丹参预处理对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的作用及对 Bcl-2 表达的影响

程 辉,孙兆霞,宋育泽 (山东万杰医学院解剖教研室,山东 淄博 255213)

[摘 要] **目的** 探讨大鼠视网膜缺血再灌注损伤(RIRI)过程中,丹参对视网膜缺血再灌注损伤的保护作用以及对 Bcl-2 蛋白表达的影响。**方法** 随机选取 132 只 Wistar 大鼠,分为正常对照组、缺血再灌注组、丹参预处理组,通过对前房加压制作视网膜缺血再灌注损伤模型,后 2 组再各根据不同的缺血再灌注时间(6 h、12 h、24 h、48 h、72 h)分为 5 个亚组。HE 染色观察其视网膜组织学变化,SABC 法和 Western-blot 法检测 Bcl-2 蛋白表达的变化。**结果** Bcl-2 蛋白在正常组表达较弱,在缺血再灌注组和丹参预处理组缺血再灌注 6 h 后开始表达,24 h 后显著增强,48 h 后下降,72 h 后表达减弱,变化趋势基本一致。但是 2 组比较,丹参预处理组在不同时间点 Bcl-2 蛋白的表达均明显强于缺血再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 丹参预处理对视网膜缺血再灌注损伤可以通过减少神经节细胞的凋亡起到保护作用,其作用机制可能是通过调节 Bcl-2 蛋白的表达来实现。

[关键词] 丹参;视网膜缺血再灌注损伤;Bcl-2
[中图分类号] R322.9+1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2016)01-0017-04

Protective effect and Bcl-2 expression of salvia pretreatment on retinal ischemia-reperfusion injury

CHENG Hui, SUN Zhao-xia, SONG Yu-ze (Teaching and Research Section of Anatomy, Wanjie Medical College, Zibo Shandong 255213, China)

Abstract: Objective To study the protective effect and Bcl-2 expression of salvia pretreatment on retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI). **Methods** One hundred and thirty two Wistar rats were randomly divided into the normal control group, the ischemia-reperfusion group and the salvia pretreatment group. The model of retinal ischemia-reperfusion injury was constructed by increasing the intraocular pressure. The ischemia-reperfusion and salvia pretreatment group were divided into five subgroups according to the different reperfusion time (6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h). 0bserve the histological changes in retina by HE staining. The SABC (strept avidin-biotin complex) and

doi:10.11659/jjssx.04E015052
[基金项目] 山东万杰医学院校级课题(X13ZK16)
[收稿日期] 2015-09-28 [修回日期] 2015-11-15

[4] Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, et al. Effect of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus[J]. Ann Surg, 2003,38(4):467-484.
[5] Pok EH, Lee WJ. Gastrointestinal metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(39): 14315-14328.
[6] Sham JG, Simianu VV, Wright AS, et al. Evaluating the mechanisms of improved glucose homeostasis after bariatric surgery in Ossabaw miniature swine[J]. J Diabetes Res, 2014. Article ID 526972. doi:10.1155/2014/526972.
[7] 谢杰斌,蔡景理,李立军,等. 胃旁路术对 2 型糖尿病大鼠肝脏磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 mRNA 表达的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2012,15(11):1146-1149.
[8] 李艳君,濮继红,李艳萍,等. ASS 对实验性Ⅱ型糖尿病大鼠胰岛素和 C 肽分泌作用研究[J]. 局解手术学杂志,2002,11(1):21-22.
[9] Elizarova S, Galstyan GR, Wolffenbuttel BH. Role of premixed insulin analogues in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus: a narrative review[J]. J Diabetes, 2014,6(2):100-110.
[10] Thompson CS, Mikhailidis DP. Insulin resistance and mechanical dysfunction in hearts of Wistar rats with streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 1993,36(9):880-881.
[11] Patil MA, Suryanarayana P, Putcha UK, et al. Evaluation of neonatal streptozotocin induced diabetic rat model for the development of cataract[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014:463264.
[12] Goldfine AB, Patti ME. Diabetes improvement following Roux-en-Y gastric bypass: understanding dynamic changes in insulin secretion and action[J]. Diabetes, 2014,63(5):1454-1456.
[13] Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, et al. Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus[J]. Ann Surg, 2003,238(4):467-484.
[14] Picot J, Jones J, Colquitt JL, et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation[J]. Health Technol Assess, 2009, 13(41):1-190.
[15] Conroy R, Febres G, McMahon DJ, et al. Recombinant human leptin does not alter gut hormone levels after gastric bypass but may attenuate sweet cravings[J]. Int J Endocrinol, 2014, 2014:120286-120294.
[16] Jacobsen SH, Olesen SC, Dirksen C, et al. Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in non-diabetic subjects[J]. Obes Surg, 2012,22(7):1084-1096.
[17] Herzig S, Long F, Jhala US, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1[J]. Nature, 2001,413(6852):179-183.
[18] Xue Y, Shen L, Cui Y, et al. Tff3, as a novel peptide, regulates hepatic glucose metabolism[J]. PLoS One, 2013,8(9):e75240.

