基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1179-04

胰岛素在兔角膜碱烧伤后抗凋亡作用的初步研究

唐 霞[1],周善璧[1],陈小雄[1],杨舰寓[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016;2. 重庆市江津区人民医院感染科,重庆 402260)

【摘 要】目的:研究胰岛素(Insulin,INS)对兔角膜碱烧伤后角膜组织细胞凋亡及 Bcl-2 表达的影响。方法:建立兔Ⅱ度角膜碱烧伤动物模型,球结膜下分别注射生理盐水(B 组)和 INS(C 组),正常兔眼做对照(A 组)。用药后不同时间点取材,应用光镜、电镜及细胞凋亡原位末端标记法(TUNEL)分别检测角膜组织凋亡细胞,免疫组化法观察 Bcl-2 蛋白的表达和变化。结果:正常角膜上皮细胞层仅有极少量凋亡细胞,基质层及内皮细胞层几乎无凋亡细胞,Bcl-2 蛋白主要表达在上皮层,基质层及内皮层亦有少量表达。C 组在第 7、14 d 角膜 TUNEL 染色阳性细胞明显少于 B 组($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显多于 B 组($P<0.01$)。结论:INS 可能通过增加 Bcl-2 蛋白表达抑制碱烧伤角膜组织细胞凋亡。

【关键词】胰岛素;角膜;碱烧伤;抗凋亡

【中国图书分类法分类号】R772.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-29

Preliminary study about anti-apoptosis activity after application of the insulin in a rabbit model of corneal alkali burn

TANG Xia, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of insulin(INS) administration on the expression of Bcl-2 protein and the apoptosis of corneal histiocytes following rabbit model of corneal alkali burn. *Methods*: to establish Ⅱ degree rabbit model of corneal alkali burn, and respectively to inject normal saline (B group), INS (C group)in the subconjunction each day, and the normal rabbit eyes as controls(A group). The different time after operation the corneal samples were remove and fixed.the apoptosis of corneal histiocytes were detected by light microscope, electron microscope and transferase-mediated dUTP- digoxigenin nick and labeling assay (TUNEL), the expression and alteration of Bcl-2 protein using immunohistochemisty. *Results*: The TUNEL positive cells were present slightly in the epithelium of normal comea and not present onstroma and endothelium. Bcl-2 were expressed mainly on the normal corneal epithelium, a lower number of Bcl-2 expression on stroma and endothelium. The TUNEL positive cells of group C was stgnificantly lower than that ($P<0.01$) in group B, and the expression of Bcl-2 in group C was markedly increased on the 7th day and the 14th day in comparison with group B ($P<0.01$). *Conclusion*: Insulin can protect from the apoptosis of corneal alkali burn through increasing the expression of Bcl-2.

【Key words】Insulin; Cornea; Alkali burn; Anti-apoptosis

眼部碱烧伤,约占整个眼表疾病的 10%,严重影响视功能,其病理过程与炎性细胞因子,调亡基因等密切相关。胰岛素(Insulin,INS)作为一种蛋白激素具有促进糖原、脂类及蛋白质合成作用,近年大量实验证实,其还具有抗炎、抗凋亡的重要生物学意义[1-3],从而再次引起国内外对胰岛素的广泛关注。体外实验证明,胰岛素具有促进角膜上皮细胞生长,抑制其调亡的作用[4],但在角膜碱烧伤中的作用报道较少。本研究以兔角膜碱烧伤为模型,研究胰岛素对角膜碱烧伤后角膜组织细胞凋亡及 Bcl-2 表达的影响,以探讨 INS 治疗角膜碱烧伤的抗调亡作用机制及临床价值。

作者介绍:唐 霞(1983-),女,硕士,

研究方向:眼表面疾病。

通讯作者:周善璧,男,教授,E-mail:zhoushanbi@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 选择健康雌性新西兰大白兔(由重庆医科大学动物中心提供)35 只,体重 2.0 ~ 3.0 kg,无眼疾;随机分为 3 组:A 组(正常对照组)、B 组(生理盐水组)、C 组(INS 组),A 组 5 只其余每组 15 只。

1.1.2 主要试剂 INS (万邦医药),TUNEL 试剂盒(Roche,德国),bcl-2 免疫组化染色试剂盒和 3,3- 甲基联苯胺(3,3 diamin-benzidine,DAB) 显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 采用 10%水合氯醛对兔进行腹腔注

