

# N-乙酰半胱氨酸对大鼠挫伤性视网膜病变的保护作用

刘晶晶, 刘丹

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: 刘晶晶, 硕士, 研究方向: 眼外伤、眼底病、白内障。

通讯作者: 刘丹, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障、小儿眼科. docliu61@163.com

收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2013-03-04

## The protective effect of N-acetyl-cysteine on rats traumatic retinopathy

Jing-Jing Liu, Dan Liu

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

**Correspondence to:** Dan Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. docliu61@163.com

Received: 2012-09-17 Accepted: 2013-03-04

### Abstract

• **AIM:** To study the expression of Bcl-2/Bax in contusion of the rat retina and the effect of N-acetyl-cysteine (NAC) on it.

• **METHODS:** The animal model of retinal injury was created by a free falling iron bar hitting the rat cornea. The rats were divided into normal group ( $n=6$ ), contusion group ( $n=24$ ) and treatment groups of NAC ( $n=24$ ) randomly. After retina contusion, the latter two groups were subdivided into 1 day, 3 days, 7 days and 14 days group; there were 6 rats in each observation period. Structural changes of retina were observed with light microscope, and the expression of Bcl-2/Bax was observed by immunohistochemistry.

• **RESULTS:** In the contusion of the rat retina, retinal damage was concentrated in sensory layer. RGC layer, inner nuclear layer, and outer nuclear layer cells were obviously observed. After contusion, retinal tissue edema, cell disorder, cytoplasm vacuolated changes, thinning of retinal tissue, and cell loss were began to appear. No expression of Bax was found in normal group and treatment group, and low expression of Bcl-2 was observed. Most of Bax positive cells had expression at 1 day after contusion injury in contusion group, and then increased obviously at 3 days, and decreased at 7 days and much further at 14 days, and Bcl-2 positive cells had expression at a low stage. Treatment group had the same trend with the contusion groups in each index, but the expressive intensity of each period weakened in evidence. There were significant differences between two groups at 1 day, 3 days and 7 days after contusion ( $P<0.05$ ). The

expression of Bcl-2 in each period of time was increased. Compared the two groups with 1 day, 3 days after contusion and 7 days had a significant difference ( $P<0.01$ ).

• **CONCLUSION:** In the contusion of the rat retina, NAC can improve the retina damage, and may protect the retinal tissue from contusion injury by regulating Bcl-2/Bax protein expression.

• **KEYWORDS:** Bcl-2; Bax; contusion of the retina; apoptosis; N-acetyl-cysteine

**Citation:** Liu JJ, Liu D. The protective effect of N-acetyl-cysteine on rats traumatic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13(3):438-440

### 摘要

**目的:** 研究凋亡相关基因 Bcl-2/Bax 在大鼠挫伤性视网膜病变中的表达, 以及 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-cysteine, NAC) 对其表达的影响。

**方法:** 自由落体法制作视网膜挫伤模型。将 SD 大鼠随机分为正常组 6 只、模型组 24 只及治疗组 24 只。每组按挫伤后不同时间段分为 1, 3, 7, 14d, 每个观察时段 6 只大鼠。HE 染色光镜观察视网膜组织学变化, 应用 SABC 免疫组织化学法检测大鼠视网膜挫伤后视网膜组织 Bcl-2/Bax 蛋白表达的变化。

**结果:** 挫伤性视网膜病变的损害主要集中在神经纤维层。挫伤后视网膜组织水肿, 细胞紊乱, 胞浆空泡样变, 视网膜组织变薄, 细胞丢失。NAC 治疗组视网膜水肿程度有所改善, 细胞紊乱, 胞浆空泡样变, 细胞丢失有所恢复。正常组及 NAC 治疗组视网膜组织 Bax 均未见表达, Bcl-2 低表达。视网膜挫伤后 1d 时 Bax 表达开始增多, 3d 强阳性表达, 7d 表达有所减少, 14d 时表达进一步减少。Bcl-2 低表达, 未见明显变化。NAC 治疗组各观察指标变化趋势基本与视网膜挫伤组相似, 但表达明显减弱, 两组相比较, 于挫伤后 1, 3d 和 7d 时差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。Bcl-2 在各时段的表达均较模型组有所增强, 两组相比较, 于挫伤后 1, 3d 和 7d 时差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

