

• 实验研究 •

雌激素对鼠视网膜缺血再灌注所致视网膜损伤的保护作用

代艳 陈晓明 陈小虎

【摘要】 目的 探讨雌激素对大鼠视网膜缺血再灌注所致视网膜损伤的保护作用。 **方法** 60 只去势雌性 SD 大鼠随机分为 2 组,行前房灌注,建立视网膜缺血再灌注(RIR)模型。实验组在升高眼压前 2 h 按 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量皮下注射 17 β -雌二醇。对照组大鼠皮下注射等量生理盐水。分别在灌注前,再灌注后 12、24、48、72 h 对视网膜进行常规 HE 染色切片,观察细胞丢失情况及测量视网膜内层厚度。采用末端脱氧核糖转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷缺口末端标记法(TUNEL 法)检测视网膜组织中凋亡细胞的表达。 **结果** 实验组再灌注后 24、48 h 的凋亡细胞数目明显低于对照组($P < 0.05$),光学显微镜下计数视网膜神经节细胞数较对照组多($P < 0.05$)。 **结论** 雌激素对缺血再灌注所导致的视网膜损伤具有保护作用。

【关键词】 再灌注损伤; 视网膜血管; 细胞死亡; 雌激素/生理学; 疾病模型、动物

中图分类号:R446.9 R774.1

Protective effect of estrogen on rat's retina injured by transient ischemia-reperfusion DAI Yan, CHEN Xiao-ming, CHEN Xiao-hu, Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: DAI Yan, Email: daiyan197621@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the protective effect of estrogen on survival of retinal ganglion cells (RGCs) after transient retinal ischemia-reperfusion (RIR) in rats. **Methods** RIR was induced in 60 ovariectomized adult rats (OVX) by increasing intraocular pressure via an intracameral catheter. All of the rats were divided into two groups randomly: in experimental group, the rats underwent a subcutaneous injection with 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 2 hours before retinal ischemia; and in the control group, saline water was injected correspondingly. The number of RGCs and the thickness of the inner retinal layers were measured by HE staining method before and 12, 24, 48, and 72 hours after reperfusion. TdT-mediated biotin-dUTP nick end labelling (TUNEL) staining technique was used to examine the apoptosis of RGCs. **Results** Twenty-four and 48 hours after reperfusion, the number of apoptotic cells in experimental group was obvious lower than that in the control group ($P < 0.05$), and the number of RGCs in experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Estrogen can protect retinal neurons from transient RIR in ovariectomized rats.

【Key words】 Reperfusion injury; Retinal vessels; Cell death; Estrogens/physiology; Disease models, animal

视网膜组织缺血再灌注(RIR)见于高眼压青光眼、视网膜血管阻塞性疾病过程中。眼缺血再灌注时,视网膜组织发生一系列代谢和结构的改变,从而导致视网膜神经组织的损伤,引起永久性视力损失^[1]。因此,研究眼缺血-再灌注损伤,提高对缺血-再灌注的耐受能力,对防止急性青光眼导致的视神经损害具有重要意义。大量的动物实验及临床研究结果显示,雌激素对急性缺血、缺氧性神经损伤具有明显的神经保护作用^[2,3]。我们采用雌激素作为保护剂,通过对视网膜组织形态观察、凋亡细胞的检测,探讨其可能的防护作用及机理,为临床运用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组

四川大学动物中心提供的 Sprague-Dawley (SD) 健康成年雌性大鼠 60 只,体重 200~250 g,室温环境饲养。裂隙灯下检查角膜透明,双瞳孔等大等圆,虹膜血管清晰。全部大鼠切除双侧卵巢。随机分为实验组和对照组,每组 30 只大鼠。实验组在前房灌注前 2 h 皮下注射 17 β -雌二醇(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)(美国 Sigma 公司产品),对照组给予等量生理盐水皮下注射。

1.2 视网膜缺血再灌注模型的建立

切除双侧卵巢 2 周后用 5% 水合氯醛按 6 ml/kg 的剂量腹腔注射全身麻醉大鼠,1% 倍诺喜眼表麻醉,

4.5 号输液针头行右眼前房穿刺,注意不伤及虹膜和晶状体,接通预先连接好的平衡盐液瓶,瓶内液面高度调整在 1360 mm,检查穿刺口无漏水,此时眼内压达到 102 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)左右,可观察到眼底血管断流,视网膜苍白。持续 1 h,缓慢放低输液瓶,拔出穿刺针头,可见视网膜恢复供血。

