文章编号:1000-5404(2006)17-1775-03

论著

重组人促红细胞生成素对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用

梁淑欣,谢汉平,曾玉晓,翁传煌 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 已证实重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)对中枢神经细胞有抗凋亡作用。本实验探讨rhEPO对压力诱导的视网膜缺血再灌注的影响。**方法** 大鼠经前房灌注维持眼压102 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),60 min,建立大鼠视网膜缺血再灌注模型。随后立即向右眼玻璃体腔注射5 μl rhEPO,左眼玻璃体腔注射同等量的生理盐水,利用荧光金(fluorogold,FG)逆行示踪技术,分别于再灌注损伤后1、4、7、14 d行视网膜节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)计数。**结果** rhEPO玻璃体腔注射后各时相点视网膜节细胞数明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** 玻璃体腔内注射rhEPO有助于防止视网膜缺血再灌注后视网膜神经节细胞的凋亡。

关键词: 再灌注损伤;视网膜;红细胞生成素;凋亡;神经保护
中图法分类号: R364.12; R774.1; R973.3 **文献标识码:** A

Protective effect of recombinant human erythropoietin on pressure-induced retinal ischemia/reperfusion injury in rats

LIANG Shu-xin, XIE Han-ping, ZENG Yu-xiao, WENG Chuan-huang (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40008, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on pressure induced retinal ischemic injury in rats. **Methods** The fluorogold (FG) tracing technique was used to observe the survival rate of the retinal ganglion cells (RGCs). Retinal ischemia was induced by increasing the intraocular pressure to 102 mmHg for 60 min in 20 Long Evans rats, then 5 ml rhEPO was injected into the right vitreous chamber immediately and normal saline into the left vitreous chamber as vehicle controls. Another 5 rats without any treatment served as normal controls. All animals were sacrificed at 1, 4, 7 or 14 d after reperfusion and RGCs were counted to assess the effect of rhEPO. **Results** The RGCs in eyes treated with intravitreal rhEPO were significantly higher than those in vehicle controls ($P<0.05$). **Conclusion** Intravitreal administration of rhEPO can ameliorate retinal injury caused by ischemia/reperfusion and may be useful to prevent neuron apoptosis in the inner retina.

Key words: reperfusion injury; retina; erythropoietin; apoptosis; neuroprotection

视网膜组织缺血再灌注见于高眼压性青光眼、视网膜血管阻断性疾病过程。目前研究表明,视网膜缺血再灌注损伤存在着视网膜神经节细胞凋亡现象,而且凋亡是视网膜神经细胞丢失的重要因素之一[1]。近来研究表明,外源性EPO能减轻局灶性脑缺血、脑外伤、脑炎及脊髓损伤等动物模型的神经细胞损伤。本实验利用荧光金逆行示踪技术[2],通过大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型,观察视网膜缺血再灌注损伤后rhEPO对视网膜节细胞的保护作用。

作者简介:梁淑欣(1974-),女,山东省龙口市人,硕士研究生,医师,主要从事青光眼视神经保护方面的研究。电话:(023)5398611,E-mail:liangshuxin@gmail.com
通讯作者:谢汉平,电话:(023)68752395
收稿日期:2006-03-07;修回日期:2006-06-15

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康Long Evans大鼠25只(50眼),体质量(270±20)g,从美国Taconicr公司引进,雌雄不限。眼部经裂隙灯和检眼镜检查可见屈光间质清晰,眼底未见病变。将大鼠随机分为5组,每组5只,每只大鼠右眼为实验眼(rhEPO组,$n=5$眼),左眼为对照眼(生理盐水组,$n=5$眼),正常对照组不做任何处理($n=10$)。5组分别为正常对照组,高眼压缺血再灌注后1、4、7、14 d。

1.2 动物模型建立方法

1.2.1 荧光金逆行示踪标记视网膜神经节细胞 实验动物经速眠新肌肉注射(1.0 ml/kg),麻醉成功后,固定在大鼠立体定位仪上,颅顶备皮,局部消毒后,沿正中线切开颅顶头皮约1.2 cm,开睑器撑开头皮,剥离骨膜,彻底止血,暴露矢状缝及

