

# 外源性 H<sub>2</sub>S 预处理对大鼠 RIRI 细胞凋亡的影响

刘朋朋, 张琦

作者单位: (121000) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 刘朋朋, 女, 硕士, 研究方向: 眼外伤。

通讯作者: 张琦, 女, 硕士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼外伤。Prozhangqi2008@126.com

收稿日期: 2011-10-08 修回日期: 2011-11-11

## Effect of exogenous hydrogen sulfide preconditioning on cell apoptosis in rat retinal ischemia-reperfusion injury

Peng-Peng Liu, Qi Zhang

Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Qi Zhang. Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. Prozhangqi2008@126.com

Received: 2011-10-08 Accepted: 2011-11-11

### Abstract

• AIM: To explore the effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on cell apoptosis and expression of Bcl-2/Bax in rat retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI).

• METHODS: A total of 54 SD rats were randomly divided into normal control group, ischemia-reperfusion model group and sodium hydrosulfide (NaHS) treatment group, the last two groups were subdivided into group 6, 24, 48, 72 hours after reperfusion. The models of RIRI were made by elevating intraocular pressure. Apoptosis was assessed by the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling method, and the expression of Bcl-2/Bax was studied by immunohistochemistry.

• RESULTS: There was a significant number of TUNEL positive cells 6 hours after transient ischemia peaked at the 24 hours, followed by a decrease at the 48 hours. Compared with RIRI group, Bcl-2 protein expression was increased, Bax protein level were decreased in NaHS group (all  $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: H<sub>2</sub>S can enhance the expression of Bcl-2, decrease the expression of Bax, increase the Bcl-2/Bax ratio and decrease the apoptosis of ganglion cells. H<sub>2</sub>S shows a significant protection for retinal ganglion cells with RIRI.

• KEYWORDS: hydrogen sulfide; retina; ischemia-reperfusion injury; cell apoptosis; Bcl-2; Bax

Liu PP, Zhang Q. Effect of exogenous hydrogen sulfide preconditioning on cell apoptosis in rat retinal ischemia-reperfusion injury. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(1):33-35

### 摘要

目的: 探讨气体信号分子硫化氢 (H<sub>2</sub>S) 对大鼠视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 过程中细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响。

方法: 以硫化钠 (NaHS) 作为 H<sub>2</sub>S 的供体。将 54 只 SD 大鼠随机分成正常组、视网膜缺血再灌注损伤组 (RIRI 组) 及硫化钠 (NaHS) 干预组, 后两组进一步分为再灌注后 6, 24, 48, 72h 组。采用前房灌注加压的方法建立 RIRI 模型, TUNEL 法检测视网膜神经细胞凋亡, 免疫组织化学法检测视网膜组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。

结果: 细胞凋亡出现于缺血灌注后 6h, 并逐渐递增, 24h 达到高峰, 48h 开始下降。与 RIRI 组比, NaHS 组 Bcl-2 蛋白表达增多, Bax 蛋白表达减少 (均  $P < 0.05$ )。

结论: H<sub>2</sub>S 预处理可通过上调 Bcl-2 蛋白表达、下调 Bax 蛋白表达、升高 Bcl-2/Bax 比值从而调控细胞凋亡, 对大鼠 RIRI 进行保护作用。

关键词: 硫化氢; 视网膜; 缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.01.10

刘朋朋, 张琦. 外源性 H<sub>2</sub>S 预处理对大鼠 RIRI 细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志 2012;12(1):33-35

### 0 引言

视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是临床上常见的眼病, 常见于青光眼、视网膜血管栓塞性疾病及影响视网膜血流的各种眼科手术过程中。其结果主要导致视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 及内核层细胞凋亡<sup>[1]</sup>。而细胞凋亡过程受到许多基因调控, Bcl-2/Bax 基因均为其中重要的凋亡调控基因。近年来, 随着对机体内源性气体信号分子的研究, 硫化氢 (H<sub>2</sub>S) 成为继内源性一氧化氮 (nitric oxide, NO)、一氧化碳 (carbon monoxide, CO) 之后人们所关注的第 3 个气体信号分子。H<sub>2</sub>S 可减轻心、肝、脑和肠等脏器的缺血再灌注损伤已得到证实, 但有关 H<sub>2</sub>S 在 RIRI 中的作用的研究报道尚少见。本实验以硫化钠 (sodium hydrosulfide, NaHS) 作为 H<sub>2</sub>S 的供体, 建立大鼠 RIRI 模型, 观察其对 RIRI 的影响, 初步探讨其作用机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 SD 大鼠 54 只 (由辽宁医学院实验动物中心提供), 雌雄不限, 体质量 200 ~ 240g。硫化钠