1.3 标本固定和切片

分别于实验前及再灌注后 12、24、48、72 h 采用腹腔注射过量麻药处死动物,迅速摘除眼球,12 点钟位标记。每组 6 只眼球以 4% 中性多聚甲醛固定 72 h,平衡盐液冲洗后梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。将包埋好的眼球标本前端以角膜中央定位,后端以视神经根定位,前后方位视网膜全层切片,切片厚度 4~6 μm ,取视网膜中央区切片,常规 HE 染色。日本 Nikon TE2000-U 倒置显微镜拍照。

1.4 细胞密度计算和形态测量

为定量评价缺血再灌注引起视网膜节细胞的丢失程度,每份标本取 3 张切片计数距视盘边缘 100 μm 处两侧视网膜节细胞层,100 μm 长度内神经节细胞作为细胞密度^[1,6]。视网膜内层厚度(指视网膜内界膜到外网状层内缘的距离)测量距视盘边缘 200 μm 处 100 μm 长度内随机取 4 点的平均厚度。应用美国 Image-Pro plus 专业图像分析软件系统进行测定。

1.5 原位凋亡的检测

原位凋亡(TUNEL)法用德国宝灵曼公司试剂,按试剂盒说明进行操作。阳性凋亡视网膜神经节细胞(RGCs)细胞的判断:以细胞核呈棕色染色为阳性细胞。计数以视盘为中心向两侧各 2 mm 长度内凋亡细胞数,记数方法同 RGCs 计数。

1.6 血浆雌激素水平测定

在处死动物前,经心脏取血 3 ml,以离心半径

13.5 cm、1 000 r/min 离心 15 min,提取血清,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,化学发光法测定血清雌激素水平。

1.7 统计学处理

计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用成组设计的 *t* 检验比较两组之间的差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血中雌激素水平

RIR 后 24 h,对照组雌激素水平[(72.67 \pm 7.28) pg/ml]明显低于实验组[(461.67 \pm 23.04) pg/ml]($t=39.425, P=0.000$)。

2.2 光学显微镜检查及细胞计数

RIR 前,实验组视网膜内层厚度为(101.17 \pm 3.76) μm ,RGCs 数为(0.096 7 \pm 0.015 1)个/ μm (图 1A);对照组视网膜内层厚度为(100.7 \pm 4.71) μm ,RGCs 数为(0.095 0 \pm 0.013 8)个/ μm 。两组差异无统计学意义($t=0.406, 0.200; P=0.693, 0.845$)。RIR 后 24 h,对照组 RGCs 数为(0.040 83 \pm 0.075)个/ μm ,实验组 RGCs 数为(0.061 7 \pm 0.011 7)个/ μm (图 1b),与对照组相比,较好地保存了 RGCs($t=2.349, P=0.045$)。RIR 后 72 h,对照组视网膜内层厚度为(86.0 \pm 4.43) μm ,RGCs 数为(0.045 \pm 0.010 5)个/ μm (图 1c);实验组视网膜内层厚度为(93.5 \pm 5.99) μm ,RGCs 数为(0.060 \pm 0.010)个/ μm ($t=2.466, 2.423; P=0.033, 0.036$)(图 1D)。

2.3 凋亡阳性细胞的表达情况

RIR 前两组均未发现 TUNEL 阳性细胞(图 2A)。对照组 RIR 后 12 h 仅发现少量 TUNEL 阳性细胞,24 h 凋亡数目达峰值,凋亡细胞数为(3.33 \pm 1.03)个,48 h 凋亡细胞有所减少(2.17 \pm 0.75)个,72 h 明显减少。实验组变化规律同对照组,但 RIR 后

