

# 重组人促红细胞生成素对急性高眼压兔视网膜谷氨酸表达的影响

王建明 熊 蕾 孙乃学 赵世平

## Effects of recombinant human erythropoietin on glutamate expression in the retina with acute high intraocular pressure in a rabbit model

Wang Jianming, Xiong Lei, Sun Naixue, Zhao Shiping. Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

**Abstract Objective** The neuroprotection provided by recombinant human erythropoietin (rhEPO) on the retina from ischemia-reperfusion injury has been confirmed but its mechanism is not fully understood. The present study aimed to investigate the effect of systemic administration of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on the expression of glutamate in the retina after acute high intraocular pressure in vitro. **Methods** The acute high intraocular pressure models were established by the perfusion of physiological saline into anterior chamber of the lateral eye in forty-eight Japanese white rabbits. Other 6 Japanese white rabbits were as normal control group. The experimental rabbits were then equally divided into the model group and EPO group, and hypodermic injection of rhEPO was only performed in the EPO group. Glutamate expression in the retina in both groups was observed by immunohistochemistry on days 1, 3, 7, and 14 after retinal ischemia-reperfusion. Glutamate expression in another 6 rabbit retina without any treatment was determined as normal by the same method. The use of animal followed the Standard of Association for Research in Vision and Ophthalmology. **Results** No positive expression of glutamate was observed in normal rabbit retina, but positive expression response of glutamate occurred in the rabbit retina of the model group. The number of positive expression cells in the EPO group was more than that in the model group at each time point ( $P < 0.01$ ). On day 14 after ischemia-reperfusion, the number of positive expression cells was  $3.3 \pm 1.1$  per high visual field in the retina of the model group but  $0.3 \pm 0.2$  in the retina of the EPO group, showing a significant decrease of positive expression cells in EPO group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Systemic administration of rhEPO can down-regulate the expression of glutamate in the retina with acute high intraocular pressure. This process may be one of the mechanisms that rhEPO protects the retina from ischemia reperfusion injury.

**Key words** erythropoietin; glutamate; retina; neuroprotection

**摘要 目的** 探讨全身应用重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 对急性高眼压兔眼视网膜谷氨酸表达的影响。 **方法** 采用日本大耳白兔 54 只, 其中 6 只兔设为正常对照组。其余 48 只兔采用生理盐水前房灌注加压法建立急性高眼压模型, 其中 24 只兔皮下注射 rhEPO 为 EPO 组, 另外 24 只兔为模型组。分别于造模后第 1、3、7、14 天免疫组织化学法观察视网膜谷氨酸的表达。 **结果** 正常组视网膜组织无谷氨酸表达。模型组兔眼视网膜出现谷氨酸阳性表达细胞, 各观察时间点 EPO 组兔眼视网膜谷氨酸阳性表达细胞数较模型组减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。实验第 14 天, 模型组视网膜谷氨酸阳性表达细胞数为  $(3.3 \pm 1.1)$  个/高倍视野, EPO 组为  $(0.3 \pm 0.2)$  个/高倍视野, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。 **结论** rhEPO 可以下调兔眼急性高眼压引起的视网膜谷氨酸高表达, 可能与 rhEPO 保护视网膜神经功能损害有关。

**关键词** 促红细胞生成素; 谷氨酸; 视网膜; 神经保护

**分类号** R 775 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)12-1080-04

本课题为陕西省科技攻关基金(2008K14-07-4)、西安市社发医药卫生研究项目(SF08004-2)资助  
作者单位: 710004 西安交通大学医学院第二附属医院眼科  
通讯作者: 王建明 (Email: xajdwjm@163.com)

促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 能够通过刺激骨髓红系造血, 作为治疗各种原因引起的贫血药物在临床上应用广泛, 不良反应少。视网膜缺血-再灌注可以导致严重的视神经损害, 兴奋性氨基酸参与了

