论著

文章编号:1000-5404(2009)07-0604-04

还原型谷胱甘肽对实验性视神经炎视神经和视网膜的影响

陆孟婷,李平华 (重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

摘 要:目的 观察还原型谷胱甘肽(GSH)对实验性视神经炎视神经和视网膜的影响,并探讨其作用机制。**方法** 以48只雌性SD大鼠建立实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)动物模型,完全随机分为EAE组18只和GSH组30只,另6只雌性SD大鼠为正常组。免疫后当天开始,GSH组给予注射用GSH 100 mg·kg^{-1}·d^{-1}腹腔注射14 d,EAE组给予等量生理盐水替代。分别于发病初发期、高峰期、恢复期观察视神经病理学改变、视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡,并检测视网膜丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、一氧化氮(NO)的含量。**结果** GSH组18只大鼠发病,发病率为60%,症状评分为1~3分;视神经HE染色见神经纤维排列较规则,胶质细胞较EAE组有所增加,脱髓鞘相对轻;RGCs凋亡数初发期和高峰期比EAE组减少,差异有统计学意义($P<0.01$);视网膜MDA、NO含量下降,GSH-PX活力升高,与EAE组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 还原型谷胱甘肽可降低EAE大鼠发病率和症状评分,抑制大鼠RGCs的凋亡,降低视网膜MDA、NO含量,提高GSH-PX活力,对实验性视神经炎的视神经和视网膜具有保护作用。

关键词: 实验性变态反应性脑脊髓炎;视神经;RGCs;凋亡;MDA;GSH-PX;NO;还原型谷胱甘肽

中图法分类号: R322.91; R774.61; R977.4 **文献标识码:** A

Reduced glutathione protects retina and optic nerve of rats after optic neuritis

LU Meng-ting, LI Ping-hua (Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of reduced glutathione (rGSH) on the retina and optic nerve in rats with experimental optic neuritis, and the underlying mechanism. **Methods** Animal model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE), which was as used for acute demyelinating optic neuritis were established in 48 female SD rats, and then the rats were randomly divided into EAE group ($n=18$) and GSH group ($n=30$). Another 6 female SD rats served as normal control. Rats of GSH group received an intraperitoneal injection of 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} GSH for 14 d from the beginning of immunization, while the rats of EAE group were given saline alternatively. To observe pathological changes in the optic nerve, retinal ganglion cells (RGCs) apoptosis, and measure malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-PX), nitric oxide (NO) levels in the retina were observed and measured in the early period, peak period and recovery period (12 to 14 d, 16 to 18 d, or 26 to 28 d after the immunization) of the neuritis. **Results** There were 18 rats (60%) from GSH group having the disease with a symptom score of 1 to 3. Compared with those of EAE group, their optic nerve fibers were in a comparatively good order, and more glial cells and not obvious demyelination were observed in morphology; Significant lesser apoptotic RGCs were observed in GSH group than in EAE group at the early and peak period ($P<0.01$); The retinal contents of MDA and NO were decreased and the activity of GSH-PX was increased, in comparison with EAE group ($P<0.05$). **Conclusion** GSH reduces the incidence of EAE and symptoms score, inhibits apoptosis of RGCs, reduces the retinal contents of MDA and NO, and enhances the vitality of GSH-PX in the retina. GSH exerts protective effect on the retina and optic nerve in experimental optic neuritis.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis; optic nerve; retinal ganglion cells; apoptosis; malondialdehyde; glutathione peroxidase; nitric oxide; glutathione

作者简介: 陆孟婷,女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事斜弱视、视神经炎方面的研究。E-mail: lumting@qq.com

收稿日期: 2008-11-11;**修回日期:** 2008-12-08

视神经炎泛指视神经的炎症、蜕变及脱髓鞘等[1]。其中急性脱髓鞘性视神经炎常为多发性硬化(multiple sclerosis,MS)的首发症状。实验性变态反应

性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)是通过动物对中枢神经系统髓磷脂抗原、髓鞘碱性蛋白或者蛋白脂蛋白致敏后诱发的一种自身免疫性疾病,是研究 MS 和视神经炎病理学及其治疗学的最佳动物模型。活性氧簇(ROS)是神经系统脱髓鞘及血脑屏障破坏的媒介。在实验性视神经炎的动物模型中,发生了神经系统的脱髓鞘及血脑屏障的破坏,这和 ROS 增加有密切关系,因此抗氧化剂在保护炎症中的视神经免受氧化应激损伤方面显得尤为重要。还原型谷胱甘肽(reduced glutathion,GSH)广泛存在于动植物组织中,是细胞质中自然合成的一种三肽,由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸残基组成,在细胞抗氧化系统中是关键成分。本实验应用 EAE 动物模型,观察还原型谷胱甘肽对实验性视神经炎的视神经及视网膜的影响,旨在为临床视神经炎的治疗提供一种新的思路。