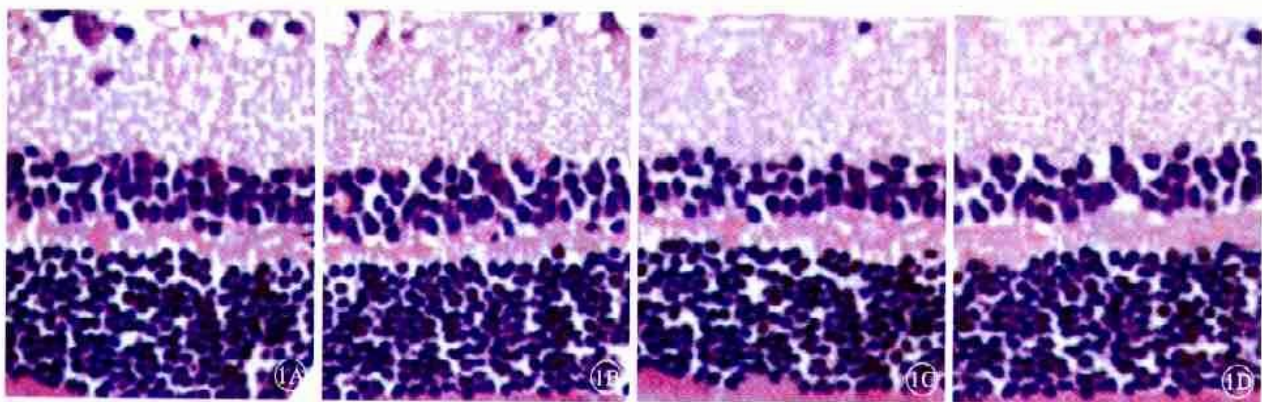


图 1 大鼠视网膜再灌注前后光学显微镜像。1A. 灌注前实验组大鼠光学显微镜像;1B. 再灌注后 24 h, 实验组神经节细胞数减少;1C. 再灌注后 72 h, 对照组视网膜内层厚度变薄;1D. 再灌注后 72 h, 实验组视网膜内层厚度及神经节细胞较对照组损伤轻 HE $\times 400$

Fig. 1 Photograph of light microscopy of rat's retina before and after reperfusion. 1A. Before reperfusion in experimental group; 1B. 24 hours after reperfusion in experimental group, decreased number of retinal ganglion cells (RGCs); 1C. 72 hours after reperfusion in control group, thinner inner retina; 1D. 72 hours after reperfusion in experimental group, more lightly injured inner retina and RGCs than those in the control group HE $\times 400$

12 h 未发现凋亡细胞的阳性表达。实验组 RIR 后 24 h [(2.00 ± 0.63) 个] (图 2 B) 及 48 h [(1.17 ± 0.41) 个] 与相应对照组比较凋亡细胞数均显著减少 ($t = 2.697, 2.860; P = 0.026, 0.022$)。

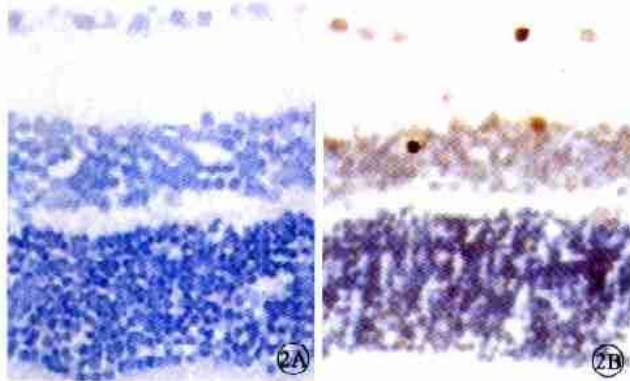


图 2 实验组大鼠灌注前及再灌注 24 h 后大鼠视网膜 TUNEL 染色像。2A. 灌注前在视网膜神经节细胞层未见 TUNEL 阳性细胞; 2B. 再灌注后 24 h, 在视网膜神经节细胞层可见 TUNEL 阳性细胞 TUNEL × 400

Fig. 2 Photograph of TUNEL staining of rat's retina before and 24 hours after reperfusion in experimental group. 2A. no TUNEL positive cell in RGC layer before reperfusion; 2B. TUNEL positive cell in RGC layer 24 hours after reperfusion TUNEL × 400

