

# 重组人促红细胞生成素对眼挫伤后大鼠视网膜的保护机制

曲晶<sup>1</sup>, 庞东渤<sup>2</sup>

作者单位: <sup>1</sup>(121001)中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院; <sup>2</sup>(121001)中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院第一附属医院眼科

作者简介: 曲晶, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

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

收稿日期: 2012-03-30 修回日期: 2012-05-08

## Protective mechanism of recombinant human erythropoietin on retina following eye contusion in rats

Jing Qu<sup>1</sup>, Dong-Bo Pang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Liaoning Medicine University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Dong-Bo Pang, Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. pang2000@163.com

Received: 2012-03-30 Accepted: 2012-05-08

### Abstract

• **AIM:** To explore regulative effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on the expression of Bcl-2 and Bax protein on retina following eye contusion, and to clear the protective mechanism of rhEPO for traumatic retina.

• **METHODS:** Of 45 two-month old male SD rats, 5 rats were obtained at random for normal control group. The left eye contusions were made by modified Allen's falling strike for the rest 40 rats. Successful model rats were randomly divided into model group and rhEPO group. Each group is subdivided into 4 groups according to the different time point (12, 24 hours, 3, 7 days), 5 rats per group. The rhEPO group animals were injected with rhEPO intraperitoneally, once a day. The model group animals were injected with physiological saline. The retina specimen were gotten after stopping giving rhEPO and physiological saline. Paraffin retinas sections were made and the expressions of Bcl-2 and Bax protein in the rat retinas were tested with immunohistochemistry staining.

• **RESULTS:** The expressions of Bcl-2 and Bax protein were modest in normal groups. With prolonging of time, The expression of Bcl-2 protein decreased gradually, and reached minimum at 3 days after ocular trauma in normal groups. Except for 12 hours, the expression of

Bcl-2 protein was lower in model groups than that in normal groups at each time point, while the expression of Bax protein gradually increased and reached peak at 3 days after ocular trauma in model group. Except for 12 hours, the expression of Bax protein was higher in model groups than that in normal groups. The expression of Bcl-2 protein was obviously higher in rhEPO groups than that in model groups, while the expression of Bax protein was obviously higher in rhEPO groups than that in model groups at 24 hours, 3 days and 7 days.

• **CONCLUSION:** Bcl-2 and Bax take part in pathologic process of ocular trauma; rhEPO upregulates the expression of Bcl-2 and downregulates the expression of Bax on retina cells following ocular trauma, which maybe inhibits the apoptosis of retina cells.

• **KEYWORDS:** recombinant human erythropoietin; rat; ocular contusion; Bcl-2; Bax

Qu J, Pang DB. Protective mechanism of recombinant human erythropoietin on retina following eye contusion in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(6):1041-1043

### 摘要

**目的:** 探讨重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rhEPO) 对挫伤视网膜 Bcl-2 和 Bax 的调节作用, 明确重组 rhEPO 对挫伤视网膜的保护机制。

**方法:** 两月龄雄性大鼠 45 只, 5 只用于正常对照组, 余下 40 只仿 Allen 重击法制作视网膜挫伤模型致左眼挫伤。将模型制备成功大鼠随机分为两组: 模型组和 rhEPO 治疗组, 每组各 20 只大鼠, 每组又分 12 和 24h; 3 和 7d 共四个时间点, 每个时间点大鼠 5 只。rhEPO 组大鼠 ip rhEPO, 1 次/d; 模型组用同体积的生理盐水 ip。各组各时段于给药给水停止后第 2d 取材, 石蜡切片。应用免疫组织化学方法检测视网膜组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达变化。

**结果:** 正常对照组视网膜内均有适量 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达; 模型组 Bcl-2 蛋白表达随时间推移逐渐下降, 至 3d 时表达最低。除 12h 外, 其余各组 Bcl-2 蛋白表达均比正常对照组低。而 Bax 蛋白表达逐渐上升, 至 3d 达峰值。除 12h 外, 其余各组 Bax 蛋白表达均比正常对照组高; rhEPO 组 Bcl-2 蛋白表达均比模型组高, 而 Bax 蛋白表达均比模型组低。

**结论:** Bcl-2 和 Bax 参与了眼挫伤视网膜病变过程; rhEPO 能够上调挫伤后大鼠视网膜细胞 Bcl-2 蛋白表达和下调 Bax 蛋白的表达, 以抑制损伤视网膜细胞的凋亡。

**关键词:** 重组人促红细胞生成素; 大鼠; 眼挫伤; B 细胞淋

巴瘤/白血病-2 基因; Bcl-2 相关 X 蛋白  
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.08