神经的损害过程。近来的研究表明, EPO 可能是一种新的视网膜神经保护药物<sup>[1-3]</sup>。EPO 是否可通过调节缺血-再灌注损伤视网膜的氨基酸释放尚不清楚。本研究通过观察视网膜谷氨酸表达的变化, 进一步探讨重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)对急性高眼压视网膜缺血-再灌注时视网膜神经功能的保护机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 健康成年日本大耳白兔 54 只(西安交通大学医学实验动物中心提供), 体重 2.0~2.5 kg, 雌雄不限。实验前裂隙灯显微镜及检眼镜检查眼部无异常。6 只兔设为正常对照组, 其余 48 只兔平均分为模型组和 EPO 组, 每只兔任选 1 只眼作为实验眼, 建立急性高眼压模型。实验过程中动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明。

**1.1.2 主要药物及试剂** rhEPO(成都地奥制药有限公司); 眼表面麻醉剂 benoxil(日本参天制药株式会社); 普南扑灵滴眼液(日本千寿制药株式会社); 一抗为兔谷氨酸多克隆抗体(武汉博士德公司); 免疫组织化学染色浓缩型 SP 系列检测试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 急性高眼压模型的建立** 采用生理盐水前房灌注加压法<sup>[2]</sup>, 造成 110 mmHg(1 mmHg = 0.133kPa)的眼压, 持续 50 min, 然后恢复正常眼压使视网膜血供恢复, 建立实验性急性高眼压的视网膜缺血-再灌注损伤模型。

**1.2.2 实验动物造模后的处理** 于造模前 3 d 及造模结束时, EPO 组兔按每公斤体重给予 rhEPO 100  $\mu\text{mol}/\text{min}$  皮下注射, 共 2 次。于造模后第 1、3、7、14 天每组各摘除 6 只眼球( $n=6$ ), 40 g/L 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 进行视网膜免疫组织化学染色, 观察视网膜组织谷氨酸的表达。

**1.2.3 视网膜谷氨酸表达的免疫组织化学染色及观察** 采用标准的 SP 免疫组织化学检测方法, DAB 显色。阴性对照用 PBS 代替一抗。常规 5  $\mu\text{m}$  厚石蜡切片。分别取 4 个观察时间点各组的石蜡切片, 60  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 取出后室温冷却, 常规梯度脱蜡、水化, PBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次, 按照 SP 免疫组织化学试剂盒操作方法完成标本染色, 一抗稀释度为 1:200。抗原修复使用胰蛋白酶消化法(0.05 nkat/L)。在高倍光学显微镜下观察免疫组织化学染色结果。所有切片均在同一放大倍数、同一光强度下分析。每只眼球做 3 张切片, 于

双目高倍光学显微镜下, 使用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统(A 型, 厦门麦克奥迪实业集团有限公司)测量每张切片距视盘边缘 1.5 mm 处两侧各 1 个高倍视野内内层视网膜(内界膜到外核层和外网状层交界处)的免疫反应阳性细胞数。细胞核或细胞浆内出现棕黄色着色为阳性细胞。每只眼球的阳性细胞数分别来自于 3 张切片的 6 个数据。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学处理。实验测试指标的数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各时间点模型组和 EPO 组谷氨酸阳性表达细胞数的比较采用独立样本的  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 视网膜谷氨酸免疫组织化学染色观察

正常组视网膜未见谷氨酸阳性表达细胞(图 1A)。模型组视网膜谷氨酸染色阳性颗粒出现在视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)层, 内核层(inner nuclear layer, INL)未见阳性细胞; 随着观察时间的延长, 阳性染色细胞数量逐渐减少, 至第 14 天减至最少(图 1B, 1C)。EPO 组谷氨酸阳性染色出现在 RGCs 层; 随着观察时间的延长, 阳性染色细胞数量也逐渐减少, 至第 14 天减至最少(图 1D, 1E)。EPO 组各观察时间点谷氨酸阳性细胞数量均较模型组少。