3 讨论

本实验中,我们运用去势方法降低大鼠体内的雌激素水平,实验组皮下补充雌激素使其高于对照组。研究表明,皮下补充雌激素 100 μg/kg, 2 h 后体内可达高峰^[3],并对视网膜缺血再灌注损伤具有保护作用。我们亦应用这一剂量,24 h 后实验组雌激素仍维持在较高水平。对照组大鼠缺血 60 min 后再灌注 24 h 可见视网膜组织有明显的病理改变;RGCs 丢失,核固缩;TUNEL 阳性细胞数最多,48 h 后凋亡细胞有所减少,72 h 后明显减少,可能是被具有吞噬功能的细胞清除所致。而在实验组缺血 60 min 后再灌注 24、48 h, TUNEL 阳性细胞较对照组明显减少。形态测量发现再灌注后 72 h,实验组视网膜内层明显厚于对照组。表明实验组视网膜内层萎缩变性程度较轻。说明雌激素可部分地保护缺血再灌注对视网膜内层造成的损伤。我们在实验中仅补充了雌激素的同一剂量,还不能判断其保护作用与体内浓度的关系。我们和其他的研究均证实,再灌注后主要出现视网膜内层损伤,确切机制尚需进一步研究^[4,5]。

缺血再灌注损伤可以引起氧自由基和兴奋性氨基酸的大量产生,细胞内钙超载^[7]等,从而诱发细胞凋亡。大量实验发现视网膜神经节细胞层可见凋亡细胞^[3,8,9],我们的实验亦支持这一点。凋亡也是病理状态下人的视网膜神经节细胞死亡的重要机制。可见,研

究雌激素对视网膜组织细胞(尤其是神经节细胞)凋亡的抑制具有重要意义。目前研究结果表明,雌激素可以通过受体或非受体依赖性以及基因或非基因两种途径对抗各种损伤因素,如雌激素可通过结构活性关系实现抗氧化作用^[10];促进神经营养因子的表达,改善细胞修复功能^[11];上调受体以抑制核因子-kappa B 的活化,从而减轻缺血再灌注后炎症反应程度^[12];抑制 NMDA 受体,对抗 N-甲基天冬酸诱导的兴奋毒性,改变细胞静息电位,抑制细胞外 Ca²⁺内流及细胞内储存的 Ca²⁺释放,减轻 Ca²⁺超载造成的迟发性神经元坏死^[13]。此外,雌激素可以上调 bcl-2 mRNA 表达,抑制细胞凋亡的发生^[14]。至于雌激素是否通过以上机制保护视网膜神经细胞,尚需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Perlman JJ, McCole SM, Palluru P, et al. Disturbances in the distribution of neurotransmitters in the rat retina after ischemia. *Curr Eye Res*, 1996, 15: 589-596.
- 2 Linford NJ, Dorsa DM. 17 beta-estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids*, 2002, 67: 1029-40.
- 3 Kaja S, Yang SH, Wei J, et al. Estrogen protects the inner retina from apoptosis and ischemia-induced loss of Ves1-IL/Homer 1c immunoreactive synaptic connections. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 3155-3162.
- 4 Hughes WF. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res*, 1991, 53: 573-582.
- 5 Hayashi A, Weinberger AW, Kim HC, et al. Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, ameliorates retinal degeneration after ischemia-reperfusion injury in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38: 1193-1202.
- 6 王琳, Ogata N, Takahashi K, 等. 色素上皮衍生因子对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用. *中华眼底病杂志*, 2001, 17: 138-140.
- 7 Torino N, Akaike A, Yasuyoshi H, et al. Lomerizinc, a Ca²⁺ channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. *Exp Eye Res*, 2000, 70: 475-484.
- 8 胡世兴, 王萧, 林少春, 等. 缺血再灌注损伤诱导大鼠视网膜细胞凋亡. *中华眼底病杂志*, 2002, 18: 296-298.
- 9 Lam TT, Abler AS, Ueo MOM. Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 967-975.
- 10 Behl C, Skutella T, Jezouat'h F, et al. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens; structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*, 1997, 51: 535-541.
- 11 Singer CA, Figueroa Masot XA, Barchelor RH, et al. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci*, 1999, 19: 2455-2463.
- 12 Dodel RC, Du Y, Bales KR, et al. Sodium salicylate and 17beta-estradiol attenuate nuclear transcription factor NF-kappaB translocation in cultured rat astroglial cultures following exposure to amyloid A beta (1-40) and lipopolysaccharides. *J Neurochem*, 1999, 73: 1453-1460.
- 13 Weaver CE Jr, Park-Chung M, Gibbs TT, et al. 17 beta estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res*, 1997, 761: 338-341.
- 14 Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, et al. Estradiol modulates bcl 2 in cerebral ischemia; a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*, 1999, 19: 6385-6393.

(收稿日期: 2004-12-08)

(本文编辑: 朱敏)