

黄芪对大鼠视网膜缺血再灌注损伤中 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

高峰丽, 戚雪

作者单位:(121001)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院附属第三医院眼科

作者简介:高峰丽,副教授,副主任医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:高峰丽. gaofengli2012@163.com

收稿日期:2012-02-13 修回日期:2012-03-21

Effect of Astragalus acid on Bcl-2 and Bax in rat retina after ischemia-reperfusion injury

Feng-Li Gao, Xue Qi

Department of Ophthalmology, the Third Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Feng-Li Gao. Department of Ophthalmology, the Third Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. gaofengli2012@163.com

Received:2012-02-13 Accepted:2012-03-21

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression and mechanism of Bcl-2 and Bax protein in retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI) in rats, as well as the effect of Astragalus (AS) on it.

• **METHODS:** The models of RIRI were made by transient elevating of intraocular pressure. A total of 66 SD rats were randomly divided into normal control group, ischemia-reperfusion model group and AS treatment group. The last two groups were subdivided into 6, 12, 24, 48 hours, and 3 days small groups according to the different reperfusion time. The light microscope was used to observe the structural changes in retina. Western-blot and immunohistochemistry were used to measure changes of Bcl-2 and Bax protein levels in retinal tissue.

• **RESULTS:** No expression of Bcl-2 and Bax positive cells were found in normal group. At the ischemia-reperfusion groups, the expression of Bcl-2 and Bax began to increase at 6 hours after reperfusion. At 24 hours after reperfusion the expression reached the peak, and went on increasing with the reperfusion time prolonged, and began to decrease after 3 days. The therapy groups of Astragalus had the same trend with the ischemic groups in each index. Astragalus injection treatment group being compared with model group, Bcl-2 expression was significantly stronger and Bax expression was significantly reduced. There was significant difference between two groups ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Astragalus injection pretreatment allows Bcl-2 expression of ganglion cells enhanced and

expression of Bax diminished, and reduces ganglion cells apoptosis, which have a significant protective effect on the RIRI ganglion cells.

• **KEYWORDS:** Astragalus; retina; ischemia-reperfusion; Bcl-2; Bax

Gao FL, Qi X. Effect of Astragalus acid on Bcl-2 and Bax in rat retina after ischemia-reperfusion injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(5):826-828

摘要

目的:探讨大鼠视网膜缺血再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI)过程中黄芪对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响及作用机制。

方法:前房加压法制作实验性 RIRI 的大鼠模型。将 66 只 SD 大鼠随机分为正常组、缺血再灌注模型组、黄芪注射液治疗组。后两组各分为 6, 12, 24, 48h 和 3d 五个时间段, HE 染色后光镜下观察视网膜组织变化, 采用免疫组织化学法与 Western-blot 法测定大鼠 RIRI 后视网膜中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化。

结果:Bcl-2 和 Bax 在正常视网膜组织中几乎不表达, 在缺血再灌注 6h 开始表达, 24h 表达显著, 48h 开始下降, 3d 后表达已经明显减弱。黄芪注射液治疗组各观察指标变化趋势基本与单纯缺血再灌注组相似。黄芪注射液治疗组与模型组比较, Bcl-2 表达均明显增强, Bax 表达均明显减弱, 两组间比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

结论:黄芪注射液预处理可使神经节细胞 Bcl-2 表达增强, Bax 表达减弱, 减少神经节细胞凋亡, 对 RIRI 神经节细胞有明显的保护作用。

关键词:黄芪; 视网膜; 缺血再灌注; Bcl-2; Bax

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.05.06

高峰丽, 戚雪. 黄芪对大鼠视网膜缺血再灌注损伤中 Bcl-2 和 Bax 表达的影响. 国际眼科杂志 2012;12(5):826-828

0 引言

视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是临床上普遍关注的问题, 视网膜组织细胞获得充足的氧和营养物质并排出代谢产物需要良好的视网膜血液循环, 而缺血性视乳头病变、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因素均可造成不同程度的视网膜缺血, 并最终导致了视功能损害。RIRI 的机制比较复杂, 是多种因素综合作用的结果。主要是氧自由基的损伤^[1]、细胞内钙超载^[2]、兴奋性氨基酸的神经毒性、白细胞浸润^[3]等导致视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 层及内核层 (inner nuclear layer, INL) 细胞凋亡。有研究表明, RIRI 可导致 RGC 及 INL 细胞凋