### 2.2 视网膜谷氨酸免疫组织化学染色阳性细胞计数

正常对照组视网膜未见谷氨酸阳性表达细胞, 其余 2 组不同时间点视网膜谷氨酸阳性表达细胞数见表 1。第 1、3、7、14 天, EPO 组视网膜谷氨酸表达阳性细胞数均少于同时间点模型组, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 1 模型组与 EPO 组兔视网膜谷氨酸阳性表达细胞数比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ , 个/高倍视野)

Group	Glutamate positive cells in different time points			
	1 d	3 d	7 d	14 d
Model	7.5 $\pm$ 1.3	5.6 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 1.2	3.3 $\pm$ 1.1
EPO	3.2 $\pm$ 1.0	2.8 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 1.0	0.3 $\pm$ 0.2
$t$	5.56	5.25	5.43	6.27
$P$	0.00	0.00	0.00	0.00

(Student's  $t$  test)

## 3 讨论

视网膜缺血-再灌注损伤中 RGCs 的死亡机制有兴奋性氨基酸毒性学说和神经营养因子缺乏所致的细



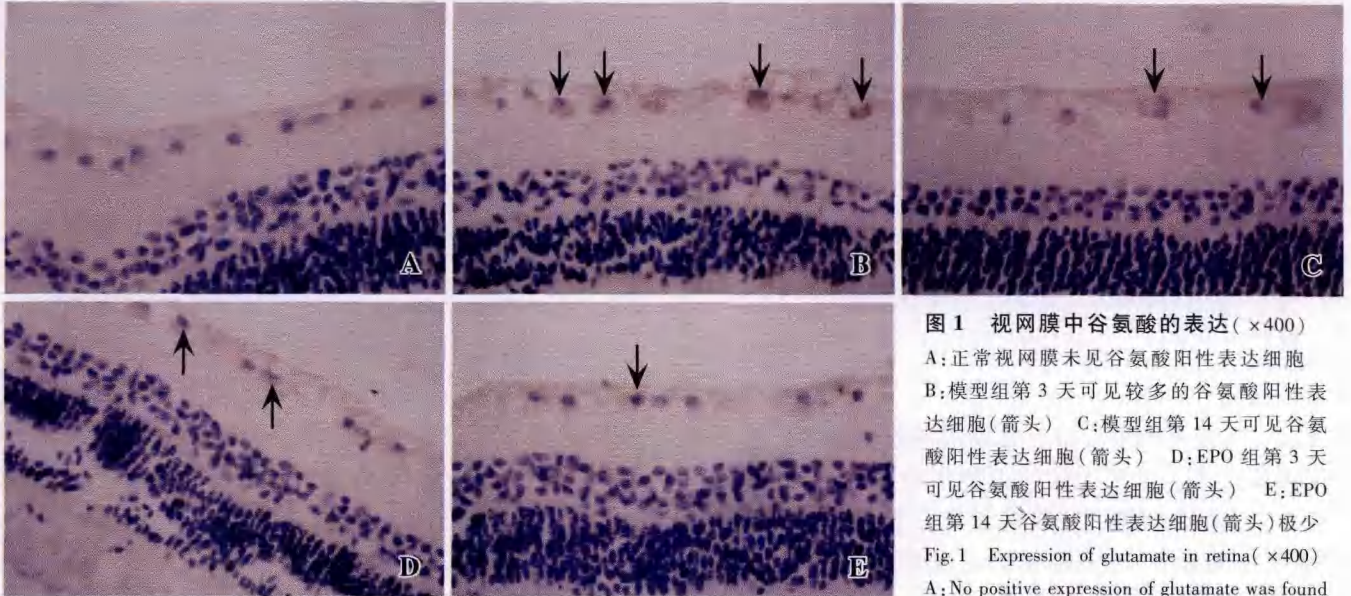


图 1 视网膜中谷氨酸的表达 (×400)  
 A: 正常视网膜未见谷氨酸阳性表达细胞  
 B: 模型组第 3 天可见较多的谷氨酸阳性表达细胞(箭头) C: 模型组第 14 天可见谷氨酸阳性表达细胞(箭头) D: EPO 组第 3 天可见谷氨酸阳性表达细胞(箭头) E: EPO 组第 14 天谷氨酸阳性表达细胞(箭头)极少  
 Fig.1 Expression of glutamate in retina(×400)