1　材料与方法

1.1　实验动物和分组

清洁级(SPF)雌性 SD 大鼠 54 只(重庆医科大学实验动物中心提供),体质量 180 ~ 220 g,适应性喂养 7 d。完全随机分为正常组 6 只、EAE 组 18 只和 GSH 组 30 只。另外,普通级豚鼠 5 只(重庆医科大学实验动物中心提供),体质量 350 ~ 450 g,雌雄不限,取其脊髓作免疫抗原。

1.2　主要试剂和仪器

百日咳疫苗(bordetella pertussis vaccine,BPV;卫生部上海生物制品研究所,1×10^{11}/ml),完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司),注射用还原型谷胱甘肽粉剂(重庆药友制药有限责任公司),原位缺口末端标记(TUNEL)试剂盒(美国 Roche 公司),DAB 试剂盒(北京中杉公司),MDA、GSH-PX、NO 试剂盒(南京建成生物制品有限公司)。

组织匀浆器(宁波市镇海三爱仪器厂),电子分析天平(德国 Sartorius),石蜡切片机(德国 Leica RM2135),光学显微镜(日本 Olympus 公司)。湿盒(武汉博士德公司),低温低速离心机(Sigma 公司),全波长酶标议(Thermo 公司)。

豚鼠全脊髓匀浆(GPSCH)的制备:用过量 3.5% 水合氯醛腹腔注射处死,迅速冰上取脊髓,去除脊膜后用预冷的生理盐水制成 50%(质量浓度)的豚鼠脊髓生理盐水匀浆(GPSCH),4 ℃保存备用。

1.3　实验步骤

1.3.1　EAE 动物模型的建立和症状评分　　取等量的全脊髓匀浆和完全福氏佐剂,混匀后制成稳定的油包水型抗原乳剂,放置 24 h 以上不分层。除正常组,余大鼠每只足垫皮内注射 0.1 ml 抗原乳剂,每只 0.4 ml,后肢皮下加注 0.1 ml BPV[2]。模型诱导后每日观察大鼠的体质量变化和体征并评分。按照 Zhang 等[3]的标准:0 分,正常,无发病;0.5 分,尾部远端肌张力丧失;1 分,全尾肌张力丧失或共计失调;1.5 分,尾部远端肌张力丧失和共计失调;2 分,全尾瘫痪和共计失调;2.5 分,双后肢无力;3 分,双后肢瘫痪;3.5 分,双前肢无力和双后肢瘫痪;4 分,四肢瘫痪;4.5 分,濒死状态;5 分,死亡。以大鼠的发病达到或超过 1 分为临床 EAE 发病。

1.3.2　给药方法与剂量　　自免疫后当天开始,还原型谷胱甘肽组大鼠给予注射用还原型谷胱甘肽 100 mg · kg^{-1} · d^{-1}腹腔注射 14 d,EAE 组给予等量生理盐水替代。

1.3.3　视神经形态功能和视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡测定　　分别于初发期、高峰期及恢复期将 EAE 组和 GSH 组发病大鼠各处死 3 只,正常组 3 只择期处死。予 3.5% 水合氯醛过量麻醉、4% 多聚甲醛心脏灌流固定后,摘除双眼眼球,包括较长的眶内段视神经,行光镜下苏木精-伊红(HE)染色检查和电镜检查观察病理学改变。取视网膜切片用于 TUNEL 染色,每张切片在 400 倍下连续记录 5 个视野的阳性细胞数,取其均值作为 TUNEL 阳性细胞数。

1.3.4　视网膜组织 MDA、GSH-PX、NO 测定　　分别于初发期、高峰期及恢复期将 EAE 组和 GSH 组发病大鼠另外 3 只分别处死,正常组另 3 只择期处死。予 3.5% 水合氯醛过量麻醉处死,迅速冰上摘除眼球,眼球沿赤道部剖开,去除眼前节,剥离视网膜组织,以分析天平称视网膜湿质量,以生理盐水配成 1% 视网膜组织匀浆,用低温低速离心机将匀浆以 3 500 r/min 离心 15 min,取上清液分装,放入 -20 ℃冰箱保存备用。MDA 含量用硫代巴比妥酸法,GSH-PX 活性用二硫代二硝基苯甲酸法,NO 含量用硝酸还原酶法,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.4　统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　发病情况及评分

