 RGC 的损伤,对视网膜具有一定的保护作用。

关键词:白藜芦醇;急性高眼压;核因子- κ B;白细胞介素-6
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.06.006

韩昀,鲁建华,张文芳,等.白藜芦醇对兔急性高眼压视网膜节细胞 NF- κ B 表达和 IL-6 浓度的影响.国际眼科杂志 2011;11(6):958-960

0 引言

视网膜神经节细胞(retinal ganglial cells, RGC)死亡是青光眼视神经损伤的最终共同通路,由于控制眼压有时并不能完全阻止视神经的损伤,很多研究者正试图寻找能阻断或延缓 RGC 原发性(和)继发性损伤的方法。目前这一领域的研究包括谷氨酸拮抗剂、钙通道阻滞剂、抗氧化剂、NO 合成酶抑制剂、神经营养、凋亡抑制剂、疫苗等。

白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种具有抗炎、抗氧化、清除自由基、抗凋亡等多种药理作用的多酚类化合物,陈媛媛等^[1]研究发现,白藜芦醇可通过抑制缺血再灌注脑损伤后神经元的凋亡发挥保护作用,但国内外关于 Res 对兔急性高血压 RGC 中 NF- κ B 表达的影响尚未见报道,我们通过建立兔急性高血压模型,初步研究高血压致兔 RGC 中 NF- κ B 的活化表达及血清中 IL-6 浓度变化,并探讨 Res 对 NF- κ B 表达及 IL-6 浓度的影响,为 Res 可能的青光眼视神经保护提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 成年新西兰大白兔 24 只,购自兰州大学医学院实验中心,体质量 1.4~2.1kg,雌雄不限。随机分为 3 组:处理组 8 只,Res 30mg/kg ip;对照组 8 只,等剂量的生理盐水 ip;正常组不做任何处理。Res 购自 Sigma 公司,用二甲基亚砜溶解。羊抗兔 NF- κ B 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。主要仪器包括:TONOPEN 眼压计(Medtronic Solan 公司)、Image pro-plus 6.0 软件系统图像分析系统和 Olympus 光学显微镜。

1.2 方法 预处理和急性高血压模型的建立:处理组于急性高血压模型建立前 7d,每天 8:00 给予 Res 30mg/kg ip,连续 7d,第 8d 用 30g/L 的戊巴比妥钠耳缘静脉注射,剂量约 30mg/kg(即 1mL/kg)麻醉后,选右眼做高血压灌注眼,用 4 号静脉输液针头作前房穿刺,输液器接生理盐水,血压计加压维持所需眼压,持续 90min;对照组:等剂量生理盐水 ip,余同处理组;正常组:不做任何处理。急性高血压结束后 24h,经下腔静脉采血 3mL,以 1500r/min 离心 15min,吸取上清液,-20℃冻存,采用 ELISA 法测定血清中 IL-6 的浓度。采血后处死动物,立即完整摘除眼球,并在 6:00 位角膜缘缝线标记,中性甲醛固定,常规乙醇梯度脱水,平行于视神经纵行剖开眼球,二甲苯透明、浸蜡、包埋,常规石蜡连续切片,行 HE 染色及免疫组织化学染色,观察 RGC 病理学变化及视网膜上 NF- κ B 的表达,NF- κ B 阳性表达为胞核染色呈黄褐色,用 Image pro-plus 6.0 软件系统图像分析系统测定光密度值(OD 值),每张切片取 3 个视野,计算平均 OD 值,以 OD 值表示 NF- κ B 的表达。

统计学分析:实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,多组间均数的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RGC 病理学变化 200 倍光镜下,每张切片随机取 10 个视野,HE 染色观察 RGC,正常组眼 RGC 呈单层排列,细胞大小不一,轮廓不规则,核深染,细胞边界清晰,细胞排列整齐紧密;处理组眼 RGC 数目减少,形态大致正常,内外核层出现少量细胞丢失,局部有轻度空泡样改变,内核层厚度与对照眼无明显区别;对照组眼光镜下可见 RGC 数目明显减少,RGC 层呈空泡样改变,部分细胞出现核溶解、核染色浅淡、胞浆染色浅淡。

2.2 RGC 中 NF- κ B 免疫组织化学表达 与正常组相比,处理组和对照组表达在 RGC 的 NF- κ B 明显增加($P < 0.05$);与对照组相比,处理组 NF- κ B 的表达明显减少($P < 0.05$,表 1)。

2.3 血清中 IL-6 的浓度值 与正常组相比,处理组和对照组血清中 IL-6 的浓度明显增高($P < 0.05$);与对照组相

表 1 各组兔视网膜 NF- κ B 表达及血清 IL-6 浓度的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	NF- κ B	IL-6 (ng/L)
正常组	8	0.86 \pm 0.21	7.62 \pm 0.18
对照组	8	3.84 \pm 0.14 ^a	12.84 \pm 0.36 ^a
处理组	8	2.09 \pm 0.32 ^{a,c}	9.43 \pm 0.21 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组。

比,处理组血清中 IL-6 的浓度明显降低($P < 0.05$,表 1)。

3 讨论

青光眼是由于眼压增高和低血流灌注注等多因素引起的视神经损害的一组不可逆性致盲眼病,研究结果表明,青光眼的视神经改变是一种视神经病变,原因有多种,但均表现为 RGC 的死亡^[2]。这一 RGC 的死亡过程是一种缓慢的凋亡过程,具体可分为两个阶段:第一阶段是缺血、缺氧造成的细胞损害;第二阶段是受损的退变细胞释放有害物质引起基质的改变和损伤。李琳玲等^[3]研究发现,金丝桃素能减缓兔急性高血压视网膜谷氨酸水平的升高,减轻 RGC 的凋亡,对视网膜具有一定的保护作用。Res 化学名称为 3,4,5-三羟基苯二烯,是一种广泛存在于葡萄、虎杖、花生、决明等植物性食物或药物中的多酚类化合物。研究显示^[4,5],Res 具有抗炎、抗氧化、清除自由基等多种药理作用。Luna 等^[6]研究发现,Res 预处理可以有效地减少原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma,POAG)炎性介质和氧化应激物的产生,并且可以有效地阻止 POAG 小梁网组织的损害。