亡^[4,5]。黄芪(astragalus, AS)具有抗菌消炎、利尿、强心及促进免疫等多种作用,本实验通过观察黄芪对视网膜缺血再灌注(RIR)后视网膜神经细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响,探讨黄芪对 RIR 的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 SD 大鼠 66 只,雌雄不限,体质量 220±20g,无眼疾。随机分为正常组 6 只,不做任何处理,常规饲养;缺血再灌注组(IR 组)30 只;IR+黄芪 30 只,造模前 7d 开始 ip AS 注射液,于手术前 30min 加注 1 次(6g/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 6,12,24,48h;3d 组。RIR 组和正常组用等量生理盐水腹腔注射,方法同黄芪治疗组。AS 注射液(成都地奥九泓制药公司产品),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),裂隙灯显微镜(德国 Zeiss),HMIAS-2000 图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司),Trizol,逆转录试剂,电泳仪(Bio-rad 公司)等,实验所需相关设备均由辽宁医学院病理教研组提供。

1.2 方法

1.2.1 RIR 模型的建立 采用前方灌注高眼压致缺血的方法^[6],大鼠称体质量,以体积分数 100mL/L 的水合氯醛 3mL/kg ip 麻醉,麻醉满意后,将大鼠俯卧位固定于鼠台上,随机选取每只大鼠的 1 眼造模,复方托比卡胺散瞳,滴盐酸奥布卡因滴眼液眼表面麻醉,将连有生理盐水灌注的 4 号半头皮针沿颞侧角巩膜缘斜面向上刺入大鼠眼前房,为了避免损伤晶状体和虹膜,用胶布固定头皮针于大鼠同侧耳缘处。缓慢升高输液瓶至大鼠实验眼垂直距离为 150cm,此高度可在眼内形成 110mmHg(1kPa=7.5mmHg)的眼压,使眼内压超过体循环收缩压,从而阻断视网膜血流,达到缺血的目的。当球结膜及虹膜迅速变白时用直接检眼镜观察视网膜苍白,视网膜中央动脉的供血完全阻断。实验过程中间断点氯霉素滴眼液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大鼠眼球水平使眼内压缓慢降低,以恢复视网膜血供,此时关闭输液器并拔出前房灌注针头,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 IR 模型建立成功。术毕结膜囊涂红霉素眼膏,待清醒后回笼。IR 后 6,12,24,48h 和 3d 处死动物,摘除眼球。生理盐水冲洗,每组取 3 只大鼠分离出视网膜,放入 1.5mL Ep 管, -80℃ 冷冻保存。剩下每组 3 只通过颈动脉灌流固定(固定液为 4% 中性甲醛溶液)约 30min,摘除眼球,保留视神经 0.5~1.0mm。浸泡固定于体积分数 4% 中性甲醛溶液过夜,取出后用流水缓慢冲洗 2h。乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋备用。

1.2.2 HE 染色观察视网膜组织病理学变化 切片烘干后放入二甲苯脱蜡 10min×2 次,乙醇复水每个浓度 2min。苏木素染色 10min,自来水冲洗 3 遍以冲洗多余染液,盐酸乙醇分化 3~5 次。自来水充分冲洗后置伊红染液 2min,然后乙醇脱水,二甲苯透明 2min×2 次,中性树胶封片。光学显微镜下观察视网膜组织内层结构的变化。

1.2.3 SABC 免疫组织化学法测定 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 SABC 免疫组织化学染色法分别测定 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白,具体步骤如下:将切片常规脱蜡,热修复抗原:高压锅加热至 270℃ 沸腾后将切片浸入 0.01mol/L 枸

橐酸盐缓冲液(pH=6.0)中,喷气后调至 140℃ 计时 2min。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,室温 15min。滴加一抗,4℃ 结合抗原过夜。取出室温静置 1h,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 水浴 30min。滴加试剂 SABC,37℃ 水浴 30min。DAB 显色,苏木素轻度复染,乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后显微镜下观察(阴性对照:以 PBS 代替一抗,其余步骤不变)。

1.2.4 Western-blot 法半定量测定 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 Western-blot 印迹技术转移蛋白和比较不同样本中 Bcl-2 和 Bax 的含量,取冷冻的大鼠视网膜,提取蛋白,将凝胶贴于 PVDF 膜上盖上顶层电极板,接通正负极电源,15V(不超过 25V)转印 10~30min。加入稀释好的一抗,摇床上 4℃ 孵育过夜,再用洗膜液洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L),孵育 1h,洗膜,暗室中发光、显影、定影。

统计学分析:采用 SPSS 16.0 分析软件进行统计学处理,所有数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较应用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 RIR 后视网膜组织病理学变化 正常组大鼠视网膜由 10 层结构组成,与人的视网膜相似。视网膜各层结构清晰,RGC 排列整齐,细胞数目较多,无空泡变性,INL 及外核层细胞排列紧密。IR 6h 后,即出现 RGC 层和 INL 细胞空泡化,间质疏松,视网膜明显水肿,神经纤维层及内丛状层(inner plexiform layer, IPL)疏松,12h 视网膜水肿开始减轻。24h 可见 RGC 出现核固缩,INL 细胞排列疏松紊乱。48h 与 24h 相似,核固缩更加明显。3d 后 RGC 及 INL 细胞数目明显减少,IPL 变薄,细胞排列依然疏松紊乱,核固缩及细胞空泡化明显。IR+AS 组组织变化趋势与缺血组相似,核固缩、空泡变性等病理损害减轻,细胞数目减少及视网膜厚度变薄的程度均较缺血组有明显改善。