(NaHS, 美国 Sigma 公司); SABC 免疫组织化学试剂盒(包括 Bcl-2/Bax 兔抗大鼠多克隆抗体、生物素化山羊抗兔抗体、DAB 显色试剂盒, 北京中杉生物公司)。TUNEL 试剂盒(南京凯基生物有限公司), CIAS-1000 图像分析系统。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 大鼠随机分为正常组、视网膜缺血再灌注模型组(RIRI 组)及 NaHS 干预组(RIRI + NaHS 组), 后两组根据再灌注时间又分为 6, 24, 48, 72h 组, 每组 6 只。RIRI + NaHS 组, 分别用 50 $\mu$ mol/kg 不同剂量的 NaHS 进行 ip, 连续 5d, 造模前 15min 再次给药; 正常组和 RIRI 组同时同方法给与生理盐水 1mL/kg。

**1.2.2 模型建立** 采用前房灌注升高眼压方法建立大鼠 RIRI 模型。大鼠称质量, 以 100mL/L 水合氯醛 3mL/kg ip 麻醉。满意后, 将大鼠俯卧位固定于鼠台上, 随机取每只大鼠的一眼造模, 复方托吡卡胺散瞳, 滴盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉, 然后将连有生理盐水输液瓶的 4 号半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。缓慢升高输液瓶至与实验眼垂直距离为 150cm 处, 此时眼压为 110mmHg, 并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。持续 60min 后逐渐降低输液瓶高度至动物眼球水平使眼内压缓慢降低, 恢复视网膜血供, 关闭输液器拔出针头, 虹膜及球结膜颜色迅速恢复正常, 眼底视网膜呈橘红色, 阻断的血管重新开放, 形成再灌注, 即为 RIRI 模型建立成功。实验过程中点氯霉素滴眼液以保持角膜湿润及预防感染。术毕结膜囊涂红霉素眼膏, 待清醒后回笼。再灌注后分别于 6, 24, 48, 72h 处死动物。麻醉方法与造模时相同, 麻醉后暴露颈动脉, 以注射针向头部方向注入固定液(40g/L 中性甲醛), 同时开放对侧颈静脉作为固定液的出口, 灌流固定时间约 30min, 取眼球继续浸泡固定于 40g/L 中性甲醛溶液中过夜。将组织从固定液中取出并流水缓慢冲洗 2h。乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋备用。

**1.2.3 凋亡细胞的检测** 采用原位细胞凋亡检测法(TUNEL)检测细胞凋亡, 按试剂盒步骤检测, 具体步骤如下: 将切片常规脱蜡; 滴加 20 $\mu$ g/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 作用 30min; PBS 洗 3 次; 在用 PBS 配制的 30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10min, 随后用 PBS 洗 3 次; 25 $\mu$ L/片加生物素标记液, 按每张切片取末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT) 1 $\mu$ L 和生化素-dUTP 48 $\mu$ L, 混匀。除去多余液体后加 25 $\mu$ L/片标记液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min; PBS 洗 1 次, 滴加 0.2mL 标记反应终止液, 室温孵育 10min; PBS 洗 3 次; 加 50 $\mu$ L 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(Streptavidin-HRP)工作液(按 Streptavidin-HRP 1 $\mu$ L 和 Streptavidin-HRP 稀释液 49 $\mu$ L/片), 室温孵育 30min 后, PBS 洗 3 次; DAB 显色; 苏木素复染; 脱水, 透明, 中性树胶封片, 显微镜观察(设阴性对照: 以 PBS 代替标记液, 其余步骤不变)。阳性凋亡神经节细胞核或细胞质呈棕黄色染色, 应用 CIAS-1000 图像分析系统, 每份标本取 3 张切片, 每张切片取 4 个视野, 每个视野面积 0.2mm $\times$ 0.2mm, 计数视野中 200 个细胞并记录各组不同时间的细胞凋亡平均发生率, 即凋亡指数(apoptotic index, AI), AI = 凋亡细胞数/细胞总数 $\times$ 100%。

表 1 RIRI 后不同观察时段细胞凋亡指数 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

时段	RIRI 组	RIRI + NaHS 组
6h	2.54 $\pm$ 0.14	1.31 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
24h	27.73 $\pm$ 2.19	18.45 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>
48h	16.45 $\pm$ 0.76	8.94 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>
72h	6.93 $\pm$ 0.27	4.41 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs RIRI 组。