本实验采用前房内灌注生理盐水制造兔急性高血压模型^[7],观察 Res 预处理对兔急性高血压 RGC 的作用,结果表明,Res 预处理后 RGC 的数量和形态得到较好的保留,视网膜内层厚度和视网膜的形态和结构损伤明显减轻。该实验证明,Res 对兔急性高血压下视网膜具有较强的保护作用。

青光眼导致视功能损害的病理基础主要是 RGC 的凋亡和神经纤维的丧失,其中 RGC 的凋亡是青光眼造成视神经损伤的主要机制之一,研究 RGC 凋亡的发生机制,保护视神经是青光眼治疗的重要目的。近年来研究表明^[8],NF- κ B 在细胞凋亡和抗凋亡作用中发挥着极其重要的作用,NF- κ B 为 P50 和 P65 两个亚单位组成的异源二聚体,无适当刺激时,NF- κ B 在胞浆内与一种抑制性蛋白 I κ B 结合呈非活性状态,它可以被许多刺激剂激活,如病毒、细胞因子、氧化剂、蛋白激酶 C 激活剂、免疫刺激剂以及脂多糖、紫外线等。一旦被激活,NF- κ B 即与 I κ B 解离,转入核内与特异的启动子或增强子上相应的结合位点结合,从而调控基因的表达,参与细胞的凋亡。张琪等^[9]报道 NF- κ B 与 RGC 凋亡可能有密切关系,其具体机制可能与 NF- κ B 刺激凋亡诱导基因及死亡受体 4 和 5 的表达,以及直接诱导 IL-1, TNF- α 及 iNOS 等具有促进细胞凋亡的炎症介质和酶的转录有关^[10]。本实验发现,对照组家兔 RGC 的 NF- κ B 表达明显增多,给予 Res 预处理后,其表达明显降低,提示 Res 可能通过抑制 NF- κ B 的表达而对高血压视网膜损害有保护作用。

IL-6 最初是作为 B 细胞的分化因子被认识的,目前发现 IL-6 是一种具有多种功能的细胞因子,它能够调节免疫应答及血细胞的发生,在急性炎症的反应期和慢性炎症过程中均起到不同的作用。Sanchez 等^[11]对 IL-6 的内

源性神经保护机制研究发现,缺血再灌注损伤后视网膜内的IL-6以及IL-6R水平均有所上调。Sappington等^[12]研究发现,视网膜小胶质细胞在持续高的压力下可分泌大量的IL-6参与RGC的凋亡过程,2a后又发现这种高眼压通过视网膜小胶质细胞内Ca²⁺的内流从而激活NF-κB,进而引起IL-6的释放^[13]。本实验发现,对照组家兔血清中IL-6的浓度明显增高,而Res预处理组IL-6的浓度明显降低,提示持续的高眼压可能通过激活RGC的NF-κB表达,进而激发小胶质细胞释放大量的IL-6,而Res可能通过抑制NF-κB的活化,从而减少了IL-6的释放,对高眼压致视网膜损害有保护作用。Res提取方便,原材料易获得,因此,它潜在的临床应用价值,可能成为青光眼视神经保护的一种新型药物,但其确切的作用机制及药代动力学、毒性作用等还需要进一步研究。

参考文献

- 1 陈媛媛,王兴勇,胡语航,等.白藜芦醇对缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的影响.重庆医科大学学报 2007;32(11):1147-1149
- 2 Wein FB, Levin LA. Current understanding of neuroprotection in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2002;13(2):61-67
- 3 李琳玲,姜发纲,李双.金丝桃素对兔急性高眼压视网膜的保护作用.眼科新进展 2007;27(12):900-903
- 4 Das S, Falchi M, Bertelli A, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by the anti-inflammatory action of resveratrol. *Arzneimittelforschung* 2006;56(10):700-706
- 5 杨迎暴,罗景慧,徐江平,等.白藜芦醇对fMLP诱导中性白细胞与人脐静脉内皮细胞粘附的抑制作用及机制.中国药理学通报 2007;23(12):1588-1593
- 6 Luna C, Li G, Liton PB, et al. Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Food Chem Toxicol* 2009;47(1):198-204
- 7 归东梅,高殿文,徐洪斌,等.急性高眼压状态大鼠视网膜一氧化氮及其合酶变化的研究.中华眼底病杂志 2001;17(3):230-233
- 8 Boileau TW, Bray TM, Bomser JA. Ultraviolet radiation modulates nuclear factor kappa B activation in human lens epithelial cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(2):108-113
- 9 张琪,李平华.核转录因子NF-κB与青光眼关系的研究进展.国际眼科杂志 2006;6(4):840-843
- 10 Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol* 2002;35(1):28-40
- 11 Sanchez RN, Chan CK, Garg S, et al. Interleukin-6 in retinal ischemia reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(9):4006-4011
- 12 Sappington RM, Chan M, Calkins DJ. Interleukin-6 protects retinal ganglion cells from pressure-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(7):2932-2942
- 13 Sappington RM, Calkins DJ. Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFκappaB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(7):3004-3017