射麻醉,0.4%盐酸奥布卡因右眼表面麻醉后,使用开睑器充分暴露眼球;用直径 8 mm 滤纸浸入 1 mol/L NaOH 溶液中30 s 取出,轻触干滤纸吸取多余的液体,然后迅速将滤纸片准确贴敷于角膜中央 40 s 后取下,立即用 50 ml 生理盐水冲洗结膜囊,林可霉素滴眼液滴眼。角膜中央圆形淡瓷白色,碱烧伤Ⅱ度为造模成功。正常对照组不做任何处理。

1.2.2 给药方法 B 组(生理盐水组)、C 组(INS 组)术后每日分别按其分组右眼球结膜下注射(注射前行盐酸奥布卡因滴眼液表麻) 生理盐水 0.075 ml/kg,INS 3 IU/Kg 即 0.075 ml/kg,1 次/日[5];同时 C 组于注射前常规 10 %葡萄糖注射液 10 ml 灌胃,注射后 30 min 检测血糖(血糖不低于 130 mg/100 ml,低于时给予葡萄糖注射液)。

1.2.3 取材及标本制作 各组新西兰大白兔在造模后第 1 d、第 7 d 和第 14 d,每组每个时间点随机选取 5 只,用 10%水合氯醛行腹腔注射麻醉后, 用 8.0 环钻从角膜中央钻入,深达后弹力层即可, 随后在角膜缘外约 1 mm 处先用刀片切穿一小口,再用眼科剪环形剪下角膜,立即对称分为二等分。

1.2.4 组织病理学检测 B 组、C 组角膜及正常角膜的一半均立即置于 4%中性甲醛溶液中固定。行常规苏木精一伊红染色,光镜观察。

1.2.5 透射电镜观察 每组每个时间点随机选取一只兔角膜其中一半置于 4%中性甲醛中固定,以备凋亡及免疫组织化学检测用。另一半角膜中央部修切成大约 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块,置于 2%中性戊二醛 -2.5%多聚甲醛(1:1)4℃固定 2 h,换液,1%锇酸固定,梯度乙醇脱水,分步置换,E-pon812 包埋,半薄切片光镜观察定位后超薄切片,醋酸双氧铀/枸酸铅染色,Hitachi-600 型透射电镜下观察。

1.2.6 TUNEL 检测 各组角膜组织 4%中性甲醛固定 48 h 后石蜡包埋,4 μm 切片检测。具体操作步骤依照说明书进行。最后 DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。阳性对照:蛋白酶 K 处理后,用 Dnase Ⅰ(1 μg/ml)室温消化 10 min,其余步骤同上。阴性对照:用 0.01 mol/L PBS 缓冲液代替 TUNEL 液孵育。结果判定:阳性反应为细胞核染成棕黄色。每个角膜标本中任意一张玻片有阳性细胞即认为此角膜 TUNEL 反应阳性。每组每个时间点取 5 张切片,每张切片取 4 个 200 倍视野,用全自动图像分析系统测阳性染色的总面积及光密度,计算阳性单位(Pu)平均值。

1.2.7 Bcl-2 蛋白检测 采用免疫组化 ABC 法染色,具体步骤参考说明书进行。阳性对照片及结果判定标准:以试剂盒中未染色的已知阳性对照片与被测标本同时染色作阳性对照,以 PBS 取代一抗作阴性对照,光镜下观察 bcl-2 蛋白表达的部位及强度。结果判定标准同上。

1.2.8 统计学处理 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 for windows 统计软件进行分析,统计方法:多个样本均数比较采用单向方差分析(One-way ANOVA),样本均数间的多重比较采用 LSD 法。$P<0.01$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色结果

角膜碱烧伤后第 1 d,B、C 组均可见上皮细胞缺失,表层部分纤维成份断裂脱落,基质层纤维水肿明显,排列紊乱,胶原纤维发生退行性变, 角膜周围可见大量炎性细胞浸润;后弹力层断裂呈波浪状皱褶; B 组基质细胞缺失,C 组可见大部分基质细胞坏死、核固缩、碎裂,但深层残留少许基质细胞。第 7 d(图 1 ~ 3)烧伤处覆盖有单层或双层上皮细胞,部分细胞核染色质凝聚、边集,呈凋亡特征。角膜碱烧伤中央区:B 组基质层纤维仍水肿明显,基质细胞仍大量缺失;但 C 组角膜基质层纤维水肿明显减轻,而且基质中少量基质细胞出现。周边角膜仍可见大量炎性细胞浸润,浅基质层可见大量新生血管,管腔由单层内皮细胞围成,部分管腔内充满红细胞。第 14 d,角膜上皮基本修复,仍可见凋亡细胞。B 组基质层轻微水肿,前基质层纤维排列紊乱,部分基质细胞融合,可见多个胞核,周边角膜仍可见少量炎性细胞浸润。C 组基质层水肿基本消退,可见大量基质细胞,有的可见新生结缔组织。可见胰岛素组(C 组)角膜恢复明显好于对照组(B 组)。