正常组未出现症状,体质量正常增加,活动度正常。EAE 组和 GSH 组大鼠在免疫后第 12 ~ 14 天(初发期)开始发病,第 16 ~ 18 天(高峰期)发病加重,第 26 ~ 28 天(恢复期)症状完全恢复。发病大鼠表现为体质量下降,精神萎靡,食欲下降,尾部无力、拖垂,后肢无力、瘫痪,伴有大小便失禁,严重者四肢瘫痪、濒死状态。EAE 组发病率 100%,病情重,评分为 1.5 ~ 4.5 分;GSH 组 18 只大鼠发病,发病率 60%,病情较轻,评分在 1 ~ 3 分,初发期、高峰期评分与 EAE 组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

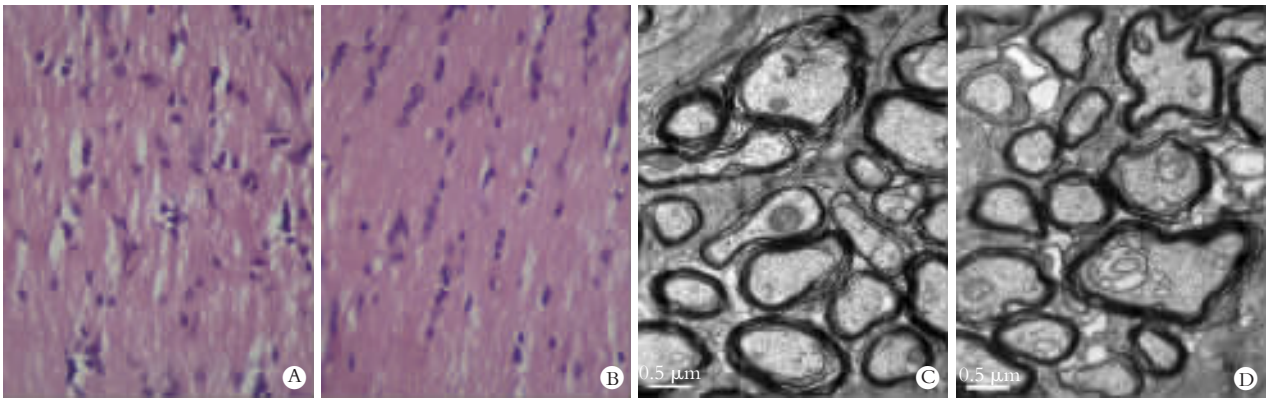
表 1　各组大鼠临床症状评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	诱导后 12 ~ 14 d	诱导后 16 ~ 18 d
正常组	6	-	-
EAE 组	18	1.8 ± 0.4	2.9 ± 0.9
GSH 组	18	1.4 ± 0.5[a]	2.1 ± 0.8[a]

a:$P < 0.01$,与 EAE 组比较

2.2　视神经病理学改变

HE 染色结果显示,正常组视神经纤维排列致密整齐、染色均匀,胶质细胞均匀排列呈条索状;EAE 组神经纤维空泡状变性,排列紊乱,走行纡曲呈波浪状,胶质细胞减少(图 1A);GSH 组视神经纤维排列较规则,胶质细胞较 EAE 组有所增加(图 1B)。电镜检查示 EAE 组视神经弥漫脱髓鞘改变(图 1C),GSH 组视神经脱髓鞘相对轻(图 1D)。



A、C:EAE 组;B、D:GSH 组;A、B:光镜观察(HE ×400);C、D:电镜观察

图1 2组大鼠视神经病理变化

2.3 视网膜神经节细胞凋亡的测定

TUNEL 阳性细胞为棕黄或棕褐色,分布于细胞核,主要位于视网膜神经节细胞层。从表2中可见,正常组视网膜几乎未见凋亡细胞。EAE 组可见明显 RGCs 凋亡,TUNEL 阳性细胞数初发期、高峰期(图 2A)与正常组间的差异均有显著意义($P<0.01$)。GSH 组 RGCs 层的 TUNEL 阳性细胞数减少,初发期及高峰期(图 2B)与 EAE 组间的差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 视网膜组织 MDA、GSH-PX、NO 的变化

与正常组相比,EAE 组初发期、高峰期 MDA、NO 含量升高,GSH-PX 活力降低,差异有统计学意义($P<0.05$);GSH 组与 EAE 组初发期及高峰期比较,MDA、NO 含量低,GSH-PX 活力高,差异有统计学意义($P<0.05$);2 组恢复期和正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