**结论:** 在大鼠挫伤性视网膜病变中, NAC 能够改善视网膜组织病理学损害并通过调节 Bcl-2/Bax 蛋白表达而抑制细胞凋亡, 对视网膜挫伤具有保护作用。

**关键词:** Bcl-2; Bax; 视网膜挫伤; 凋亡; N-乙酰半胱氨酸  
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.03.05

**引用:** 刘晶晶, 刘丹. N-乙酰半胱氨酸对大鼠挫伤性视网膜病变的保护作用. 国际眼科杂志 2013; 13(3):438-440

### 0 引言

眼挫伤是一种常见的眼科疾病, 其可以引起视神经、视网膜和脉络膜损伤。其中视网膜损伤, 按照不同的损伤

程度可分为视网膜震荡和视网膜挫伤,后者可以引起视功能障碍甚至造成永久性失明,成为视功能受损的主要原因,其发病率近年来有明显上升的趋势。最近报道挫伤性视网膜病变中存在细胞的凋亡现象<sup>[1,2]</sup>。而细胞凋亡的调控与多种基因调控有关。这其中包括 Bcl-2 蛋白家族中的重要异二聚体 Bcl-2/Bax。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-cysteine, NAC) 是一种含巯基的抗氧化剂, NAC 可以直接清除自由基,增加机体抗氧化应激能力,还可以调节机体免疫状态和细胞凋亡程序。本研究通过建立大鼠眼挫伤模型,研究 NAC 对大鼠视网膜凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响,探讨 NAC 对大鼠视网膜挫伤的保护作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年健康 SD 大鼠 54 只,由辽宁医学院实验动物中心提供,体质量  $220 \pm 30$ g,雌雄不拘。要求动物双眼对称等大,角膜光滑透明,虹膜纹清,瞳孔等大正圆,晶状体无明显混浊,眼底呈红色反光,视网膜血管清晰。选取右眼为致伤眼,左眼不做任何处理作为实验对照眼。将大鼠按照计算机随机数字表方法随机分为正常组 6 只、模型组 (A 组) 和治疗组 (B 组) 各 24 只。正常组未做处理直接处死, A 组造模后腹腔注射生理盐水, B 组造模后腹腔注射 NAC  $40\text{mg}/\text{kg}$ <sup>[3]</sup>。A 组和 B 组再根据挫伤时段分为挫伤后 1d, 3d, 7d, 14d 组, 每组 6 只。

## 1.2 方法

**1.2.1 制作眼挫伤动物模型** 腹腔注射 10% 水合氯醛 ( $3\text{mL}/\text{kg}$ ) 待全身麻醉成功后, 将大鼠眼睑固定其头部垫于特殊形状的泡沫板上, 保持右眼朝上, 同时注意保持呼吸通畅, 眼眶眶口平面与水平面平行。采用仿 Allen 重击法<sup>[4]</sup>, 由相同操作者序贯完成眼挫伤模型的制作, 制模后结膜囊内涂抗生素眼膏预防感染, 待动物自然清醒后置笼内常规饲养。眼部伤情检查: 由同一位眼科医生在相同条件下、不同时间段对实验大鼠进行检查。大鼠致伤眼直接对光反应迟钝或者消失, 瞳孔中度散大, 复方托吡卡胺滴眼液点眼充分散瞳后直接检眼镜检查眼底见视网膜出血、水肿, 视网膜呈乳白色混浊, 据此可判断模型制作成功。在模型制作过程中, 眼球破裂 2 眼, 眼内感染 1 眼, 均未纳入研究。

**1.2.2 实验取材** 根据实验预先设定的时间取材, 用 10% 水合氯醛将大鼠全身麻醉后, 将右侧颈动脉插管注入 4% 多聚甲醛行灌注固定, 取同侧眼球去除眼周多余组织, PBS 溶液清洗眼球 3 次, 用 1mL 注射器自角膜处注入 4% 多聚甲醛后置入相同固定液中总共固定 24h。梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 距视神经约 1mm 处向颞侧矢状面  $4\mu\text{m}$  连续切片 6 张, 每张切片使用细胞图像分析系统随机选取 5 个高倍视野, 计数切片中阳性细胞表达的数目求平均值。从而保证切片间的可比性。

**1.2.3 HE 染色观察大鼠视网膜形态变化** 使用 HE (苏木素-伊红) 染色, 光镜下观察正常组及挫伤后大鼠视网膜组织结构的变化过程。

**1.2.4 免疫组织化学染色检测大鼠视网膜组织中 Bcl-2 和 Bax 的表达** 采用链霉素-生物素-酶复合物 (strept avidin-biotin complex, SABC) 免疫组织化学染色方法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白。一抗兔抗大鼠 Bcl-2 蛋白抗体 (1:200 稀释), Bax 蛋白抗体 (1:100 稀释); 二抗生物素化山羊抗兔 IgG; 按照试剂盒说明书完成免疫组化染色操作, 至 DAB