2.2 透射电镜观察

透射电镜观察第 1 d 角膜上皮层缺失,基质纤维排列紊乱,基质层可见凋亡细胞 ,B、C 组差别不大;第 7 d B 组角膜基质纤维排列紊乱,上皮层及基质层均有凋亡细胞,表现为核染色质凝聚,断裂,呈斑块状边集于核膜下,胞浆皱缩,细胞器变性、空泡变(图 4)。C 组角膜上皮覆盖有单层或双层上皮细胞,基质纤维排列整齐,凋亡细胞少(图 5);第 14 d 上皮基本修复,B 组角膜基质纤维排列紊乱, 基质层仍可见凋亡细胞。 C 组基质细胞处于成熟状态。正常角膜中未见凋亡及上述异常。

2.3 TUNEL 染色及图像分析结果

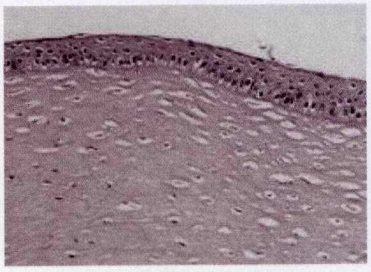
细胞核中有黄褐色颗粒者为阳性表达。正常新西兰大白兔角膜浅层上皮存在少量阳性染色,而在基质及内皮层几乎无阳性表达。碱烧伤后第 1 d(B 组,C 组)角膜各层均可见散在细胞凋亡,两组阳性单位 PU 平均值差异无显著性($P>0.05$);碱烧伤后第 7 d B 组角膜各层细胞凋亡明显增多(图 6),以上皮中下层及前基质层为主, 有多量染色阳性细胞分布, 而第 14 d B 组角膜各层细胞凋亡有所减少;与 B 组同一时间点相比,碱烧伤后第 7 d 和 14 d C 组角膜染色阳性细胞表达明显减低(图 7)($P<0.01$)。各组 TUNEL 染色图像分析结果见表 1。

2.4 BCL-2 蛋白表达及图像分析结果

细胞浆呈棕黄色染色者为阳性表达。在正常新西兰大白兔角膜,Bcl-2 蛋白主要表达于上皮层,在基质层及内皮层亦有少量表达。碱烧伤后第 1 d B 组和 C 组角膜 Bcl-2 蛋白表达轻度减低,与 A 组相比差异有显著意义($P<0.01$),B 组与 C 组差异无显著意义($P>0.05$);与 B 组同一时间点相比,碱烧伤后第 7 d 和 14 d C 组角膜 Bcl-2 蛋白表达明显增多($P<0.01$)(图 8、9)。

3 讨 论

INS 作为一种多功能蛋白质激素具有促进糖原、脂类及蛋白质合成作用,近年来国内外研究证实胰岛素在全身多处组织器官损伤中具有抗炎和抗凋亡作用。近期国内外研究表明角膜损伤、角膜移植术后,局部微环境的改变与角膜上皮、基质细胞的凋亡发生和凋亡调控密切相关[6,7]。在角膜上



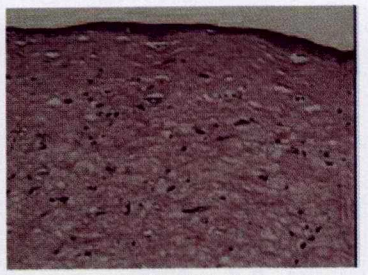
正常角膜组织

图 1 正常角膜病理切片(HE 染色 ×200)



第 7 d 角膜烧伤处覆盖单层上皮细胞，基质细胞仍大量缺失

图 2 生理盐水组角膜病理切片(HE 染色 ×200)