## 1.2.4 SABC 免疫组织化学法测定 Bcl-2/Bax 蛋白表达

将切片放于硅化防脱载玻片上, 60 $^{\circ}$ C 温箱烤片 1h 备用。切片常规脱蜡, 热修复抗原; 微波炉预热 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH = 6.0), 将切片浸入抗原修复液中 10min, 火力 80 $^{\circ}$ C, 停后闷 10min 开盖自然冷却。滴加体积分数 30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 室温 15min 灭活内源性酶。滴加一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。取出室温静置 2h, 滴加二抗(生物素化山羊抗兔 IgG), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。滴加试剂 SABC, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。DAB 显色。苏木素轻度复染, 脱水、透明、中性树胶封片后显微镜观察。阴性对照: 用 PBS 代替一抗, 其余步骤相同。Bcl-2/Bax 阳性表达为细胞膜或细胞质呈黄色或棕黄色染色。应用 CIAS-1000 图像分析系统对结果进行分析(每张切片取 4 个视野, 每个视野面积为 0.2mm $\times$ 0.2mm, 以视神经为基准分别向两侧各取 2 个视野), 得到平均阳性细胞数。

统计学分析: 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间不同时间点作单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 H<sub>2</sub>S 对视网膜细胞凋亡的影响** 正常大鼠视网膜未见凋亡细胞。再灌注后 6h 即可见神经节细胞凋亡, 24h 明显增加, 达到了高峰, 全层均可见。48h 可见凋亡细胞开始减少, 72h 仍然有阳性表达。RIRI + NaHS 组各时间段 AI 较 RIRI 组均有所下降, H<sub>2</sub>S 可明显抑制细胞凋亡, RIRI + NaHS 组与 RIRI 组各时段 AI 差异均有统计学意义(均为 P < 0.01, 表 1)。

**2.2 H<sub>2</sub>S 对视网膜 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响** 正常组视网膜组织中无 Bcl-2 蛋白表达。RIRI 6h 组视网膜中 Bcl-2 蛋白有较高表达, 全层均可见, 每高倍视野 40.43  $\pm$  1.39 个; 再灌注 24h Bcl-2 蛋白表达明显下降, 每高倍视野 30.45  $\pm$  1.49 个; 再灌注 48h Bcl-2 蛋白表达继续下降, 每高倍视野 26.14  $\pm$  1.09 个; 再灌注 72h Bcl-2 蛋白仍有表达, 每高倍视野 20.97  $\pm$  1.48 个。RIRI + NaHS 组各时间点 Bcl-2 蛋白表达趋势同 RIRI 组, 但各时间点 Bcl-2 表达水平均高于 RIRI 组, 相应时间点每高倍视野阳性细胞数分别为 47.30  $\pm$  1.07, 36.10  $\pm$  0.86, 33.61  $\pm$  0.70, 25.29  $\pm$  0.70 个, 两组间各时间点的 Bcl-2 蛋白阳性表达结果比较, 差异均具有统计学意义(均为 P < 0.01)。正常组视网膜组织中几乎无 Bax 蛋白表达。RIRI 6h 组视网膜中 Bax 蛋白有表达, 每高倍视野 20.20  $\pm$  1.76 个; 再灌注 24h Bax 蛋白表达达到高峰, 每高倍视野 41.20  $\pm$  2.53 个; 再灌注 48h Bax 蛋白表达开始下降, 每高倍视野 37.13  $\pm$  0.83 个; 72h 组表达较 48h 降低, 但仍维持高表达, 每高倍视野 24.11  $\pm$  0.27 个。RIRI + NaHS 组各时间点 Bax 蛋白表达趋势同 RIRI 组, 但各时间点 Bax 表达水平均低于 RIRI 组, 相应时间点每高倍视野阳性细胞数分别为 17.98  $\pm$

0.42, 34.15 ± 0.83, 30.21 ± 0.73, 20.30 ± 0.51 个, 两组间各时间点的 Bax 蛋白阳性表达结果进行比较, 差异均具有统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。再灌注后 6h Bcl-2/Bax 比率较高, 24, 48 和 72h 迅速下降。RIRI + NaHS 组各时间点 Bcl-2/Bax 比率变化趋势同 RIRI 组, 但各时间点 Bcl-2/Bax 比值均高于 RIRI 组, 差异均具有统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

