

α -硫辛酸治疗大鼠视网膜缺血再灌注损伤 Fas/FasL 的表达与细胞凋亡的关系

庞东渤, 毕 燃, 赵海雁

基金项目: 中国辽宁省教育厅科研基金资助项目(No. 2008404)
作者单位: (121001) 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: 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。
通讯作者: 庞东渤. pang2000@163.com
收稿日期: 2010-12-29 修回日期: 2011-02-09

Therapeutic effects of α -lipoic acid on expression of Fas/FasL and cell apoptosis in rat retinal ischemia reperfusion injury

Dong-Bo Pang, Ran Bi, Hai-Yan Zhao

Foundation item: Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department, China(No. 2008404)
Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Dong-Bo Pang. Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. pang2000@163.com
Received: 2010-12-29 Accepted: 2011-02-09

Abstract

• **AIM:** To explore the relationship between the expression of Fas/FasL and the cell apoptosis in retinal ischemia reperfusion (IR) injury of rats, as well as the therapeutic effects of α -lipoic acid in the ischemic retina.
• **METHODS:** The models of retinal IR injury were made by transient elevating intraocular pressure. A total of 54 rats were divided into normal group, IR injury group and α -lipoic acid treatment group. The latter two groups were subdivided into 12, 24, 48 and 72 hours groups. The number of retinal ganglion cells and the thickness of the inner retinal layers were detected by HE staining method. Apoptosis was assessed by the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling method, and the expression of Fas/FasL was studied by immunohistochemistry.
• **RESULTS:** The thickness of the inner retinal layers thinned and the number of retinal ganglion cells decreased in IR injury group. There was a significant number of TUNEL positive cells 12 hours after transient ischemia followed by a decrease at the 48 hour. The expression of Fas and FasL was in coincidence with apoptosis. In treatment group, the thickness of the inner retinal layers and the number of retinal ganglion cells reduced. Apoptosis of retina and expression of Fas and FasL were obviously lower than that in IR injury group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** α -lipoic acid can rescue retinal IR injury through downregulation of the expression of Fas/FasL.
• **KEYWORDS:** retinal diseases; reperfusion injury; cell apoptosis; α -lipoic acid

Pang DB, Bi R, Zhao HY. Therapeutic effects of α -lipoic acid on expression of Fas/FasL and cell apoptosis in rat retinal ischemia reperfusion injury. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11(4):596-598

摘要

目的: 探讨 Fas/FasL 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤(retinal ischemia reperfusion injury, RIRI) 中的表达与细胞凋亡的关系及 α -硫辛酸(α -LA) 的治疗作用。
方法: 采用升高眼内压的方法建立 RIRI 模型, 将 54 只 SD 大鼠随机分为正常组、缺血再灌注(IR) 组和 α -LA 干预组, IR 组及 α -LA 干预组在 12, 24, 48, 72h 光镜观察视网膜内层厚度及神经节细胞丢失, 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 Fas/FasL 蛋白的表达。
结果: IR 组视网膜内层变薄, 神经节细胞数目减少。细胞凋亡出现于再灌注后 12h, 并逐渐递增, 24h 达到高峰, 48h 开始下降。Fas/FasL 表达与凋亡的神经细胞改变基本一致。 α -LA 干预组视网膜内层厚度和神经节细胞数目有一定恢复。凋亡细胞在 12, 24, 48h 组明显低于 IR 组 ($P < 0.05$); Fas 表达在 12, 24h 组较 IR 组显著下降 ($P < 0.05$); FasL 表达在 12, 24, 48h 组较 IR 组明显下降 ($P < 0.05$)。
结论: Fas/FasL 系统参与 RIRI, 导致神经节细胞凋亡; α -LA 可下调 Fas/FasL 表达, 减少神经节细胞凋亡。
关键词: 视网膜疾病; 再灌注损伤; 细胞凋亡; α -硫辛酸
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.04.010