2.2 大鼠 RIR 后 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 Bax 蛋白阳性表达为黄色或棕黄色染色,主要位于细胞浆中。IR 6h 开始在 RGC 有少量表达。12h 各层表达明显增加,24h 各层表达均达到高峰,此时除了在神经节细胞层及 INL 有表达外,IPL 和 INL 均可见胞膜及胞浆深棕色染色,再灌注 48h Bax 蛋白表达逐渐减弱,主要位于视网膜的内层,3d 组仍可以检测到 Bax 蛋白的表达。IR+AS 组相应各时间段 Bax 阳性表达较 IR 组减弱,颜色稍淡。每高倍视野 Bax 蛋白阳性细胞表达较 IR 组有所下降。IR+AS 组与 IR 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(均为 $P < 0.01$,表 1)。

Bcl-2 蛋白阳性表达为黄色或棕黄色,主要位于细胞浆中,正常组织中未见 Bcl-2 蛋白阳性细胞,IR 组中 Bcl-2 蛋白在 RIR 后 6h 和 12h 未见明显阳性表达,再灌注后 24h 后 Bcl-2 蛋白出现中等强度表达,48h 达到高峰,在 IR 3d 后 Bcl-2 蛋白表达出现下降($P < 0.01$)。IR+AS 组中,Bcl-2 蛋白阳性表达趋势与 IR 组相似,与 IR 组相比 Bcl-2 表达明显增加($P < 0.01$,表 2)。

2.3 Western-blot 印迹法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的改变 IR+AS 组与 IR 组各时间段的 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达结果比较,差异均有显著统计学意义($P < 0.01$),IR 24h 时 Bcl-2 和 Bax 比正常组表达升高,IR+AS 组与 IR 组比较,Bcl-2 表达均明显增强,Bax 表达明显减弱($P < 0.05$,图 1,表 3)。

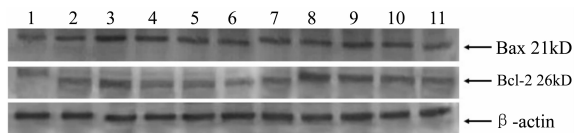


图1 大鼠 RIRI 后视网膜中 Bax 和 Bcl-2 的表达 1:正常组; 2:IR 6h 组;3:IR 12h 组; 4:IR 24h 组; 5:IR 48h 组; 6:IR 3d 组;7: IR+AS 6h 组; 8:IR+AS 12h 组; 9: IR+AS 24h 组; 10: IR+AS 48h 组;11: IR+AS 3d 组。

表1 RIRI 后不同观察时段 Bax 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$, 个/高倍视野)

观察时段	n(例)	IR 组	IR+AS 组	t	P
6h	6	19.3±1.79	17.4±0.8	3.024	0.003
12h	6	23.1±1.7	21.5±0.6	3.232	0.003
24h	6	40.6±3.3	31.7±1.1	5.355	0.004
48h	6	36.3±1.6	29.4±0.6	10.016	0.000
3d	6	23.2±1.1	21.6±1.3	5.056	0.002

表2 RIRI 后不同观察时段 Bcl-2 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$, 个/高倍视野)

观察时段	n(例)	IR 组	IR+AS 组	t	P
6h	6	25.9±1.8	28.3±0.9	4.024	0.003
12h	6	34.1±1.1	37.3±1.4	4.376	0.003
24h	6	46.4±3.1	43.6±1.4	6.355	0.004
48h	6	42.1±1.4	40.3±0.9	11.016	0.000
72h	6	29.1±1.0	30.5±1.3	6.056	0.002

表3 大鼠 RIRI 后视网膜中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 $\bar{x}\pm s$

指标	观察时段	正常组	IR 组	IR+AS 组
Bax	6h	0.221±0.047 ^b	0.258±0.011	0.247±0.003 ^a
	12h	0.222±0.044	0.431±0.015	0.404±0.0022 ^b
	24h	0.221±0.041 ^b	0.531±0.024	0.466±0.023 ^b
	48h	0.222±0.039 ^b	0.465±0.013	0.332±0.007 ^b
	3d	0.218±0.027 ^b	0.424±0.021	0.286±0.002 ^b
Bcl-2	6h	0.312±0.017 ^b	0.323±0.009	0.356±0.006 ^b
	12h	0.314±0.020 ^b	0.432±0.010	0.501±0.009 ^b
	24h	0.316±0.022 ^b	0.575±0.020	0.753±0.071 ^b
	48h	0.291±0.014 ^b	0.444±0.011	0.561±0.009 ^a
	3d	0.304±0.021 ^b	0.333±0.005	0.490±0.005 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs IR 组。