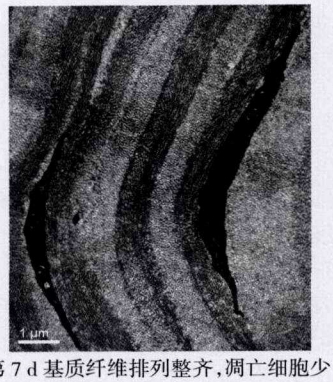
第 7 d 角膜烧伤处覆盖单层或双层上皮细胞，基质中少量基质细胞出现

图 3 胰岛素组角膜病理切片(HE 染色 ×200)



第 7 d 凋亡的基质细胞核染色质异常聚集，呈斑块状边集于核膜下

图 4 生理盐水组电镜观察(×5 000)



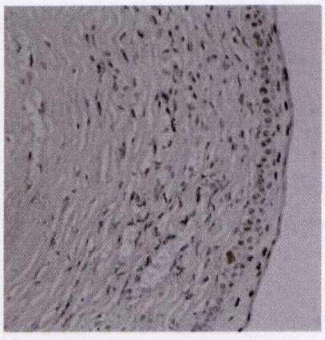
第 7 d 基质纤维排列整齐，凋亡细胞少

图 5 胰岛素组电镜观察(×12 000)

表 1 各组 TUNEL 染色阳性单位平均值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 d(5 例)	第 7 d(5 例)	第 14 d(5 例)
A		0.199 ± 0.005(正常对照组 5 例)	
B	0.260 ± 0.023#	0.428 ± 0.043#	0.355 ± 0.020#
C	0.250 ± 0.024#	0.320 ± 0.032##	0.236 ± 0.007##

注：#. 与 A 组相比，$P<0.01$；##. 与同一时间点 B 组相比，$P<0.01$



第 7 d 角膜上皮和浅基质层可见大量 TUNEL 染色阳性细胞存在

图 6 生理盐水 TUNEL 染色阳性表达(×200)



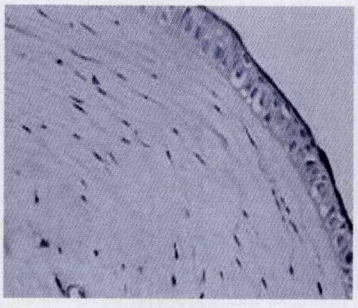
第 7 d 角膜上皮及浅基质中 TUNEL 染色阳性细胞较 B 组明显减少

图 7 胰岛素组 TUNEL 染色阳性表达(×200)

表 2 各组 Bcl-2 蛋白阳性单位平均值 ($\bar{x} \pm s$)

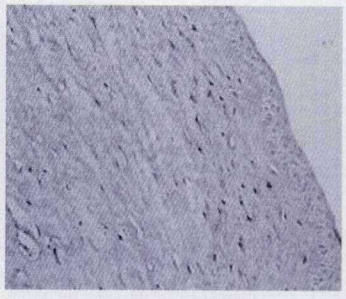
组别	第 1 d(5 例)	第 7 d(5 例)	第 14 d(5 例)
A		0.404 ± 0.016(正常对照组 5 例)	
B	0.330 ± 0.012#	0.221 ± 0.033#	0.313 ± 0.019#
C	0.342 ± 0.025#	0.291 ± 0.013##	0.349 ± 0.015##

注：#. 与 A 组相比，$P<0.01$；##. 与同一时间点 B 组相比，$P<0.01$



第 7 d 角膜上皮、基质层中 Bcl-2 极少量表达于细胞浆，呈棕黄色颗粒

图 8　生理盐水组 Bcl-2 表达(×200)



第 7 d 角膜上皮、基质层中 Bcl-2 表达于细胞浆，呈棕黄色颗粒

图 9　胰岛素组 Bcl-2 表达(×200)

皮清创术中，角膜上皮被刮除，暴露其下的基底膜，可以观察到角膜基质细胞立即出现凋亡。最近 Wilson 等[8]对角膜伤口愈合中凋亡的作用进行了研究，发现角膜损伤修复与组织炎症和细胞凋亡密切相关。