庞东渤, 毕燃, 赵海雁. α -硫辛酸治疗大鼠视网膜缺血再灌注损伤 Fas/FasL 的表达与细胞凋亡的关系. 国际眼科杂志 2011; 11(4):596-598

0 引言

视网膜缺血再灌注损伤 (retina ischemia reperfusion injury, RIRI) 见于高血压青光眼、视网膜血管阻塞性疾病过程中。眼缺血再灌注 (IR) 时, 视网膜组织发生一系列代谢和结构的改变, 从而导致视网膜神经组织的损伤, 引起永久性视力损失。凋亡是 RIRI 神经节细胞死亡的主要形式之一^[1], 而 Fas/FasL 死亡诱导途径是凋亡的重要途径^[2]。目前对 RIRI 的药物保护研究多集中在改善缺氧缺血、氧自由基清除、抑制细胞内钙超载、抑制细胞凋亡等方面。 α -硫辛酸 (α -lipoic acid, α -LA) 是已知抗氧化剂中最强的一种, 在改善人的体质、抗氧化、糖代谢、糖尿病并发症和其它多种疾病治疗方面备受关注^[3]。在 IR 早期, 对

表 1 RIRI 后大鼠视网膜内层厚度和神经节细胞数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标	分组	12h	24h	48h	72h
内层厚度 (μm)	NC	96.7 \pm 3.3	98.5 \pm 4.0	97.0 \pm 3.2	96.5 \pm 3.7
	RIRI	82.5 \pm 4.5 ^a	78.5 \pm 5.2 ^a	76.3 \pm 4.8 ^a	79.7 \pm 3.7 ^a
	α -LA + IR	88.6 \pm 4.8	85.6 \pm 4.3	84.3 \pm 5.2	86.5 \pm 4.9
神经节细胞数 (个/mm)	NC	96.1 \pm 13.8	95.2 \pm 14.3	92.9 \pm 12.6	94.6 \pm 16.8
	RIRI	82.5 \pm 14.6 ^a	76.2 \pm 14.1 ^a	75.2 \pm 20.1 ^a	72.3 \pm 14.8 ^a
	α -LA + IR	91.2 \pm 15.4	86.6 \pm 21.1	84.4 \pm 19.6	82.2 \pm 20.1

^a $P < 0.05$ vsNC 组和 α -LA + IR 组。

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上,其对 RIRI 的保护作用国内少有报道。我们探讨 RIRI 中视网膜的形态改变、凋亡现象与 Fas/FasL 表达的关系及 α -LA 对其影响和相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 54 只(由辽宁医学院实验动物中心提供),雌雄不限,8 周龄,体重 200 ~ 240g。 α -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 Fas/FasL 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。大鼠随机分为:正常组(NC 组)6 只(不做任何处理),缺血再灌注模型组(IR 组)24 只(造模前 3d 开始每天一次性用微量注射泵尾静脉注射等量的生理盐水,直至处死), α -LA 干预组(α -LA + IR 组)24 只(造模前 3d 开始用微量注射泵尾静脉注射 α -LA 注射液 100mg/kg,1 次/d,直至处死),IR 组及 α -LA + IR 组分 12,24,48 和 72h 进行观察,每个时间段 6 只。

1.2 方法 采用前房穿刺加压法建立大鼠 IR 损伤模型。用 100g/L 水合氯醛 3mL/kg ip 麻醉大鼠,10g/L 倍诺喜眼表麻醉,将连接平衡盐液瓶的 5 号针头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,固定针头于大鼠同侧耳缘处,缓慢升高输液瓶至与大鼠实验眼垂直距离为 136cm 处,此高度可在眼内形成 100mmHg 的眼压。此时观察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,缓慢降低输液瓶高度至大鼠眼水平,使眼内压缓慢降低,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,说明阻断的血管重新开放,形成再灌注。分别于再灌注后 12,24,48,72h 处死动物。麻醉方法与造模时相同,动物麻醉后暴露颈动脉,此时以注射针向着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出口,灌流固定约 30min,取出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后流水缓慢冲洗 2h。乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋备用。石蜡切片常规 HE 染色,每份标本取 3 张切片计数距视盘边缘 100 μm 处两侧视网膜节细胞层,100 μm 长度内神经节细胞作为细胞密度,视网膜内层厚度测量参照文献。应用 CIAS-1000 图像分析系统测定。