顶间缝,确定 Bregma 点。根据大鼠脑立体定位图谱[3]确定双侧上丘[Bregma 点后移(6.8±0.2)mm,旁开(1.6±0.2)mm]及外侧膝状体[Bregma 点后移(4.6±0.2)mm,旁开(4.0±0.2)mm]。用电钻在相应颅骨表面投射点钻直径约为 1 mm 的孔。5 μl 平头微量注射器吸取 2% 荧光金(fluorogold,FG)(含 1% DMSO,pH 7.4 的 0.1 mol/L PBS)按图谱所示的深度[上丘为(4.0±0.2)mm,外侧膝状体为(5.6±0.2)mm]于各孔内慢慢注入 2.5 μl FG。留针 5 min,缓慢出针。分层缝合筋膜和皮肤。待 7 d 后行高眼压缺血再灌。

1.2.2 视网膜缺血再灌注模型的建立 荧光金逆行示踪 7 d 后,采用 Blair 等[4]方法,用 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg 腹腔注射,待大鼠完全麻醉后,4% 倍诺喜眼表麻醉,托吡卡胺散瞳,24 g 静脉穿刺针行前房穿刺,注意避免伤及虹膜和晶状体,连接预先接好的平衡盐液瓶,推出针芯,然后升高输液瓶,瓶内液面高度调整在 136 cm,检查穿刺口无漏水,此时眼内压达到 102 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),可观察到眼底血流断流,视网膜苍白。维持 60 min,缓慢放低输液瓶,拔出穿刺针,可见视网膜恢复供血。

1.2.3 玻璃体腔注射 视网膜血供血供恢复后,剪开上穹隆部结膜,钝性分离至球后,距视神经 2 mm 处,垂直视神经方向进针约 2 mm,将 5 μl/10 IU rhEPO 注入实验眼玻璃体腔,对照眼注入 5 μl 的生理盐水。

1.3 取材及全视网膜铺片和 RGCs 计数

正常对照组在 FG 逆行示踪后 7 d,实验观察组在缺血再灌注后 1、4、7、14 d,用 0.9% 生理盐水 200~250 ml,4% 多聚甲醛 200 ml 经心脏灌注固定后,于大鼠背侧眼球用 3-0 丝线做标记,取出眼球,去除眼前节,在 4% 多聚甲醛中后固定 40 min,于 0.01 mol/L PBS 中分离视网膜,将视网膜平铺在明胶化的载玻片上,在视网膜周边做 4 处垂直于视盘的切口以便于视网膜平伏,缓冲甘油封片。于 3 h 内在荧光显微镜下观察。在每张视网膜的上、下、鼻、颞侧距视盘 1/6、3/6、5/6 半径处共拍摄 12 张 200× 的荧光照片,对每个视野中标记的 RGCs 进行计数,求平均值(个/mm^2)。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计软件,组间比较用配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 视神经损伤后 RGCs 形态观察

正常对照组 FG 标记的 RGCs 可见吞噬了 FG 的 RGCs 在视网膜各象限分布均匀,中心区分布较周边部分布密集,血管走行区无 RGCs;标记的 RGCs 细胞体形态为圆形或三角形,直径较大,荧光主要分布在胞体,少数细胞可见明显的突起,细胞质中荧光均匀明亮,边界清楚,细胞外无荧光染料渗漏(图 1)。

损伤后的 RGCs 损伤后 1 d,就有 RGCs 数量减少,可见细胞质中 FG 不均匀。损伤后 4 d,RGCs 数量减少。损伤后 7 d,视网膜中 FG 标记的 RGCs 明显减少并有大量的 FG 渗漏到细胞外。损伤后 14 d,视网膜中 FG 标记的 RGCs 数目进一步减少,并可见吞噬了死亡的 RGCs 及荧光金的小胶质细胞样细胞(图 2、3)。