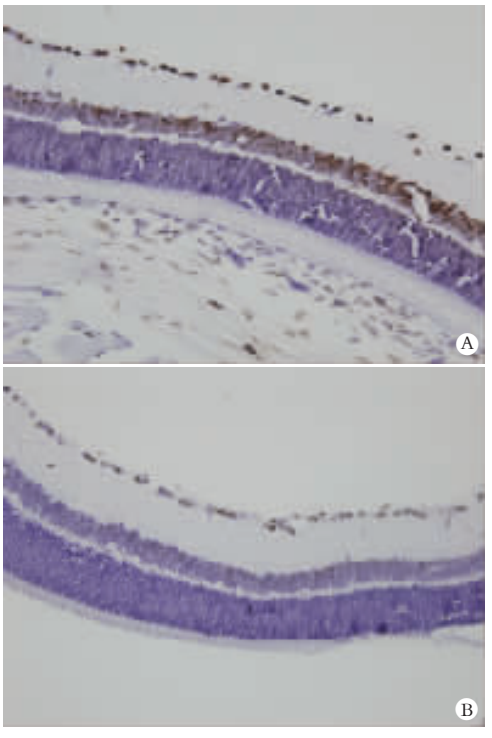


图2 EAE 组(A)与 GSH 组(B)大鼠高峰期 RGCs 凋亡观察 (TUNEL ×400)

表2 各组大鼠视网膜神经节细胞凋亡数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	时间(d)	细胞凋亡数
正常组	3	–	1.67 ± 1.29
EAE 组	9	12 ~ 14	18.93 ± 10.72[a]
		16 ~ 18	25.53 ± 2.50[a]
		26 ~ 28	2.60 ± 1.24
GSH 组	9	12 ~ 14	10.27 ± 1.62[ab]
		16 ~ 18	15.40 ± 2.97[ab]
		26 ~ 28	2.20 ± 0.94

a:$P<0.01$,与正常组比较;b:$P<0.01$,与 EAE 组比较

表3 各组大鼠视网膜 MDA、NO 含量及 GSH-PX 活力的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	时间(d)	MDA(nmol/mg)	GSH-PX(U)	NO(μmol/g)
正常组	3	–	4.46 ± 1.00	50.94 ± 4.36	40.30 ± 4.76
EAE 组	9	12 ~ 14	7.05 ± 2.06[a]	46.06 ± 4.72[a]	89.82 ± 16.16[a]
		16 ~ 18	11.49 ± 1.55[a]	11.05 ± 2.06[a]	138.74 ± 12.48[a]
		26 ~ 28	4.72 ± 0.86	48.13 ± 3.44	43.44 ± 4.60
GSH 组	9	12 ~ 14	4.47 ± 1.33[b]	48.26 ± 3.99	50.21 ± 2.52[ab]
		16 ~ 18	7.00 ± 0.74[ab]	23.01 ± 1.63[ab]	58.90 ± 4.65[ab]
		26 ~ 28	4.25 ± 0.86	50.11 ± 2.92	36.87 ± 3.57[b]

a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与 EAE 组比较

3 讨论

视神经是由视网膜神经节细胞的轴突组成的,视神经轴突在离开巩膜筛板后即有髓鞘包裹。血脑屏障渗透性的改变在实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)诱导的脱髓鞘病因中扮演了主要角色,血脑屏障的破坏导致炎症细胞及有害因子侵入中枢神经系统引起脱髓鞘作用[4]。本实验中见 EAE 组视网膜组织中氧自由基明显增加,而抗氧化保护能力如 GSH-PX 活力则明显降低,其视神经空泡状变性、脱髓鞘等病理改变明显,说明在实验性视神经炎中可能发生了血-视网膜屏障的破坏,并与 ROS 增加有密切关系。Guy 等[5]应用腺病

毒介导的过氧化氢酶的基因转导来降低 EAE 大鼠体内活性氧的表达,发现其可以减少活性氧对视神经的损伤作用,并推测视神经凋亡发生与氧自由基的介导有关,视神经损伤导致自由基的产生增多,造成轴突肿胀及髓鞘松解。还原型谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成的一种三肽,具有活性巯基(-SH)和γ-谷氨酰键,通过其巯基氧化-还原态的转换,作为可逆的供氢体,提供抗氧化保护。本实验中可见 GSH 明显降低了 EAE 大鼠的发病率和症状评分,并使 EAE 大鼠视神经病理学改变减轻、RGCs 凋亡减少,说明其能通过血脑屏障发挥中枢神经系统的保护作用,并可通过血-视网膜屏障减轻视网膜的损伤[6,7]。