1.2.1 凋亡细胞的检测 采用原位细胞凋亡检测(TUNEL)法检测细胞凋亡,按试剂盒步骤检测,具体步骤如下:将切片常规脱蜡,滴加体积分数 30mL/L 的 H_2O_2 ,室温处理 10min。标本片加蛋白酶 K 37 $^\circ\text{C}$ 消化 15min。20 μL /片加标记缓冲液,按每张切片取末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)

和 DIG-d-UTP 各 1 μL ,加入 18 μL 标记缓冲液中,混匀。除去多余液体后加 20 μL /片标记液,37 $^\circ\text{C}$ 标记 2h。加封闭液,室温 30min。滴加生物素化抗地高辛抗体,37 $^\circ\text{C}$ 反应 30min。滴加试剂 SABC,37 $^\circ\text{C}$ 反应 60min。DAB 显色。苏木素轻度复染。脱水,透明,中性树胶封片,显微镜观察(设阴性对照:以 TBS 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,每个视野面积为 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%。

1.2.2 Fas/FasL 蛋白表达的检测 将切片放于预先用多聚赖氨酸处理的载玻片上,70 $^\circ\text{C}$ 温箱烤片 2h 备用,切片常规脱蜡,热修复抗原后,滴加体积分数 30mL/L 的 H_2O_2 ,室温 15min 灭活内源性酶。滴加山羊血清,室温 15min。滴加一抗(兔抗大鼠 Fas 及 FasL 多抗),4 $^\circ\text{C}$ 过夜。取出室温静置 2h,滴加二抗(生物素化山羊抗兔 IgG),室温孵育 30min。滴加试剂 SABC,20 $^\circ\text{C}$ 30min。DAB 显色。苏木素轻度复染。显微镜观察(以试剂盒中自带阳性对照片为阳性对照;设阴性对照:用 PBS 代替一抗,其余步骤相同)。Fas/FasL 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 13.0 统计软件进行统计学处理,计数资料采用 $\bar{x} \pm s$,采用成组配对设计 t 检验比较两组之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理学检查 正常组大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)呈单层整齐排列,数目较多,RIRI 模型形成的损害主要集中于视网膜内层,以 RGC 层、内核层(inner nuclear layer, INL)、内丛状层(inner plexiform layer, IPL)尤为明显。IR 组 24h 可发现 INL 和 IPL 萎缩,RGC 层和 INL 细胞排列疏松而紊乱,较多 RGC 细胞核固缩,胞质呈空泡样变。48h 视网膜 INL 明显变薄,细胞密度下降,可见 RGC 数目减少,神经细胞核固缩明显,偏于细胞一侧,细胞排列紊乱。72h 视网膜内层厚度趋于稳定,细胞排列更加紊乱疏松,胞核固缩胞质空泡样变大量存在。而同时段 α -LA + IR 组视网膜切片上可发现 RGC 层、INL 和 IPL 各层厚度均得到一定的恢复,细胞丢失、空泡变性和核固缩等损害状况有明显改善(表 1)。

2.2 α -LA 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 12h 可见 RGC 凋亡,INL 也见表达。24h 组凋亡细胞明显增多,达到高峰,全层可见。48h

组凋亡细胞开始减少,72h组仍可见阳性表达。 α -LA + IR组凋亡细胞表达规律在时间和空间与IR组相似,其中凋亡细胞在24和48h组数目较IR组明显减少(图1)。