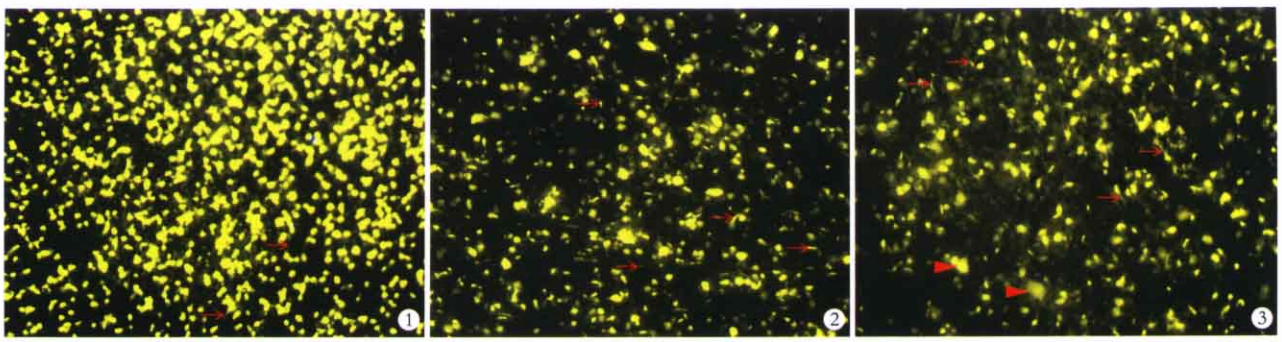


图 1 FG 标记的正常 RGCs (荧光显微镜 ×200)

图 2 FG 标记的损伤后 14 d rhEPO 治疗眼 RGCs ↘:渗漏的荧光 (荧光显微镜 ×200)

图 3 FG 标记的损伤后 14 d 生理盐水对照组 RGCs ▲:FG 渗漏的 RGC,↖:小胶质细胞样细胞 (荧光显微镜 ×200)

2.2 视神经损伤后 RGCs 计数

正常对照组右眼 RGCs 数目为(2 052±298)个/mm^2,左眼为(2 005±106)个/mm^2,两组之间无明显差异($P>0.05$),实验观察组双眼 RGCs 的数目随着缺血再灌注后时间的延长均逐渐减少,但 rhEPO 作用眼(右眼)在损伤后 1、4、7 d 及 14 d 的 RGCs 的数目多于生理盐水对照眼(左眼)($P<0.05$)(表 1)。与正常对照组右眼相比,缺血再灌注后 1 d rhEPO 作用眼 RGCs 剩余 99%,4 d 剩余 94%,7 d 剩余 92%,14 d 剩余 52%,而生理盐水对照眼在损伤后 1、4、7、14 d 的 RGCs 的存活率分别为 89%、82%、52%、36%。

表 1 FG 逆行标记各组 RGCs 比较(个/mm^2,$\bar{x}\pm s$)

实验观察组	右眼	左眼
伤后 1 d	2 051±96	1 778±89[a]
伤后 4 d	1 894±136	1 634±125[a]
伤后 7 d	1 778±89	1 051±613[a]
伤后 14 d	1 064±163	719±406[a]

a:$P<0.05$,与伤后同时间右眼比较

3 讨论

眼缺血再灌注时,视网膜组织发生一系列代谢和

结构变化，从而导致组织损伤，引起永久性视力损伤。视网膜组织缺血再灌注见于高眼压性青光眼、视网膜血管阻断性疾病过程中。病理性高眼压是青光眼视神经损伤主要危险因素，青光眼视神经萎缩和视野缺损的发生和发展与眼压升高的程度和视神经对压力损害的耐受性有关。眼内压升高超过 RGCs 的耐受程度将导致其死亡。

目前国内外应用较多的建立高眼压动物模型的方法包括：用高张盐水注入角膜缘房水经静脉；烧灼 2～3 条巩膜表面静脉以防止房水外流；通过灌注液高度的变化造成不同程度的眼压升高；大鼠前房注入墨汁，然后用激光光凝标记的小梁网来造成房水外流受阻，这些动物模型各有有缺点。在我们的实验中参照 Blair[4] 的方法，通过控制灌注液高度，增加眼内压，使视网膜小血管血液流断，造成大鼠急性高眼压模型，与临床上高眼压性青光眼表现较为一致。而且高眼压程度、血流断流时间容易控制，使各组动物之间的损伤条件均衡，增加其可比性。

