

苯甲酸雌二醇对大鼠 RIRI 后 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

吕建红, 张琦

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: 吕建红, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 视网膜缺血再灌注。

通讯作者: 张琦, 女, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼外伤。Prozhangqi2008@163.com

收稿日期: 2012-03-20 修回日期: 2012-05-02

Effects of estradiol benzoate on Bcl-2 and Bax protein expression after retinal ischemia-reperfusion injury

Jian-Hong Lü, Qi Zhang

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Qi Zhang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. Prozhangqi2008@163.com

Received: 2012-03-20 Accepted: 2012-05-02

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effects of exogenous estrogen and effects on expression of Bcl-2 and Bax protein against retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI).

• **METHODS:** Seventy-two SD rats were randomly divided into normal control ($N, n=8$), simple ischemia-reperfusion model group (IR, $n=32$), estradiol benzoate treatment group ($E_2+IR, n=32$). In the latter two groups, each subgroup was determined by the time after ischemia-reperfusion: 6, 24, 48 and 72 hours. By improving the anterior chamber intraocular pressure to set up ischemia-reperfusion model in big rats. The morphology change of retina tissue was detected by light microscope. The changes of Bcl-2, Bax protein were measured by immunohistochemistry in retinal tissue.

• **RESULTS:** In the E_2+IR group, the damage of the retina was significantly reduced than IR group. In IR group, the expression of Bax protein began to add at 6 hours after reperfusion, 24 hours reached the peak, 48 hours began to reduce, and 72 hours had weak expression. In IR group the expression of Bcl-2 reached the peak at 6 hours, with time going, the expression of Bax began to reduce; but in E_2+IR group were increased significantly than IR group in all the time points ($P<0.01$).

• **CONCLUSION:** The retina organization was injured by ischemia-reperfusion injury. Bcl-2 and Bax protein had taken part in the RIRI. Estradiol benzoate could increase the expression of Bcl-2 and cut the expression of Bax protein, and protect the retina tissue.

• **KEYWORDS:** estradiol benzoate; ischemia-reperfusion; Bcl-2; Bax

Lü JH, Zhang Q. Effects of estradiol benzoate on Bcl-2 and Bax protein expression after retinal ischemia-reperfusion injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(6):1048-1050

摘要

目的: 探讨外源性雌激素对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用机制及对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响。

方法: 雄性 SD 大鼠 72 只随机分为正常组 ($N, n=8$), 单纯缺血再灌注组 (IR, $n=32$), 苯甲酸雌二醇处理组 ($E_2+IR, n=32$)。其中后两组又分为再灌注后 6, 24, 48 和 72h 组 (每组 8 只)。通过前房灌注加压法建立大鼠视网膜缺血再灌注模型。常规 HE 染色观察视网膜组织形态变化, 免疫组织化学方法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。

结果: E_2+IR 组视网膜组织损害程度在各时间点较 IR 组好转。IR 组 Bax 蛋白在 6h 时已经开始表达, 24h 达高峰, 48h 表达开始下降, 72h 仍有部分表达; 而 E_2+IR 组 Bax 蛋白的表达在各时间点上较 IR 组明显下调 ($P<0.01$); IR 组 Bcl-2 蛋白的表达在再灌注 6h 时表达量最多, 随时间延续表达量逐渐减少; Bcl-2 蛋白的表达在各时间点上较 IR 组明显上调 ($P<0.01$)。

结论: 缺血再灌注损伤损害了视网膜组织结构。Bcl-2 和 Bax 参与了视网膜缺血再灌注损伤的调控, 苯甲酸雌二醇可上调 Bcl-2 的表达, 下调 Bax 的表达, 保护视网膜组织。