视网膜代谢旺盛, 其耗氧量及糖分解力超过身体中任何其它组织, 故视网膜易遭受各种病理因子的损害而产生多种多样的视网膜疾病。RIRI 是常见的病理生理过程, 其机制主要包括氧自由基的损伤作用、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸毒性、炎症反应介入及细胞凋亡等。本实验采用 TUNEL 法, 在视网膜中原位标记出凋亡细胞, 结果示凋亡细胞主要位于神经节细胞层和内核层, 再灌注后 6h 即出现凋亡细胞, 24h 凋亡细胞数量达到高峰, 提示细胞凋亡是视网膜缺血再灌注后神经节细胞死亡的主要形式之一。RIRI 导致的神经节细胞凋亡是渐进、不可逆的过程<sup>[2]</sup>, 我们必须研究神经节细胞凋亡机制并阻止其凋亡, 从而防止 RIRI 的发生。在凋亡过程中伴随着一系列相关基因, 其中 Bcl-2 基因家族起着至关重要的调节作用。Bcl-2 基因是重要的内源性抗凋亡因子<sup>[3]</sup>, Bcl-2 只存在于线粒体外膜、内质网膜以及核膜上, 细胞凋亡过程中, Bcl-2 通过调节线粒体膜上通透性转换孔来改变线粒体膜的通透性, 阻止 Cyt-c 释放并激活 Caspase, 从而发挥抗凋亡的作用<sup>[4]</sup>。Bax 是 Bcl-2 家族中促进细胞凋亡的因子, 通过介导 Cyt-c 释放, 从而启动线粒体介导的细胞凋亡<sup>[5]</sup>。Bcl-2 必须与 Bax 结合形成异源二聚体才能发挥其抑制凋亡的作用, 当 Bax 呈高表达时, 其本身可形成同源二聚体, 使细胞处于凋亡状态, 故两者的比例是细胞是否发生凋亡的关键, 当 Bcl-2/Bax 比值较高时细胞存活, 当 Bcl-2/Bax 比值较低时细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

H<sub>2</sub>S 是近些年来继 NO 和 CO 之后发现的一种新的内源性小气体信号分子。内源性 H<sub>2</sub>S 是由同型半胱氨酸 (Hcy) 经胱硫醚-β-合成酶 (cystathionine-β-synthase, CBS)、胱硫醚-γ-裂解酶 (cystathionine-γ-lyase, CSE) 及锌依赖的 3-巯基丙酮酸转硫酶 (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, MPST) 催化含硫氨基酸代谢产生<sup>[7]</sup>。H<sub>2</sub>S 在体内有两种

存在形式——约占 1/3 的气体 H<sub>2</sub>S 和约占 2/3 的硫氢化钠。NaHS 在体内可分解为 Na<sup>+</sup> 及 HS<sup>-</sup>, 后者与体内 H<sup>+</sup> 结合为 H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>S 和 NaHS 在体内形成动态平衡<sup>[8]</sup>。已有实验证实, H<sub>2</sub>S 参与肺缺血再灌注损伤 (LIRI) 的病理生理过程, 有抗 LIRI 的作用, 其机制与清除氧自由基、调控炎症反应、拮抗钙超载、抑制细胞凋亡等有关。本实验通过前房加压法建立 SD 大鼠 RIRI 模型, 研究 H<sub>2</sub>S 对 RGCs 凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响, 以探讨 H<sub>2</sub>S 在 RIRI 中的作用机制, 为临床治疗提供理论依据。我们发现各时间点 RIRI + NaHS 组与 RIRI 组比较, RGCs 凋亡明显减少, RGCs 中 Bcl-2 表达较强, Bax 表达较弱, 差异具有统计学意义, 说明 H<sub>2</sub>S 可通过促进凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达, 降低促凋亡蛋白 Bax 的表达, 升高 Bcl-2/Bax 比值, 从而抑制 RIRI 导致的神经节细胞凋亡。本实验为 H<sub>2</sub>S 治疗 RIRI 提供了实验依据, 为缺血再灌注损伤疾病治疗提供了新的思路。

### 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;1053:137-147
- 2 Zhang Y, Cho CH, Atchaneeyasakul LO, et al. Activation of the mitochondrial apoptotic pathway in a rat model of central retinal artery occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(6):2133-2139
- 3 Graham SH, Chen J, Clark RS. Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000;17(10):831-841
- 4 Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* 1998;91(5):1700-1705
- 5 Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, et al. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(9):4997-5002
- 6 Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak? *Cell Cycle* 2007;6(24):3043-3047
- 7 Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 2004;26(3):243-254
- 8 Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter. *FASEB J* 2002;16(13):1792-1798