曲晶, 庞东渤. 重组人促红细胞生成素对眼挫伤后大鼠视网膜的保护机制. 国际眼科杂志 2012;12(6):1041-1043

## 0 引言

视网膜挫伤可造成视网膜内各层细胞变性、坏死,直至死亡和/或凋亡。变性和坏死的细胞在外伤后不久就会出现,这些死亡的细胞已不可挽救。我们的研究和治疗策略是如何救治那些迟发性死亡,即凋亡的细胞。Bcl-2 基因是 Bcl-2 (即 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因) 家族中的一种原癌基因,它具有抑制凋亡的作用。Bcl-2 家族中另外成员之一 Bax 具有促进细胞凋亡的作用,是典型的促凋亡基因。当今的一些研究已经证实,在视网膜细胞中也存在着这两种基因,这两种蛋白的比率决定着损伤视网膜上神经元的存活与否。促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是一种糖蛋白,是一种调节红细胞生成的体液因子<sup>[1]</sup>。自从成功地克隆人类 EPO 基因后,其产物重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 被成功用于治疗肾性贫血及肿瘤等疾病伴发的贫血。近年来的研究发现, EPO 对神经元具有保护功能。但对视网膜挫伤的作用机制还知之甚少。本研究通过建立大鼠的眼挫伤模型,观察视网膜内 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达变化,探讨 EPO 对视网膜 Bcl-2 和 Bax 的调节作用,明确 EPO 对挫伤的大鼠视网膜保护作用机制,以期为临床治疗眼挫伤提供新的方法和思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 两月龄雄性 SD 大鼠 45 只 (辽宁医学院实验动物中心提供), 体质量 180 ~ 220g, 无眼病, 不限食水。rhEPO 注射液 (华北制药金坦生物技术有限公司), Bcl-2 多克隆抗体和 SABC 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), Bax 多克隆抗体和 DAB 显色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 随机分为正常对照组 (5 只)、视网膜挫伤模型组 (40 只)。模型制备成功后, 40 只大鼠再被随机分为模型组 (注射生理盐水) 和 rhEPO 组 (腹腔注射 rhEPO), 每组各 20 只大鼠; 模型组和 rhEPO 组分伤后 12, 24h; 3, 7d 共四个观察时间点, 每个时间点 5 只大鼠。伤后第 2d, rhEPO 组每日腹腔注射 EPO (按 60IU/kg 给药), 1 次/d, 模型组用同体积的蒸馏水腹腔注射。各组各时段于给药停止后第 2d 取材, 所有组别的大鼠均取左眼。

**1.2.2 眼挫伤模型制备** 适应性喂养 7d 后, 禁食 12h, 自由饮水。仿 Allen 重击法制作视网膜挫伤模型, 100g/L 水合氯醛 0.3g/100g 体质量 ip 麻醉, 固定于鼠台上, 头下方垫一泡沫块, 同时注意保持呼吸道通畅。取 1m 长、直径 3cm 的 PVC 管, 垂直放置于左眼角膜正上方, 充分开大眼睑。使用 200g 圆形金属管, 自管内 1m 高处自由落体打击眼球 1 次。观察见瞳孔散大, 对光反射迟钝, 眼底镜观察视网膜大片苍白水肿, 可见出血, 视为造模成功。所有操作由同一操作者序贯完成。伤眼涂红霉素眼膏, 苏醒后回笼。

**1.2.3 标本采集和处理** 各组于 12, 24h; 3, 7d 的 8:00am

开始麻醉 (方法同前)。动物麻醉后固定四肢, 开胸, 切开左心室, 将灌注针插达升主动脉, 先用 200mL 左右 4℃ 的 PBS 液灌注, 洗去血管中血液, 以双前肢发白为标指, 再用 40mL/L 多聚甲醛 500mL 灌注, 以颈部和双前肢僵硬为标指, 灌注时间 1.5 ~ 2h。摘取眼球固定于 40mL/L 多聚甲醛中, 4℃ 冰箱中过夜, 固定 48h。经脱水, 透明, 石蜡包埋, 备用。

**1.2.4 免疫组织化学法检测 Bcl-2 和 Bax 的表达** 一抗 (抗 Bcl-2 和抗 Bax) 稀释比例为 1:300; 生物素化二抗稀释比例为 1:200; 将制备的石蜡包埋标本连续切成 4μm 厚的切片, 经脱蜡、脱水等处理后, 按试剂盒说明书完成免疫组织化学染色操作, 直至 DAB 显色、晾干 24h 后脱水、透明、封固。阴性对照: 以 PBS 代替一抗, 其余步骤不变。每张切片选取 5 个视野, 应用 Metamorph 图像分析系统进行光密度测定, 计算平均光密度值 (mean optical density, MOD)。