胰岛素抗凋亡作用已经在视网膜神经元等多种组织细胞中被证实，有研究显示胰岛素通过磷脂酰肌 -3 激酶/蛋白激酶 B(PI3-k/Akt)信号转导途径，抑制视网膜神经元凋亡[9]。蛋白激酶 B 是 PI3K 信号转导途径中的关键分子，为丝氨酸激酶，可磷酸化多种与凋亡有关的底物[10]，包括 BCL-2 家族中的 BAD(BAD 磷酸化后失去其促凋亡效应)、叉头转录因子、糖原合成酶 3α/β 等。Bcl-2 家族对细胞凋亡的调控起关键作用，其中 Bcl-2 是一种作用较强的凋亡抑制基因，富含于线粒体膜上，具有维护线粒体膜的完整性及生理通透性的重要作用，对细胞凋亡有明显的抑制作用。研究证实胰岛素有增加 Bcl-2 蛋白表达抑制凋亡[11]，当胰岛素缺陷时 Bcl-2/Bax 比例明显降低而导致细胞凋亡[12]。本实验在上述研究的基础上初步探讨胰岛素对角膜碱烧伤后抗凋亡作用的机制，结果表明：正常兔角膜 Bcl-2 蛋白主要表达于上皮层，在基质层及内皮层亦有少量表达，可能与维持局部微环境的稳定和正常代谢有关；碱烧伤后第 1 d 生理盐水组与胰岛素组 Bcl-2 蛋白表达轻度减低，细胞凋亡数轻度增加，且两组无明显差异；而第 7 d 和第 14 d 生理盐水组 Bcl-2 蛋白表达明显降低，而细胞凋亡则明显增多。说明碱烧伤后角膜细胞凋亡的发生与 Bcl-2 表达下降密切相关。胰岛素组分别在第 7 d 和第 14 d 较生理盐水组 Bcl-2 蛋白表达增多，细胞凋亡减少，且两组有明显差异。我们推测胰岛素可能通过增加 Bcl-2 蛋白表达抑制碱烧伤角膜的凋亡，促进上皮的愈合，这与报道的胰岛素具有促进角膜上皮细胞生长，抑制其调亡的作用是一致的[4]，其具体参与机制尚需进一步探讨。

尽管目前胰岛素在角膜抗凋亡方面研究比较少，但已有报道证明胰岛素对上皮损伤修复有较明显的效果，以及在其他如脑细胞、心肌细胞、子宫内膜癌细胞、视网膜神经元等组织器官的抗凋亡作用得到了证实。且胰岛素同时可能具有保护和修复角膜神经的优势，价格便宜，用药方便，这为临床治疗角膜损伤提供了一条新的治疗途径，但其具体机制仍需进一步研究。

参　考　文　献

[1] Wu X H, Yang S H, Duan D Y, et al. Anti-apoptotic effect of insulin in the control of cell death and neurologic deficit after acute spinal cord injury in rats[J]. J Neurotrauma, 2007, 24 (9): 1502-1512.

[2] Tsuruta S, Matsumoto M, Fukuda S, et al. The effects of cyclosporin A and insulin on ischemic spinal cord injury in rabbits[J]. Anesth Analg, 2006, 102(6): 1722-1727.

[3] Jeschke M G, Boehning D F, Finnerty C C, et al. Effect of insulin on the inflammatory and acute phase response after burn injury[J]. Crit Care Med, 2007, 35(9 Suppl): S519-523.

[4] Yanai R, Yamada N, Inui M, et al. Correlation of proliferative and anti-apoptotic effects of HGF, Insulin, IGF-1, IGF-2, and EGF in human corneal epithelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45 (5): 3804.

[5] Singh R S, Fort P E, Losiewicz M K, et al. Low dose periocular insulin treats retinal neurodegeneration in experimental diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(4): 5361.

[6] Chen M, Shi W Y, Wang F H, et al. CTLA4-FasL protein for the prevention of immune rejection in mouse corneal transplantation[J]. Zhonghua Yan Ke Za Zhi, 2008, 44(1): 56-60.

[7] 李　冰，李晋春，王效武. 紫外线光损伤角膜细胞凋亡的实验研究[J]. 眼科研究，2005，23(5)：485-487.

[8] Wilson S E, Chaurasia S S, Medeiros F W. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response[J]. Exp Eye Res, 2007, 85(3): 305-311.

[9] Barber A J, Nakamura M, Wolpert E B, et al. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3[J]. J Biol Chem, 2001, 276(8): 32814-32821.

[10] Mayo L D, Donner D B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(20): 11598-11603.

[11] Yu Y C, Xin X Y, Zhang F, et al. Effect of insulin on apoptosis of cultured human trophoblast cells and its mechanism[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2003, 19(5): 496-498.

[12] Ricci C, Pastukh V, Mozaffari M, et al. Insulin withdrawal induces apoptosis via a free radical-mediated mechanism[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2007, 85(3-4): 455-464.

(责任编辑：关蕴良)