(编辑:左艳芳)

Western-blot were used to measure changes of Bcl-2 protein levels in retinal. **Results** The positive expression of Bcl-2 protein was weak in normal group. In the ischemia-reperfusion group and salvia pretreatment group, the expression of Bcl-2 protein began to increase at 6 hours after reperfusion, reached the peak at 24 hours after reperfusion, began to decrease at 48 hours after reperfusion, and started to weaken at 72 hours after reperfusion. The variation tendency of the two groups were the same, however, the expression of Bcl-2 was significantly stronger in the salvia pretreatment group compared with ischemia-reperfusion group, and there was significant difference between the two groups ($P<0.01$). **Conclusion** Salvia pretreatment can protect the retina by reducing retinal ganglion cells apoptosis in retinal ischemia-reperfusion injury. The mechanism may be achieved by regulating the expression of Bcl-2 protein.

Keywords: salvia; retinal ischemia-reperfusion injury; Bcl-2

视网膜属于神经组织,其血供来自于视网膜中央动脉,该动脉属于终动脉,所以视网膜在缺血环境中极易受到损伤。视网膜缺血再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI)是临床常见的眼科疾病之一,其原因有视网膜中央动脉阻塞、高眼压以及眼外伤等,有效挽救视网膜缺血的措施是早期恢复血供。然而临床发现,缺血后血液再灌注反而会加重视觉功能的损害,甚至是造成不可逆的损伤。造成视网膜缺血再灌注损伤的机制比较复杂,是多种因素综合反应的结果,主要包括氧自由基的损伤、细胞内钙超载等,这些因素均可以导致节细胞凋亡。因此,积极防治视网膜节细胞的凋亡、掌握其作用机制成为临床治疗视网膜缺血再灌注损伤的重点。丹参作为传统活血化瘀中药,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化和抗凋亡等作用,被广泛用于治疗心脑血管疾病。从理论推测,丹参对视网膜缺血再灌注损伤具有一定的防治作用,但其作用机制尚不明确。本实验通过观察丹参对视网膜缺血再灌注损伤后神经节细胞凋亡的影响,明确丹参对视网膜缺血再灌注损伤的保护作用,测定 Bcl-2 蛋白表达,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用成年 Wistar 大鼠 132 只,购于山东中医药大学动物实验中心,雌雄不限,平均体质量为(220±30) g。随机分为正常对照组(12 只)、缺血再灌注组(60 只)和丹参预处理组(60 只)。正常对照组,不做任何处理;缺血再灌注组和丹参预处理组在造模前 5 d 分别给予腹腔注射生理盐水和丹参注射液 0.2 mL,每天 2 次,直至处死。造模成功后根据缺血再灌注时间(6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h)分为 5 个亚组,每组 12 只。10% 胎牛血清、Rabbit Anti-Bcl-2、生物化素山羊抗兔抗体、DAB 显色试剂盒及 Trizol 均购自北京中杉生物公司,其他相关设备均由山东万杰医学院基础实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 视网膜缺血-再灌注模型是通过自制装置[1]升高前房压力来实现。首先腹腔注射戊巴比妥 30 mg/kg 麻醉大鼠。待大鼠麻醉后,将大鼠固定好,眼睛滴加局麻药和散瞳剂。然后将输液器始端及血压计输气管和三通管相连,输液器尾端连接 21G 针头,将针头经角膜巩膜缘刺入前房,注意保护晶状体,将血压计数值调节到 125 mmHg 并保持 60 min,根据连通器原理,此时水银计显示的压力与大鼠眼内压相等。观察发现结膜苍白,直接检眼镜观察发现视网膜中央动脉血液断流,此时可确定视网膜缺血。去掉压力后,球结膜再次充血,检眼镜可见视网膜血供恢复。整个过程注意无菌操作,术后注意预防眼部感染。视网膜缺血再灌注组和丹参处理组,从每个时间点相应的亚组各取 6 只,脱臼处死后,用剪刀将大鼠眼周围软组织分离,用 21G 针头在角膜巩膜缘处刺 1 个小孔,先放入 FAA 固定液中浸泡 1 min,再快速放入体积分数 10% 中性甲醛固定液中固定 24 h,流水冲洗 1 h,梯度酒精脱水,在脱水至体积分数 95% 乙醇时去除角膜、虹膜和晶状体,然后继续脱水,将得到的视网膜制备石蜡切片。每个亚组剩余的 6 只大鼠,摘除眼球,分离视网膜,放入 1.5 mL EP 管,-80 ℃冷冻保存。