在 MS 急性和慢性病灶中除了 CNS 广泛的脱髓鞘病变外,还存在轴突横断、丧失及神经元丢失等非脱髓鞘性病变[8],并且这种损害可能是临床上出现不可逆性神经功能障碍的主要因素,与病情的严重程度和患者的预后密切相关[9]。目前有实验发现,轴突损伤、RGCs 丢失也参与了视神经炎的发病,且与不可逆性视功能丧失密切相关。本实验中,TUNEL 法原位标记出发病初发期 RGCs 阳性表达,高峰期阳性表达增多,也证实了脱髓鞘性视神经炎急性期存在 RGCs 丢失。对于脱髓鞘性视神经炎视网膜神经节细胞凋亡产生的机制,目前尚不清楚。有人认为炎性细胞破坏血-视网膜屏障,直接浸入视网膜导致;也有人提出在脱髓鞘性视神经炎中视神经轴浆流障碍,营养因子缺乏,氧自由基、Ca^{2+} 超载等因素,诱导凋亡相关基因的表达,启动了凋亡的发生。Armstrong 等[10]发现 GSH 含量的降低,是一种潜在的凋亡早期激活信号,随后产生的氧自由基促使细胞发生凋亡。本实验发现给予 GSH 治疗的大鼠 RGCs 凋亡明显较 EAE 组减少,说明其对视神经炎的 RGCs 起到明显保护作用,提示氧自由基参与了 RGCs 凋亡的发生。

Leichtweis 等[11]发现还原型谷胱甘肽可直接消除氧自由基、过氧化氢及羟自由基,还可以与白细胞在应激时产生的髓过氧化酶衍生氧化物如次氯酸、氯胺等反应,阻止其进一步参与氧自由基生成反应。MS 及视神经炎在炎症等诱因的作用下产生过多的氧自由基,为了清除氧自由基,SOD、GSH-PX、CAT 等抗氧化酶被大量消耗,造成氧化/抗氧化系统失衡,大量的氧自由基及 MDA 积聚。有报道活性氧笑气(NO)在神经系统炎症性脱髓鞘疾病中因为会引起轴索变性,所以成为影响神经冲动传导的重要因素[12]。本研究选取 MDA、NO 和 GSH-PX 3 个特异性指标,发现 EAE 组视网膜组织 MDA、NO 明显升高,GSH-PX 显著降低,而 GSH 组与 EAE 组比较 MDA、NO 降低,而 GSH-PX 升高,进一步说明 GSH 通过血-视网膜屏障在视网膜局部减少氧自由基的堆积,从而在一定程度上保护炎症中的视神经免受氧化应激损伤。

参考文献:

[1] Soderstrom M. Optic neuritis and multiple sclerosis[J]. Acta Ophthalmol Scand, 2001,79(3):223 – 227.

[2] 陈昆明,李剑敏,朱振国. 豚鼠脊髓匀浆诱发大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎模型[J]. 温州医学院学报,2005,35(4):304 – 305.

[3] Zhang G X,Yu S,Gran B,*et al*. Glucosamine abrogates the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of Th2 response[J]. J Immunol, 2005, 175(11): 7202 – 7208.

[4] 秦朝晖,余华峰. 视神经炎与细胞因子[J]. 国际眼科杂志, 2003, 3(4): 86 – 90.

[5] Guy J,Sun L,Qi X,*et al*. Suppression of mitochondrial oxidative injury by sod2 gene transfer provides longterm protection against myelin fiber injury in the EAE optic nerve[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2005,46(2):1197 – 1205.

[6] 王艳华,王东武,吴　楠,等. 视神经损伤后 Rock 在大鼠视网膜中的分布及表达研究[J]. 重庆医学,2006,35(24):2231 – 2232.

[7] 许　娜,李平华. 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠视神经的病理学改变[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(8):851 – 855.

[8] Rovaris M,Gambini A,Gallo A,*et al*. Axonal injury in early multiple sclerosis is irreversible and independent of the short-term disease evolution[J]. Neurology, 2005,65(10): 1626 – 1630.

[9] Lim E T,Sellebjerg F,Jensen C V,*et al*. Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis[J]. Mult Scler, 2005,11(5):532 – 536.

[10] Armstrong J S,Steinauer K K,Hornung B,*et al*. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line[J]. Cell Death Differ,2002,9(3): 252 – 263.

[11] Leichtweis S,Ji L L. Glutathione deficiency intensifies ischemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress[J]. Acta Physiol Scand,2001,172(1):1 – 10.

[12] Dai L,Claxson A,Marklund S L,*et al*. Amelioration of antigen-induced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes[J]. Gene Ther,2003,10(7):550 – 558.

(编辑　龙　亮)