本实验采用的中脑靶核团注射荧光金逆行示踪技术，由于 FG 不能跨越突触运输，只有 RGC 被标记。我们在损伤前 1 周用 FG 标记靶核团时，所标记的 RGCs 都会被预先标记上，被标记上的部分神经元在损伤后死亡，细胞崩解，FG 从细胞质中释放，从而失去染色，因此，这里所观察到的 RGCs 为原发损伤时逃逸的但仍存活的 RGCs，也就是我们所说的 RGC 的存活率。以往临床认为 EPO 是调节红细胞生成的糖蛋白，但近年来的研究表明，在人胚胎视网膜组织中有 EPOR 的表达[5]，在缺血、缺氧视网膜组织中，EPO 及 EPOR 的表达明显增高[6]。视神经横断伤动物实验显示，EPO 转基因小鼠的 RGCs 与野生型小鼠的 RGCs 数目相比明显的增多，并且在给予 10～10 000 IU 的不等剂量下没有出现血液流变学并发症[7]。

本实验结果显示在缺血再灌注损伤后 1、4、7、14 d rhEPO 作用组和生理盐水对照组 RGCs 的存活率分别为 99%、94%、92%、52% 和 89%、82%、52%、36%，说明 rhEPO 能减轻缺血再灌注后 RGCs 的损伤反应，提高 RGCs 的存活率（$P<0.05$）。提示 EPO 可能成为一种对抗视网膜缺血性损伤病变的神经保护药物。

目前 EPO 作用机制仍不清楚，许多实验提示脑缺血、缺氧时，谷氨酸大量释放，激活 NMDA 受体，引起细胞内 Ca^{2+} 增加，Ca^{2+} 与钙调蛋白结合激活 NOS（NO 合酶），使 NO 产生增加。NO 的过量产生和释放，促使氧自由基大量产生，进一步加重脑损伤。Galapai 等[10] 在动物脑缺血实验中观察到缺血后腹腔或脑室内注射重组人 EPO，能降低缺血后脑丙二醛（MDA）水平，抑制 NO 生成，减轻脑水肿，减少 CA1 神经元丢失。此外，EPO 可能像血小板源性生长因子一样增加神经细胞中抗氧化酶系，如过氧化物歧化酶、谷胱甘肽氧化酶、过氧化氢酶的活性而起到保护自由基的作用[11]。

虽然 EPO 的作用只是暂时性的阻断细胞死亡，但其降低了组织的损伤，延缓了组织向坏死进展的过程，为进一步治疗争取了时间。然而，rhEPO 红细胞生成效应可能限制 EPO 在慢性疾病，如糖尿病及高血压性视网膜病变的临床应用。启示我们有必要进一步研究 EPO 的作用机制，选择性应用视神经保护效应，而不是红细胞生成效应。随着对 EPO 的进一步认识及其对神经元的作用机制的明了，必将为包括视网膜缺血、视神经损伤等眼科急性神经元损伤在内的神经系统疾病提供新的治疗途径。

参考文献：

[1] WANG X D, KASHII S, ZHAO L, *et al*. Vitamin B6 protects primate retinal neurons from ischemic injury[J]. Brain Res, 2002, 940(1-2): 36-43.

[2] 任　蕾，牛建军，王　一，等. 利用荧光金逆行示踪技术评价视神经不完全损伤后视网膜神经节细胞的存活率[J]. 眼科新进展，2005, 25(1): 21-23.

[3] PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinate [M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1986: 50-56.

[4] BLAIR N P, BAKER D S, RHODE J P, *et al*. Vitreoperfusion. A new approach to ocular ischemia[J]. Arch Ophrhalmol, 1989, 107(3): 417-423.

[5] JUUL S E, YACHNIS A T, CHRISTENSEN R D. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus [J]. Early Hum Dev, 1998, 52(3): 235-249.

[6] WEISHAUP J H, ROHDE G, POLKING E, *et al*. Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(5): 1514-1522.

[7] KILIC U, KILIC E, SOLIZ J, *et al*. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2[J]. FASEB J, 2005, 19(2): 249-251.

[8] SATTLER M B, MERKLER D, MAIER K, *et al*. Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(Suppl 2): S181-S192.

[9] YAMASAKI M, MISHIMA H K, YAMASHITA H, *et al*. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells[J]. Branin Res, 2005, 1050(1-2): 15-26.

[10] CALAPAI G, MARCIANO M C, CORICA F, *et al*. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 401(3): 349-356.

[11] SAKANAKA M, WEN T C, MATSUDA S, *et al*. *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(8): 4635-4640.

（编辑　王　红）