关键词: 苯甲酸雌二醇; 缺血再灌注; Bcl-2; Bax

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.10

吕建红, 张琦. 苯甲酸雌二醇对大鼠 RIRI 后 Bcl-2 和 Bax 表达的影响. 国际眼科杂志 2012;12(6):1048-1050

0 引言

视网膜缺血再灌注损伤 (retina ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是目前临床上的一种常见眼病, 可见于视网膜中央动静脉及分支动静脉栓塞、青光眼、视神经病变的治疗及各种眼科手术等过程中, 患者在视网膜缺血再通后, 视力反而进一步下降。RIRI 的病理机制是多方面的: 白细胞和炎症因子的大量浸润^[1]、兴奋性氨基酸的释放^[2]、氧自由基产生过多^[3]、神经节细胞内钙离子内流增加增强^[4]及基因调控失调引起的细胞凋亡^[5]等多种因素导致视网膜组织损伤。其中 Bcl-2 被认为是凋亡抑制基因, Bax 被认为是促凋亡基因, 两者与细胞凋亡存在密切关系^[6]。苯甲酸雌二醇作为激素制剂, 曾在临床一些学科被用作激素替代疗法, 大量实验提示雌激素对脑组织、肝组织、肠及心肌等组织缺血再灌注损伤 (IRI) 具有一定的保护作用^[7-10]。而目前国内外关于雌激素对 RIRI 的保

护作用方面的研究却报道很少,因此研究雌激素对 RIRI 的作用具有重要的现实意义,这在眼科科研方面也引起了广泛的关注。本实验应用苯甲酸雌二醇对大鼠进行处理后,再通过前房灌注加压法制备大鼠 RIRI 模型,探讨其保护作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 72 只(辽宁医学院动物饲养中心提供),体质量 180~250g,裂隙灯检查无眼前节病变。饲养于普通环境中,实验过程中正常饮食、饮水。主要试剂:0.01mol/L PBS 缓冲液(NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24g, 加蒸馏水至 1000mL);0.2mol/L 磷酸盐缓冲液(甲液:0.2mol/L Na₂HPO₄ 溶液:Na₂HPO₄·12H₂O 7.164g, 加蒸馏水至 100mL;乙液:0.2mol/L NaH₂PO₄ 溶液:NaH₂PO₄·2H₂O 3.12g, 加蒸馏水至 100mL;最后以甲液 81mL+乙液 19mL=100mL 磷酸盐缓冲液)。兔抗鼠 Bax 和 Bcl-2 单克隆抗体均购于北京中杉生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 大鼠 72 只随机分为 3 组:正常组(8 只),单纯缺血再灌注组(IR,32 只),苯甲酸雌二醇处理组(E₂+IR,32 只)。后两组又分别分为再灌注 6,24,48 和 72h 组,每组 8 只。随机取 1 眼为实验眼。

1.2.2 视网膜缺血再灌注模型的制备 正常组:不做任何处理;E₂+IR 组于再灌注前 7d,按 200μg/kg 大鼠体质量的剂量肌注苯甲酸雌二醇注射液,1 次/d。然后与 IR 组同时制备 IR 模型。据参考文献^[1]通过前房加压灌注法制备 RIRI 模型,具体方法:大鼠称质量后以 100g/L 水合氯醛溶液 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 1 眼造模,复方托吡卡胺滴眼液散瞳,盐酸丙美卡因滴眼液表面麻醉,将连有 9g/L 生理盐水注射液的 4 号半头皮针从大鼠颞侧角巩膜缘刺入前房,针头斜面向上固定于同侧耳际。缓慢升高输液瓶至与实验眼垂直距离约为 150cm(眼压约 110mmHg)处,此时实验大鼠的球结膜及虹膜迅速变白,直接检眼镜观察大鼠视网膜,视网膜苍白,血供完全被阻断。60min 后,缓慢降低输液瓶高度至与实验眼水平位置。关闭输液器,拔出针头,此时大鼠的球结膜及虹膜颜色迅速恢复正常,视网膜呈橘红色,说明视网膜血供恢复,即为造模成功。实验过程中给予盐酸洛美沙星滴眼液点眼,以保持角膜湿润和预防感染;术后结膜囊内给予盐酸洛美沙星滴眼液和氧氟沙星眼膏,清醒后回笼。

1.2.3 实验的取材和固定与切片 分别于再灌注后 6,24,48 和 72h 各时间点取各组造模大鼠 8 只、正常大鼠 2 只,灌注处死。取眼球经固定、乙醇脱水、透明、包埋,连续切片,贴于预先用多聚赖氨酸处理好的载玻片上,用于 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.2.4 HE 染色观察视网膜组织病理学变化 取制备的切片脱蜡,乙醇梯度复水,苏木素染色,自来水冲洗除掉多余染色剂,分化,自来水再冲洗,伊红复染,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下观察视网膜组织结构的变化情况。

1.2.5 免疫组织化学法检测视网膜中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 采用 SABC 免疫组织化学染色法测定,具体操作:

表 1 大鼠视网膜缺血再灌注损伤后 Bax 蛋白的表达 $\bar{x} \pm s$

时间点	n(只)	IR 组	E ₂ +IR 组	t	P
6h	8	17.92±2.36	20.26±1.02	2.574	0.020
24h	8	31.86±1.78	50.38±3.01	14.980	0.000
48h	8	20.08±3.12	29.97±2.42	7.085	0.000
72h	8	16.75±2.47	20.23±1.56	3.369	0.002

切片常规脱蜡,热抗原修复,滴加一抗(Bcl-2 抗体浓度为 1:100;Bax 抗体浓度为 1:50),4℃ 结合抗原过夜。滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 水浴 30min。滴加 SABC,37℃ 水浴 30min。DAB 显色。经苏木素轻度复染、乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。光学显微镜下观察(阴性对照:以 PBS 代替一抗,其余不变)。每只眼球取一张切片,每张切片取 4 个视野(面积为 0.2mm×0.2mm),采用细胞图像分析系统进行分析。在 40×10 倍光学显微镜下进行病理组织形态观察。免疫组织化学结果:计数单位视野内阳性细胞数,胞膜或胞浆中出现黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。

统计学分析:使用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,计量资料采用均数±标准差表示,两组样本均数的比较采用 t 检验。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 视网膜组织病理学变化 正常组大鼠视网膜组织层次清晰;视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)呈单层密集排列,细胞核较大;内核层(inner nuclear layer, INL)由 3~5 层细胞构成;外核层(outer nuclear layer, ONL)组织较厚,约由 8~10 层细胞构成,排列紧密。IR 组与正常组进行比较:再灌注 6h 时视网膜已轻度水肿,RGC 层和 INL 层结构疏松,但尚整齐,内丛状层(internal plexiform layer, IPL)增厚;24h 时视网膜水肿加剧,各层组织排列疏松,神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)和 INL 层空泡样变性明显,RGC 数目明显减少,INL 层细胞排列不整齐,细胞丢失,ONL 层变化不大,内外丛状层增厚明显;再灌注 48h 时,视网膜水肿减轻,各层结构疏松,INL 层变薄;72h 时视网膜结构基本恢复,GCL 和 INL 层细胞缺失,外核层变化不大。E₂+IR 组与 IR 组比较:各层组织损害变化趋势相似,但神经节细胞数减少程度、各层细胞损害程度及整个视网膜厚度的变化均减轻。

2.2 视网膜中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

2.2.1 视网膜中 Bax 蛋白的表达 正常组视网膜组织未见阳性表达。IR 组再灌注 6h 视网膜组织可见阳性表达,主要位于 GCL 层;再灌注 24h 时表达量达高峰,主要位于 GCL 层、INL 层和 IPL 层,ONL 层可见少量表达,48h 时表达减少,72h 仍可见有阳性表达。E₂+IR 组在各个时间点上阳性细胞数较 IR 组均增多,两组各时点比较差异均有统计学意义(P<0.05,表 1)。

2.2.2 视网膜中 Bcl-2 蛋白的表达 正常组视网膜组织未见阳性表达。IR 组再灌注 6h 视网膜组织可见大量阳性表达,随着时间的延续表达量下降。E₂+IR 组 Bcl-2 的表达随着时间的延续表达量上调,且在各个时间点上阳性细胞数较 IR 组均增多,染色较深,两组各时间点比较差异均有统计学意义(P<0.05,表 2)。

表2 大鼠视网膜缺血再灌注损伤后 Bcl-2 蛋白的表达 $\bar{x} \pm s$

时间点	n(只)	IR 组	E ₂ +IR 组	t	P
6h	8	38.85±1.03	44.24±1.20	3.415	0.004
24h	8	30.14±1.06	45.58±1.22	9.561	0.000
48h	8	20.25±0.99	48.18±0.85	21.295	0.000
72h	8	18.97±0.77	49.36±0.65	30.247	0.000