表 1 挫伤后不同时段 Bax 蛋白阳性的细胞数

分组	( $\bar{x} \pm s$ , 个/每高倍视野)			
	1d	3d	7d	14d
A 组	112.50±4.14	156.17±5.31	77.83±4.71	29.67±2.16
B 组	104.33±4.46 <sup>a</sup>	129.17±4.36 <sup>a</sup>	63.83±3.87 <sup>a</sup>	28.33±3.98

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs A 组。

表 2 挫伤后不同时段 Bcl-2 蛋白阳性的细胞数

分组	( $\bar{x} \pm s$ , 个/每高倍视野)			
	1d	3d	7d	14d
A 组	21.17±1.68	22.83±3.54	22.67±2.07	20.33±2.16
B 组	28.83±1.72	31.83±1.72	26.50±2.17	20.67±2.16

显色、脱水、透明、封片, 光学显微镜观察。用已知阳性对照片为阳性对照, 用 PBS 代替一抗, 设阴性对照。

统计学分析: 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。首先进行方差齐性检验, 符合正态分布, 组间及组内各时间段比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠视网膜组织形态学变化** 正常组大鼠视网膜组织结构各层细胞清晰可见, 排列整齐。挫伤性视网膜病变的损害位于神经纤维层, 以神经节细胞层 (RGC)、内核层 (INL)、外核层 (ONL) 明显。主要表现为伤后早期 RGC 有核固缩, 胞浆呈空泡变性, 排列不规整; INL 细胞排列紊乱, 整个视网膜组织高度水肿。伤后中期时 RGC 数目减少, 核固缩明显, 偏于细胞一侧, 细胞排列紊乱, ONL 细胞核变稀疏, 水肿明显减轻。伤后晚期 INL 和 ONL 厚度变薄, 细胞核数目减少。NAC 治疗组视网膜水肿程度较同时段模型组有所改善, 细胞排列, 胞浆空泡样变, 细胞丢失均有所恢复。

**2.2 大鼠视网膜中 Bax 蛋白的表达** 胞浆和胞核呈弥漫或散在棕黄染色为 Bax 阳性细胞表达。正常组视网膜中无 Bax 表达。挫伤后 1d 时在神经节细胞层和内核层出现 Bax 蛋白阳性表达, 挫伤后 3d 时 Bax 阳性表达增多, 7d 时 Bax 蛋白表达开始下降, 14d 时 Bax 蛋白表达进一步减少。NAC 治疗组 Bax 蛋白表达趋势同模型组, 在 1, 3, 7d 时神经节细胞层和内核层表达均较模型组弱, 这 3 个时段中 NAC 治疗组与模型组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 14d 时二者之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

**2.3 大鼠视网膜中 Bcl-2 蛋白的表达** 胞浆呈弥漫或散在棕黄染色为 Bcl-2 阳性细胞表达。正常组视网膜组织 Bcl-2 弱表达于神经节细胞层和内核层。正常组阳性细胞计数为  $20.50 \pm 1.87$ , 模型组各时段 Bcl-2 表达与正常组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。NAC 治疗组 Bcl-2 表达增多, 主要在神经节细胞层和内核层。在 1, 3, 7d 三个时段, NAC 治疗组与正常组、模型组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 14d 时二者之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

## 3 讨论

近年来的研究表明, 凋亡是一些视网膜和视神经疾病中视网膜神经节细胞和感光细胞死亡的机制之一。细胞凋亡也是挫伤性视网膜病变的重要机制之一。在细胞凋亡的调控过程中, Bcl 基因家族的表达具有重要作用<sup>[5]</sup>。Bcl-2 家族有一系列基因, 可分为凋亡促进基因和抑制基