2.3 α -LA对视网膜 Fas/FasL 蛋白表达的影响 正常大鼠视网膜中无 Fas 表达,IR 12h 组 Fas 开始在神经节细胞层少量表达,INL 也可见表达;在 24h 组达到高峰,视网膜全层可见阳性染色;48h 组较 24h 组下降;72h 组表达量更少,但仍较正常组为高。 α -LA + IR 组 Fas 表达规律与 IR 组相似,但 12 和 24h 组较 IR 组表达减少($P < 0.05$,图 2A)。正常视网膜可见 FasL 全层低表达。FasL 在 IR 12h 组表达升高,以神经纤维层、神经节细胞层为著;24h 组达到高峰;48h 组表达稍微下降;72h 组表达较 48h 降低,但仍维持高表达。 α -LA + IR 组 FasL 表达规律与 IR 组相似,但 12,24 和 48h 组 FasL 表达较 IR 组减少($P < 0.05$,图 2B)。

3 讨论

视网膜对缺血缺氧耐受性差,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 常见于青光眼、视网膜中央动脉栓塞、缺血性视网膜病变等临床病理过程^[4]。研究证实,视网膜 IR(尤其是缺血时间超过 60min)造成视网膜的损伤大多数是在血液再灌注期间造成的。IR 损伤是通过诱发细胞凋亡引起神经元死亡所致。我们应用 TUNEL 法,在视网膜中原位标记出凋亡细胞,结果显示,凋亡细胞主要位于 INL 和神经节细胞层,最早出现在再灌注后 12,24h 凋亡细胞的数量达到高峰。我们发现,RIRI 中视网膜的损害主要集中在视网膜内层,以 RGC 层、INL 和 IPL 尤为明显。表现为 IR 12h 后 INL 和 IPL 萎缩,RGC 层和 INL 细胞排列疏松而紊乱,RGC 数目减少。以上研究可证明,凋亡是 RIRI 神经节细胞死亡的重要方式。细胞凋亡受多种基因调控,Fas/FasL 系统为主的膜受体死亡通路在细胞凋亡的发生中起重要作用。FasL 属于肿瘤坏死因子(TNF)细胞因子超家族,FasL 与表达 Fas 的靶细胞交联后,才启动凋亡信号转导途径,导致 Fas 表达阳性的靶细胞凋亡。以往认为,FasL 只存在于免疫系统淋巴细胞表面。我们发现正常视网膜 Fas 表达极少,FasL 全层低表达,说明 Fas/FasL 系统在视网膜组织中存在。同时检测到视网膜 IR 后 Fas 和 FasL 表达增加,主要位于神经节细胞层与神经纤维层。再灌注后 12h Fas 开始表达,24h 达高峰,48h 后逐渐减少;而 FasL 在 24h 表达升高,48h 达高峰,此后表达稍微下降,72h 仍维持高表达。由此可以发现,IR 组 24h 前这个阶段 Fas 的表达处在一个上升阶段,继而有下降的趋势。而 FasL 则表现为缓慢上升趋势,这说明损伤在体内的发生发展在一段时间内是一个渐变的近似抛物线的过程,并不是缺血即时产生,其对机体造成的损伤是持续的。Fas/FasL 高表达的部位也是凋亡发生的主要部位,提示 Fas/FasL 的过表达可能导致了 RGC 的凋亡。

α -LA 作为一种高效亲脂的自由基清除剂,是一种强有力的抗氧化剂,在水相和脂相中溶解性均较好,易穿过细胞膜,且低毒性、安全性高^[5],外源性 α -LA 可在体内降解为二氢硫辛酸,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,抑制细胞凋亡,减轻机体损伤。于洋等^[6]研究发现,大鼠心肌 IR 过程中, α -LA 可以增强抗氧化酶的活性并降低自由基清除剂的消耗,从而减少过氧化终产物形成,最终减轻大鼠心肌 IR 的氧化损伤。我们发现, α -LA 干预组 RGC 层、INL 和 IPL 各层厚度均得到一定的恢复。我们还发现, α -LA 可明显减