3 讨论

视网膜作为神经组织,其代谢极为旺盛,并且由于视网膜中央动脉又是终末动脉,较易发生缺血,所以在缺血缺氧的环境中极易受到损伤。有研究证实,IRI 是通过诱发细胞凋亡引起神经元死亡所致^[7],而且是渐进、不可逆的过程。最终的结局均是 RGC 的凋亡。凋亡过程中 Bcl-2 家族蛋白起至关重要的调节作用。Bcl-2 可抑制细胞凋亡,延长细胞寿命,其在不同的细胞类型中可以定位于线粒体外膜、内质网膜以及核膜上^[8]。细胞接受凋亡刺激后,Bcl-2 可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 的释放并激活 Caspase,从而发挥抗凋亡作用^[6]。Bax 是 Bcl-2 家族中促进细胞凋亡的成员,当细胞接受凋亡刺激时,Bax 从胞液迁移到线粒体膜和核膜上,在线粒体外膜上形成通道介导 Cyt-c 释放,启动线粒体介导的细胞凋亡^[9],使细胞发生不可逆反应,表现出溶酶体溶解、细胞核固缩等特征性凋亡变化。本实验中

我们运用免疫组织化学法和 Western-blot 印迹法对 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达进行检测,发现凋亡在 RIRI 中发挥了重要的作用,其中 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的表达是随着再灌注时间的延长而逐渐增强,6h 时就检测到 RGC 的凋亡,随着 IR 时间的延长,Bcl-2 蛋白表达相对增强,Bax 表达也相对增强,24h 开始达到高峰,48h 开始下降,但仍维持较高的水平,至 3d 明显减少。此时促凋亡的因素比较明显,导致 RGC 受损的程度逐渐加重,最终死亡。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪或黄芪的干燥根,多年生草本植物,是一种较常用的中药材。因其具有清除自由基、拮抗钙超载、保护内皮细胞、改善心脏功能等多种功用而被应用于心血管疾病的治疗中,并取得显著疗效。有研究证明^[10],黄芪可减轻大鼠 RIR 后的损伤,其机制可能与黄芪清除自由基、拮抗 NO 的毒性作用有关。本实验中,应用黄芪注射液后,RGC 层、INL 和 IPL 各层细胞丢失和空泡变性及核固缩等损害均有明显的改善,视网膜内 Bcl-2 蛋白阳性表达较 IR 组明显增强,而 Bax 蛋白的阳性表达较 IR 组显著下降。由此推测,黄芪可能通过直接或间接抑制 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的表达,从而达到抑制 RIRI 中视网膜神经细胞的凋亡。

综上所述,IRI 是由多种因素及多种途径共同介导的一个复杂的损伤过程。黄芪对 RIRI 具有一定的保护作用,这一保护效应可能是直接抑制 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的表达,或者通过其抗氧化作用间接抑制 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的表达,从而达到抑制 RIRI 时视网膜神经细胞的凋亡,但目前黄芪对 RIRI 抑制作用的具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Yoshimura N. Retinal neuronal cell death: molecular mechanism and neuroprotection. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2001;105(12): 884-902
- 2 牛膺筠,张瑞,周占宇,等. 碱性成纤维细胞生长因子对鼠视网膜缺血再灌注损伤的治疗作用. *中华眼科杂志* 2002;38(9): 530-533
- 3 Ohyagi Y, Asahara H, Chui DH, et al. Intracellular A beta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 2005;19(2):255-257
- 4 van Groen T, Kiliaan AJ, Kadish I. Deposition of mouse amyloid beta in human APP/PS1 double and single AD model transgenic mice. *Clin Invest* 2006;23(3):653-662
- 5 蒋雷,夏永静,黎健. 野生型 P53 基因导入对培养的兔血管平滑肌细胞生长的抑制作用. *中华心血管病杂志* 1997;25(4):301-304
- 6 Cheong JW, Chong SY, Kim JY, et al. Induction of apoptosis by apicidin, a histone deacetylase inhibitor, via the activation of mitochondria-dependent caspase cascades in human Bcr- Abl- positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2003;9(13):5018-5027
- 7 Miyaki K, Matsubara A, Nishiwaki A, et al. Pitavastatin attenuates leukocyte-endothelial interactions induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Curr Eye Res* 2009;34(1):10-17
- 8 Murphy KM, Streips UN, Lock RB. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation. *Biochem* 2000;275(23):17225-17228
- 9 Jurgensmeier M, 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
- 10 赵奎卿,贺经. 黄芪对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的影响. *国际眼科杂志* 2006;6(5):1042-1044