3 讨论

视网膜中央动脉为视网膜血供的终末动脉,极易缺血、缺氧,并可迅速导致视网膜严重损伤,使其功能和结构发生明显改变。而视网膜的这种缺血性损伤在临床上又比较常见,并且严重影响着患者的视功能,本实验通过前房灌注加压法造成再灌注损伤动物模型,此法简单,易于掌控,光学显微镜下观察视网膜组织形态随再灌注时间的推移而发生的变化情况:正常组大鼠视网膜组织结构层次清晰,排列紧凑;而 IR 组视网膜组织随再灌注时间的推移细胞排列开始紊乱,且各层出现不同程度的水肿,空泡样变性,48h 后视网膜组织结构逐渐恢复,水肿也减轻;E₂+IR 组视网膜组织形态较 IR 组有不同程度的改善,水肿程度、空泡样变性和细胞丢失均减轻,此实验结果为雌激素对 RIRI 起保护作用提供了形态学依据。

视网膜组织细胞的死亡被认为包括坏死和凋亡两种方式,而细胞凋亡被认为是细胞的程序性死亡,是细胞对机体中激素水平等内环境稳态发生改变而作出的反应,被认为是 RIRI 后神经细胞损伤的主要方式。细胞凋亡是多种因素共同作用的结果,如缺血缺氧、氧自由基的形成、钙离子超载、多种细胞因子等,其中 Bcl-2 和 Bax 被认为参与了细胞凋亡的发生,而 Bax 作为促凋亡基因被激活后,破坏细胞骨架中蛋白质,致使凋亡发生^[12-14]。本实验使用免疫组织化学方法检测:正常大鼠视网膜组织各层未见明显的 Bax 蛋白的表达,在 IR 组其表达趋势随时间的延长而增加,24h 表达达高峰,48h 后表达渐下调,E₂+IR 组 Bax 蛋白的表达变化趋势相似于 IR 组,但在 24 和 48h 时较 IR 组明显下调,两组比较有统计学意义(P<0.01)。免疫组织化学方法还检测到 Bcl-2 蛋白的表达,其表达随时间的延长而减少,在 E₂+IR 组该蛋白的表达在各时间点较 IR 组明显上调,两组比较有统计学意义(P<0.01)。上述结果表明苯甲酸雌二醇能减轻大鼠 RIRI,使 Bax 蛋白的表达下调,Bcl-2 蛋白的表达上调。

总之,苯甲酸雌二醇可减轻 RIRI 所致的视网膜水肿,减轻视网膜组织损伤,细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达上

调和促凋亡基因 Bax 表达下调可能是其重要机制之一。但苯甲酸雌二醇的给药剂量、给药途径、给药时间、药物毒性反应等多项问题仍需进一步的实验研究。

参考文献

- 1 Nonaka A, Kiryu J, Tsujikawa A, et al. Inhibitory effect of ischemic preconditioning on leukocyte participation in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(10):2380-2385
- 2 Nccci C, Tartaglione R, Rombola L. Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure(IOP)-induced retinal ganglion cell death in rats. *Neurotoxicology* 2005;26:935-941
- 3 Volterra A, Trotti D, Tromba C, et al. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 1994; 14: 2924-2932
- 4 Bringmann A, Uckemann O, Pannicke T. Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol Scand* 2005; 83: 528-538
- 5 Smeyne R, Vendrell M, Hayward M, et al. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature* 1993;363:166-169
- 6 Zhu Y, Prehn J, Culmsee C, et al. The adrenoceptor antagonist Clenbuterol modulates bcl-2, bcl-xl and bax protein expression following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* 1999;90(25):1255
- 7 Tein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen. *Trends Neurosci* 2001;24(7):386-391
- 8 Knofer L, Markus W, Angele K, et al. Preservation of splenic immune functions by female sex hormones after trauma-hemorrhage. *Critical Care Medicine* 2002;30(4):888-893
- 9 Ballabeni V, Barocelli E, Bertoni S, et al. Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia-reperfusion in rats. *Life Sci* 2002;71(17):2025-2035
- 10 Yeh CH, Lin YM, Wu YC, et al. Nitric oxide attenuates cardiomyocytic apoptosis via diminished mitochondrial complex I up regulation from cardiac ischemia-reperfusion injury under cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128(2):180-188
- 11 Otori Y, Wei JY, Barnstable CJ. Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(6):972-981
- 12 Hockenbery D, Nunes G, Millman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348(6299):334-336
- 13 Oltval ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74(4):609-619
- 14 Alkayed NJ, Goto S, Sugo N, et al. Estrogen and Bcl-2 gene induction and effect of transgene in experimental stroke. *J Neurosci* 2001; 21(19):7543