1.2.2 HE 染色 常规脱蜡入水,蒸馏水冲洗,苏木素染色 5~10 min,自来水充分冲洗 15 min,70% 盐酸乙醇分化 10 s,1% 氨水返蓝 20 s,自来水冲洗 15 min,蒸馏水冲洗,0.5% 伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察视网膜组织结构变化。

1.2.3 SABC 免疫组织化学法 石蜡切片常规脱蜡入水,封闭内源性过氧化物酶:新鲜配制 0.3% H_2O_2-甲醇,室温处理 15 min,0.01 M PBS 冲洗 2 min,反复3 次。将切片放在盛满 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)的小容器中,微波炉加热至即将沸腾时断电,间隔 5~10 min 后,反复 2~3 次;自然冷却后用 0.01 M PBS(pH 7.2~7.4)冲洗,2 min,反复 3 次;滴加 5% BSA 封闭液,室温孵育 20 min,滴加稀释的一抗,4 ℃冰箱过夜,37 ℃温箱复温 60 min,0.01 M PBS

冲洗,2 min,反复 3 次;滴加生物素化的羊抗大鼠 IgG 抗体,37 ℃孵育 60 min,DAB 显色,苏木素轻度复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.2.4 Western-blot 法半定量测定 将视网膜组织块加蛋白裂解液(含 PMSF)进行裂解,提取蛋白,测定蛋白浓度,将蛋白样品分到离心管中,并加入上样缓冲液,100 ℃沸水中煮沸 5 min,使蛋白变性待上样,SDS-PAGE 电泳 4 ~ 5 h,电泳至溴酚兰刚跑出即可终止电泳,转膜,封闭,加入稀释好的一抗,4 ℃孵育过夜,TBST 冲洗 5 ~ 10 min,反复 3 次,加入稀释好的二抗,室温下孵育 1 ~ 2 h,洗膜,显影,定影。