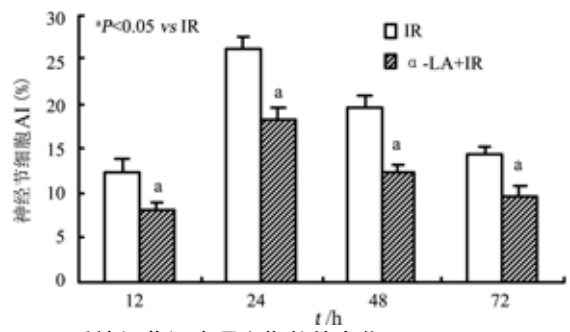


图1 RIRI后神经节细胞凋亡指数的变化。

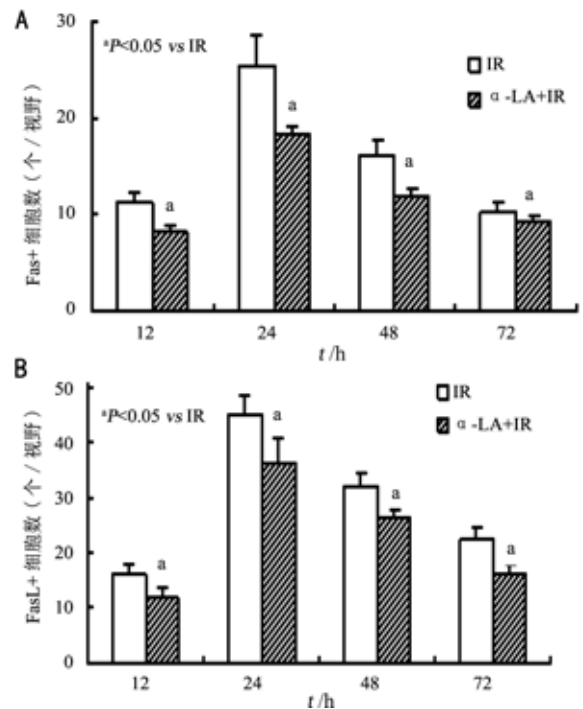


图2 RIRI后 Fas/FasL 蛋白的表达变化 A: Fas; B: FasL。

少 RIR 中神经细胞的凋亡。治疗组 12,24,48h 组 AI 值较缺血组明显减少。同时, α -LA 可明显降低 Fas/FasL 蛋白的表达。治疗组 12 和 24h 组较 IR 组 Fas 阳性细胞数明显减少,而 FasL 表达在 12,24 和 48h 组与 IR 组相比较明显减少。由此推论,抑制 Fas/FasL 蛋白表达,从而抑制神经细胞的凋亡,可能是 α -LA 治疗 RIRI 的作用机制之一。综上所述, α -LA 对 RIRI 具有一定的保护作用,这一保护效应可能涉及 RIRI 的各个环节,其中可能通过直接或间接阻断 Fas/FasL 蛋白表达,抑制神经细胞的凋亡有关。

参考文献

- Li X, Liu ZX, Zhang XG. Electron microscopic study of cell death in rat inner retinal ischemia-reperfusion. *Zhongguo Xiankai Yixue Zazhi* 2005; 15(1):5-7
- Kim HS, Park CK. Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program. *Brain Res* 2005;1057(1-2):17-28
- Niu YJ, Zhao YS, Gao YX, et al. Therapeutic effect of bFGF on retina ischemia reperfusion injury. *Chin Med J* 2004;117(2):252-257
- 王赛斌,姬斌,陈碧新,等. 自发性高血压大鼠缺血再灌注后视网膜毛细血管细胞凋亡及 p53 基因表达. *中华眼底病杂志* 2009;25(3):156-159
- Stevens MJ, Obrosova I, Cao X, et al. Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2000; 49(6):1006-1015
- 于洋,海春旭,梁欣,等. α -硫辛酸对大鼠心肌缺血再灌注氧化损伤的影响. *第四军医大学学报* 2007;28(7):631-633