因两种。其中 Bcl-2 蛋白被认为具有抗凋亡的作用, Bax 蛋白则具有促凋亡的作用。Bcl-2 作为抗凋亡基因备受学者关注, 它通过抑制细胞内  $Ca^{2+}$  超载<sup>[6]</sup>, 参与氧自由基代谢<sup>[7]</sup>, 参与细胞转运<sup>[8]</sup> 和细胞信号传导来调节细胞凋亡。研究发现, Bcl-2 家族中最重要的死亡促进基因 Bax, 它主要通过其自身形成的 Bax 同二聚体促进细胞凋亡, 与 Bcl-2 形成异源二聚体抑制细胞凋亡。因此, Bcl-2 与 Bax 的比值在细胞受到凋亡刺激后起着决定性的作用, 其决定着细胞的走向<sup>[9]</sup>。已有研究表明, 正常情况下 Bcl-2 对神经元的生物活性有保护作用<sup>[10]</sup>, 正常视网膜节细胞 Bcl-2 表达占主导地位, 说明正常情况下细胞凋亡受到抑制; 在挫伤性视网膜病变中, Bax 表达占主导地位, 说明在视网膜挫伤后细胞凋亡可能增多。本实验发现正常视网膜组织中无 Bax 蛋白, 挫伤后 Bax 蛋白表达增加, 主要位于内核层, 神经节细胞层。其表达规律: 挫伤后 1d 出现 Bax 蛋白表达, 3d 时表达明显增多, 7d 时表达有所下降, 14d 进一步减少。促凋亡相关基因在 3d 高表达, 国内外相关研究均与上述 Bax 的表达高峰基本吻合, 提示 Bax 的表达过程在挫伤后细胞凋亡的调控过程中起着重要作用。Bcl-2 属抑制凋亡基因, 本实验中挫伤后各时段较正常组无明显该改变, 这样使得 Bcl-2/Bax 比值有降低的趋势, 说明挫伤性视网膜病变中凋亡调控系统是向着促凋亡方向发展的<sup>[11]</sup>。

活性氧自由基是挫伤性视网膜病变中细胞凋亡的重要诱因, 氧化损伤是挫伤性视网膜病变的重要损伤机制。本实验应用抗生物氧化作用的药物 NAC 来探讨它在挫伤性视网膜病变中的保护作用。NAC 分子中含有活性巯基, 它可以对抗各种原因造成的氧化损伤, 对体内羟自由基、过氧化氢、超氧阴离子等氧自由基有很好的拮抗作用。同时 NAC 在细胞坏死和凋亡过程中也发挥着极其重要的作用, 且 NAC 的抗凋亡作用好过其前体物质还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH), 这表明 NAC 具有多种对抗细胞凋亡的保护机制<sup>[12]</sup>。本实验中, 通过免疫组织化学观察发现, NAC 治疗组 Bax 蛋白在各时段与模型组比均明显减少, 同时 Bcl-2 蛋白表达增高, Bcl-2/Bax 的比值增大, 这正是抑制细胞凋亡的方向。

本实验研究表明, 挫伤后视网膜组织存在凋亡相关基

因 Bcl-2/Bax 的表达, 并随时间的不同呈现一定的变化趋势, 说明挫伤后视网膜组织细胞是向着促凋亡方向发展的; 给予 NAC, 外源性补充抗氧化物质对内源性的视网膜抗氧化系统也有加强保护作用, 使重度眼挫伤后视网膜所受的氧化损伤减轻, 神经纤维层细胞丢失减少, NAC 通过调节凋亡相关基因的变化达到抑制凋亡的目的, 从而对视网膜起到保护作用。

#### 参考文献

- 1 王志玉, 付群, 史爱云, 等. 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;8(8):590-594
- 2 安美霞, 张效房, 张金嵩, 等. 挫伤性视网膜病变中光感受器细胞凋亡与氧化损伤的实验研究. 中华眼科杂志 2004;40(2):118-121
- 3 游志鹏, 姜德咏. 大鼠视网膜缺血再灌注损伤中细胞间粘附分子-1 表达的动态变化及 N-乙酰半胱氨酸的保护作用. 眼科 2004;13(6):351-354
- 4 李娜, 李筱荣, 袁佳琴, 等. 挫伤性视网膜病变大鼠 p53 基因表达与光感受器细胞凋亡的关系. 眼科新进展 2008;2(28):110-115
- 5 Kutuk O, Basaga H. Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 2006;11(10):1661-1675
- 6 Wei Y, Shen XN, Mai JY, et al. The effects of lycopene on reactive oxygen species and anoxic damage in ischemia reperfusion injury in rats. *Zhong Hua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2010;44(1):34-38
- 7 Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cell. *Cell Death Differ* 2007;14(9):1617-1627
- 8 Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, et al. Investigation of subcellular distribution of Bcl-2 oncoprotein residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993;53(19):4701-4714
- 9 Jia S, Shi J, Chen XI, et al. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in human lens epithelial cells and its effect on Bcl-2 and Bax. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2012;37(7):730-736
- 10 Schuettauf F, Rejdak R, Thaler S, et al. Citicoline and lithium rescue retinal ganglion cells following partial optic nerve crush in the rat. *Exp Eye Res* 2006;83(5):1128-1134
- 11 Blanch RJ, Ahmed Z, Berry M, et al. Animal models of retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(6):2913-2920
- 12 Gong X, Cetsi G, Carisson K, et al. Protective effects of N-acetylcysteine amide (NACA) on gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells. *Ren Fail* 2012;34(4):487-494