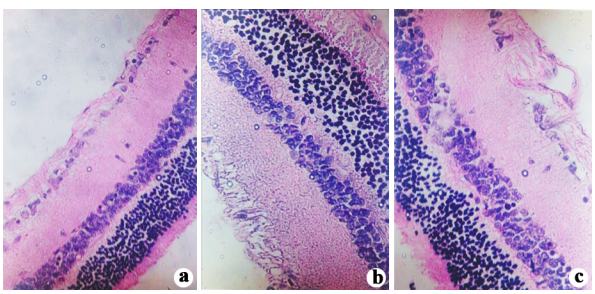
1.3 统计学分析

应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,所有计数资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,同组内不同时间点采用单因素方差分析,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色观察视网膜组织结构变化

视网膜由分界清楚的 10 层结构组成。对照组视网膜结构清晰完整,RGCs 呈单层排列,胞核大,染色较淡,胞浆少,光感细胞层列整齐致密,无空泡化;内、外核层,内、外网状层以及神经纤维层形态结构正常(图 1a)。缺血再灌注 6 h 后,出现 RGCs 空泡化,视网膜水肿;12 h 后,RGCs 层和内核层空泡化加重,间质疏松,视网膜水肿;24 h 后可见 RGCs 核固缩明显,内核层细胞排列紊乱,内丛状层变薄;48 h 后,RGCs 核固缩更加明显;72 h 后,内丛状层变薄,RGCs 细胞数目进一步减少,空泡化和核固缩明显,排列稀疏紊乱(图 1b)。丹参预处理组在各个时间点与缺血再灌注组变化趋势一致,但是细胞空泡化、核固缩、内丛状层厚度等病理变化减轻,细胞数目减少减轻(图 1c)。



a:正常视网膜组织结构清晰完整;b:缺血再灌注组 48 h 节细胞核固缩、空泡化;c:丹参处理组 48 h 节细胞空泡化减轻

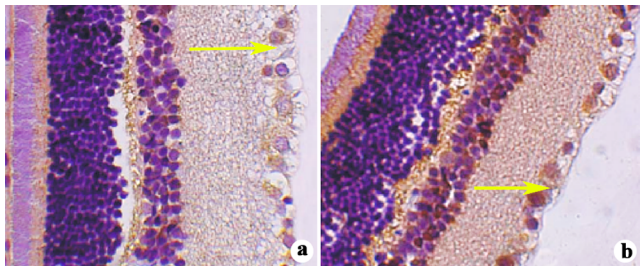
图 1 视网膜组织结构变化(HE ×400)

2.2 SABC 法测定 Bcl-2 蛋白表达

Bcl-2 蛋白阳性表达存在于细胞浆中,呈黄色或者棕黄色。正常组织中未见 Bcl-2 阳性表达,缺血再灌注组 6 h 后 Bcl-2 开始少量表达,12 h 后 Bcl-2 阳性表达增强,24 h 后表达进一步增强,48 h 达到高峰(见图 2),72 h 后下降($P < 0.01$)。丹参处理组在各个时间点与缺血再灌注组变化趋势一致,但是 Bcl-2 阳性表达比缺血再灌注组明显增强,2 组在各时间点比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.3 Western blot 法检测 Bcl-2 蛋白表达

缺血再灌注组 Bcl-2 蛋白在 12 h 已经有较强的表达,24 h 开始达到高峰,48 h 比 24 h 相对下降,但是仍有较高的表达,72 h 表达明显减弱。丹参处理组 Bcl-2 蛋白表达趋势与缺血再灌注组基本一致,但是丹参处理组的 Bcl-2 蛋白表达明显比缺血再灌注组增强,2 组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 3、表 2。



a:缺血再灌注组 48 h Bcl-2 阳性表达;b:丹参处理组 48 h Bcl-2 阳性表达

图 2 SABC 法测定 Bcl-2 蛋白表达情况

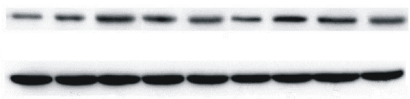


图 3 视网膜缺血再灌注组与丹参处理组不同时间 Bcl-2 表达

表 1 2 组不同时间 Bcl-2 阳性表达细胞数($\bar{x} \pm s$)