统计学分析: 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 计量资料用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 进一步两组间两两比较采用 LSD-t 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义;  $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠视网膜 Bcl-2 蛋白的表达** 光镜下 Bcl-2 免疫反应产物呈棕黄色。正常眼视网膜 Bcl-2 蛋白在神经节细胞层、内核层和外核层细胞的胞浆均有表达。视网膜挫伤后, Bcl-2 蛋白主要在神经节细胞层、内核层和外核层内表达, 在内丛状层和外丛状层表达极少。视网膜挫伤后, Bcl-2 蛋白表达随时间的延长逐渐下降, 至伤后 3d 下降到最低点, 7d 回升。在模型组, 除伤后 12h 外, 其余时间点 Bcl-2 蛋白表达明显低于正常组 ( $P < 0.05$ ); 在 rhEPO 组, Bcl-2 蛋白表达变化趋势与模型组相似, 但在 24h; 3, 7d 时, Bcl-2 蛋白表达较模型组明显增强, 其蛋白阳性产物的 MOD 明显高于模型组 ( $P < 0.01$ , 表 1)。各组大鼠的阴性对照片未见阳性反应发生。

**2.2 大鼠视网膜 Bax 蛋白的表达** 光镜下 Bax 蛋白免疫反应产物呈棕黄色。正常眼视网膜 Bax 蛋白在神经节细胞层、内核层和外核层及感光细胞层的胞浆有表达。在外丛状层、内丛状层表达极少。视网膜挫伤后, Bax 蛋白主要在神经节细胞层、感光细胞层和内核层表达, 在内丛状层和外丛状层表达较少。挫伤后 12h, 视网膜 Bax 蛋白的表达与正常组无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。挫伤后 24h Bax 蛋白表达明显增加, 3d 达最高峰, 7d 回落。除伤后 12h 外, 模型组 Bax 蛋白表达比正常对照组显著增高 ( $P < 0.01$ )。在 rhEPO 组, 除 12h 外, Bax 蛋白表达在其余时间点较模型组明显降低, 其蛋白阳性产物的 MOD 明显低于模型组 ( $P < 0.01$ , 表 2)。

## 3 讨论

眼外伤是一种眼科常见病和多发病, 可引起各种眼底病变而致视觉功能的严重损害。研究表明, 视网膜外伤后, 视网膜细胞的死亡包括坏死和凋亡两种方式。视网膜神经细胞坏死发生在外伤的早期, 主要由于外力的直接作用, 致使视网膜细胞出现水肿、变性和死亡。视网膜细胞凋亡被认为是视网膜神经元损伤的主要方式。无论是死亡还是凋亡, 都表现为视网膜出现萎缩, 视网膜细

表1 各组大鼠不同时间视网膜 Bcl-2 蛋白表达的变化  $\bar{x} \pm s$ 

分组	12h	24h	3d	7d
正常对照组	0.265±0.005	0.265±0.005	0.265±0.005	0.265±0.005
模型组	0.251±0.002	0.203±0.004 <sup>a</sup>	0.179±0.003 <sup>a</sup>	0.201±0.005 <sup>a</sup>
rhEPO 干预组	0.255±0.003	0.249±0.004 <sup>b</sup>	0.227±0.001 <sup>b</sup>	0.235±0.002 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 正常对照组; <sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组。

表2 各组大鼠视网膜 Bax 蛋白表达变化  $\bar{x} \pm s$ 

分组	12h	24h	3d	7d
正常对照组	0.185±0.001	0.185±0.001	0.185±0.001	0.185±0.001
模型组	0.190±0.003	0.267±0.002 <sup>a</sup>	0.334±0.003 <sup>a</sup>	0.288±0.001 <sup>a</sup>
rhEPO 干预组	0.187±0.005	0.221±0.003 <sup>b</sup>	0.262±0.004 <sup>b</sup>	0.236±0.006 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 正常对照组; <sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组。

胞明显减少。视网膜细胞的减少主要是在内5层,这5层主要为神经节细胞层和内核层,其中包含的主要细胞为神经节细胞、双极细胞、无长突细胞和水平细胞<sup>[2]</sup>。