观察时间	n	IR 组	IR + SM 组	t	P
6 h	6	25.10 ± 1.65	27.38 ± 3.22	3.012	0.002
12 h	6	30.30 ± 1.12	34.41 ± 3.46	3.024	0.003
24 h	6	44.80 ± 2.08	45.10 ± 2.12	5.292	0.002
48 h	6	42.70 ± 1.47	42.87 ± 1.24	10.021	0.000
72 h	6	29.30 ± 1.58	30.04 ± 1.77	5.065	0.002

表 2 2 组不同时间 Bcl-2 表达($\bar{x} \pm s$)

观察时间	n	IR 组	IR + SM 组	t	P
6 h	6	0.434 ± 0.019	0.464 ± 0.005	4.237	0.003
12 h	6	0.410 ± 0.017	0.473 ± 0.005	4.024	0.003
24 h	6	0.513 ± 0.020	0.704 ± 0.012	9.058	0.000
48 h	6	0.443 ± 0.012	0.543 ± 0.008	5.587	0.002
72 h	6	0.347 ± 0.007	0.486 ± 0.004	5.065	0.003

3 讨论

临床上,视网膜中央动脉阻塞性疾病、青光眼等的

治疗,都可以引起视网膜缺血再灌注损伤,甚至导致永久性视力障碍或者失明。而视网膜缺血再灌注损伤的发病机制较为复杂,是多种因素综合作用的结果,如氧自由基的损伤[2]、兴奋性氨基酸[3]、凋亡及凋亡基因的调控[4]、一氧化氮[5]和钙超载等。也有研究认为,缺血再灌注损伤可能是视网膜节细胞凋亡,视网膜节细胞凋亡是神经损伤的主要方式[6]。在细胞凋亡过程中,Bcl-2基因家族编码蛋白有很重要的作用。Bcl-2基因是凋亡抑制基因,可能通过调节线粒体膜通道的通透性来稳定线粒体,阻止线粒体Cyt-c等凋亡相关蛋白,抑制凋亡的发生[7]。张花治等[8]通过探讨原花青素对大鼠视网膜缺血再灌注损伤Bcl-2和Bax表达的影响,发现大鼠视网膜缺血再灌注损伤后Bcl-2和Bax蛋白表达均升高,原花青素可上调Bcl-2蛋白的表达,下调Bax蛋白的表达,从而对视网膜起到保护作用。

丹参为唇形科植物丹参的干燥根,是中药常见的活血化瘀药。其主要成分可分为脂溶性成分和水溶性成分两类。脂溶性成分主要有丹参酮Ⅰ、ⅡA、ⅡB等,水溶性成分包括丹酚酸、丹参素等[9]。动物实验表明丹参提取物可以使血清SOD上升、MDA下降,可以打破氧自由基介导的细胞损害,保护细胞膜结构和功能的完整性[10],具有降血压、保护心肌、防治心肌梗死、改善微循环等作用[11]。同时,还有实验证明丹参对脑、脊髓缺血再灌注损伤具有防护作用[12-14]。而视网膜为中枢神经系统的周边部分,从理论上推测丹参应该对视网膜缺血再灌注损伤有一定的防治作用,但是其作用机制尚不明确。李岱等[15]在不同的时间点检测视网膜缺血再灌注损伤中视网膜中MDA的含量、ERG中被标化的b波振幅等指标,发现复方丹参注射液可以通过减少氧自由基的含量,减轻细胞的损伤,并可以在功能上有助于ERG b波的恢复,对视网膜缺血再灌注损伤具有保护作用。代应辉等[16]通过电镜观察视网膜的超微结构,说明复方丹参注射液对视网膜有保护作用。本实验同样验证了丹参对视网膜缺血再灌注损伤具有保护作用,通过免疫组织化学检测和Western blot法检测Bcl-2蛋白表达,发现正常组织中未见Bcl-2阳性表达;缺血再灌注组6 h后Bcl-2开始少量表达,12 h后Bcl-2阳性表达增强,24 h后表达进一步增强,48 h达到高峰,72 h后下降。丹参处理组在各个时间点与缺血再灌注组变化趋势一致,但是Bcl-2阳性表达比缺血再灌注组明显增强。进一步证实了凋亡在视网膜缺血再灌注损伤中发挥重要作用,主要机制可能与Bcl-2的表达失衡有关,丹参对视网膜缺血再灌注损伤的保护机制可能通过调节Bcl-2的表达有关。

综上所述,丹参可减轻视网膜缺血再灌注损伤所致的视网膜病理性改变,减少节细胞的凋亡数。丹参上调凋亡抑制基因Bcl-2的表达,可能是丹参对视网膜缺血再灌注损伤起保护作用的重要机制之一。丹参作用广泛,毒副作用低,通过进一步探讨其作用机制,有可能成为治疗视网膜缺血再灌注损伤的有效药物。

[参考文献]

[1] 程 辉,李秀云,鞠学红. 视网膜缺血再灌注模型的建立与观察[J]. 解剖学研究,2009,31(2):139-141.

[2] 杨 丹,余德立,余资江. 视网膜缺血再灌注损伤的机制及药物治疗进展[J]. 局解手术学杂志,2012,21(5):561-563.

[3] Nucci C, Tartaglione R, Rombolà L. Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat[J]. Neurotoxicology, 2005,26(5):935-941.

[4] Quigley HA. Retinal ganglion cell death in experimented glaucoma and axotomy occas by apoptosis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(12):774-786.

[5] Ju WK, Kim KY, Park SJ. Nitric oxide is involved in sustained and delayed cell death of rat retina following transient ischemia[J]. Brain Res, 2000,881(2):231-236.

[6] 赵 颖,牛膺筠,高云霞,等. Fas/FasL在视网膜缺血再灌注损伤中的表达与细胞凋亡的关系及碱性成纤维细胞生长因子的治疗作用[J]. 中华眼底病杂志,2003,19(3):160.

[7] Tsujimoto Y, Shimizu S. The Bcl-2 family: life-or-death swich[J]. FEBS Lett, 2000,466(1):6-10.

[8] 张花治,刘 莹,白丽君,等. 原花青素对缺血-再灌注损伤后大鼠视网膜Bcl-2和Bax表达的影响[J]. 中国中医眼科杂志,2013, 23(2):83-86.

[9] 张铁华, 刘太平, 郝 晶. 丹参对视网膜缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 华北煤炭医学院学报, 2009,11(2):169-170.

[10] 周昆宝. 大剂量丹参黄芪治疗新生儿缺氧缺血性脑病的疗效观察[J]. 江西医学院学报,2004,44(1):78-79.

[11] 程 辉, 宋育泽. 中药治疗视网膜缺血再灌注损伤研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(4):189-191.

[12] 李 浩,张多斌,吴 岚,等. 丹参酮ⅡA对脑缺血再灌注损伤大鼠磷酸化p38MAPK和MMP-9表达及细胞凋亡的影响[J]. 中风与神经疾病杂志,2013,30(3):229-233.

[13] 徐 霞,杨 清,隋在云,等. 白花丹参水提物对缺血再灌注损伤大鼠脑组织中GSH、CAT和SOD、MDA的影响[J]. 河南中医,2013, 33(5):684-685.

[14] 陈向华,王和鸣,张 俐,等. 丹参酮对脊髓缺血再灌注损伤细胞因子TNF-A、TNF-β、IL-1Ra的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2012, 20(4):1-3.

[15] 李 岱,易明望,管志华. 复方丹参对缺血再灌注损伤鼠视网膜的保护作用[J]. 现代中西医结合杂志,2004,13(4):444-446.

[16] 代应辉,李寿玲,朱美玲,等. 复方丹参对视网膜缺血再灌注防护作用的研究[J]. 淮海医药,2005,23(6):433-435.

(编辑:魏 源)