在本研究中,我们选取了两个具有代表性的凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax,探讨其在眼挫伤后视网膜神经元内的表达变化。在凋亡抑制基因中,B 细胞淋巴瘤/白血病基因 2(B-cell lymphoma-lymphoma gene-2, Bcl-2) 家族最具代表性。在这个家族中,Bcl-2 是重要的抑制凋亡基因<sup>[3]</sup>。而其家族成员 Bax 具有促进细胞凋亡的作用,是典型的凋亡促进基因。视网膜神经元中细胞凋亡抑制因子 Bcl-2 和细胞凋亡促进因子 Bax 的比率发生了转变可能决定视网膜神经元的最终命运。现在有关 Bcl-2 抗凋亡的原理有很多学说,但绝大多数学者都认同这样的观点:即凋亡的多种信号转导途径有一个共同的通路或交汇点,而 Bcl-2 正是该交汇点的调节子。

本研究结果显示,Bcl-2 蛋白在正常组视网膜神经节细胞层、内核层和外核层细胞的胞浆均有表达。眼挫伤 12h 后,Bcl-2 蛋白在视网膜的表达变化不明显。说明在视网膜挫伤的早期,Bcl-2 基因尚未完全启动。而在视网膜挫伤早期,凋亡的神经细胞也相对较少。损伤 24 后,模型组 Bcl-2 蛋白的表达明显下降,至 3d 后,Bcl-2 蛋白表达到低谷,此后其表达略有回升。而与之相对应的 Bax 蛋白在正常组大鼠视网膜中表达很少。损伤 24h 后表达快速上升,3d 后 Bax 蛋白表达达到高峰。由此可见,Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的峰值都集中在视网膜挫伤后的 3d。我们的前期研究工作相关的研究已经证实<sup>[4,5]</sup>,视网膜细胞出现凋亡最多的时刻就是视网膜损伤后的 3d。由此推断 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的改变可能导致视网膜细胞的凋亡,这与许多研究结果相符<sup>[6]</sup>。但也有学者采用重击法制备的眼挫伤模型中,神经细胞凋亡最多时刻出现在损伤后的第 4d,这可能与在制模时打击的力度有关。

EPO 是一种糖蛋白,最初研究发现 EPO 可促进骨髓造血细胞及红祖细胞增生、分化和成熟。近年来研究发现,EPO 也是一种具有神经保护作用的神经递质调节子。Junk 等<sup>[7]</sup>发现在大鼠大脑局灶性脑缺血再灌注模型中,在 24h 向大鼠侧脑室内注射入 rhEPO 可有效减少梗塞面积,明显改善缺血区域的神经功能,维持梗塞后大鼠的空间及学习能力。也有研究证实,在脑和脊髓缺血、外伤、炎

症及其他代谢障碍时 rhEPO 能够保护神经元,提高神经元的存活能力及恢复神经元的功能<sup>[8-10]</sup>。国内学者王建国等研究发现,rhEPO 可以减轻急性高血压引起的视网膜和视神经超微结构损害,对视网膜神经保护作用。由此可见,EPO 很可能成为一种新的神经营养因子和神经保护因子,但其保护视网膜神经功能的机制尚不完全清楚。

在实验中发现,EPO 组和模型组比较,除了 12h 外,其余个时间段 EPO 组 Bcl-2 蛋白表达都明显高于模型组,而 Bax 蛋白表达 EPO 组都明显低于模型组。结合以前的研究,我们可以肯定,EPO 在眼挫伤所致的视网膜神经元凋亡过程中起到了保护作用;EPO 发挥对视网膜神经元保护作用至少是其通过对 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的调节来实现的。但 EPO 对眼挫伤保护作用的具体机制及作用途径还有待进一步的实验来阐明。

#### 参考文献

- Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 2004;11(Suppl 1):S37
- Kamphuis W. Differential effects of ischemia/reperfusion on amacrine cell subtype specific transcript levels in the rat retina. *Brain Res* 2004;1026(2):194
- Kutuk O, Basaga H. Bcl-2 Protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 2006;11(10):1661
- 王志玉,付群,史爱云. 视网膜挫伤后神经感觉层细胞凋亡的实验研究. *眼科新进展* 2008;28(8):591-594
- Yang L, Bula D, Aroyo JG, et al. Preventing retinal detachment associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):648-654
- Wang ZY, Shi AY. Pathology observation of retinal contusion rabbit model. *Int J Ophthalmol* 2009;9(8):1469-1471
- Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(16):10659-10664
- Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, et al. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res* 2002;67(6):795-803
- Bocker-Meffert S, Rosenstiel P, Rohl C, et al. Related Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(6):2021-2026
- Grimm C, Wenzel A, Groszer M. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 2002;8(7):718-724