A: No positive expression of glutamate was found in retina of normal rabbit B: A lots of positive cells of glutamate were seen in retinal ganglion cell layer of model group on day 3( arrows) C: Positive cells of glutamate were exhibited in retinal ganglion cell layer of rabbit in model group on day 14( arrows) D: Positive cells of glutamate were displayed in retinal ganglion cell layer of rabbit in EPO group on day 3( arrows) E: A fewer positive cell of glutamate was seen in retinal ganglion cell layer of rabbit in EPO group on day 14( arrow)

胞凋亡学说。兴奋性氨基酸毒性学说认为,缺血缺氧状态下大量释放兴奋性氨基酸,如谷氨酸,高浓度的谷氨酸与 NMDA 受体结合导致  $Ca^{2+}$  大量内流,从而引起细胞的坏死。用谷氨酸拮抗剂 r-D-glutamylglycine、NMDA 受体拮抗剂 dextromethorphan 等可保护视网膜缺血缺氧性病变<sup>[4]</sup>。正常情况下谷氨酸在中枢神经系统是一种重要的兴奋性递质,可作为一种代谢产物存在于中枢神经系统,但缺血状态下过多谷氨酸的积聚则导致神经元的死亡<sup>[5]</sup>。王慧等<sup>[6]</sup>研究表明,急性高眼压后视网膜谷氨酸阳性细胞数量增加,主要表现在 INL 的双极细胞,其突起延伸至 RGCs 层,由此推测 RGCs 的死亡可能与双极细胞内过多的谷氨酸作用于 RGCs 有关。EPO 作为一种新型神经营养因子和神经保护因子,在神经系统缺氧缺血性损伤中发挥抗细胞凋亡、抗兴奋性氨基酸神经毒性、抗自由基、抗氧化作用和神经营养作用。

EPO 保护视网膜神经功能的机制尚不十分清楚,目前的研究结果提示,其可能通过多种途径实现神经保护功能。激活 EPO 受体是 EPO 神经保护的机制之一。Junk 等<sup>[7]</sup>的研究表明,急性高眼压所致的缺血视网膜上有广泛的 EPO 受体的表达,中和 EPO 受体则加剧视网膜缺血性损伤。抗 EPO 受体的抗体可抑制 EPO 对神经生长的促进作用<sup>[8]</sup>。组织在缺血缺氧条件下可引起缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )表达上调<sup>[9]</sup>,EPO 也可能通过改善组织缺氧

而下调 HIF-1 $\alpha$  的表达。既往研究结果显示,急性高眼压引起兔视网膜 HIF-1 $\alpha$  表达增加;皮下注射 rhEPO 后,视网膜 HIF-1 $\alpha$  表达减少,提示视网膜缺血缺氧可能得到改善<sup>[10]</sup>。也有研究显示 rhEPO 抗光损伤诱导 RPE 细胞凋亡的作用机制之一可能是抑制 caspase-3 的表达, Jak2 的 PIK3/PKB 途径可能是 EPO 抑制 caspase-3 的作用途径之一<sup>[11]</sup>。

EPO 是否可通过调节缺血-再灌注损伤而影响视网膜氨基酸的释放尚不清楚。研究发现早期糖尿病大鼠视网膜出现大量空泡变性,RGCs 线粒体肿胀,视网膜内谷氨酸水平升高;应用 rhEPO 后 RGCs 超微结构的损害减轻,视网膜谷氨酸水平显著下降<sup>[12]</sup>。该研究表明 rhEPO 可通过减少视网膜谷氨酸的释放保护糖尿病大鼠视网膜神经功能。有研究采用原代新生大鼠 RGCs 体外混合培养后用谷氨酸刺激,MTT 比色法检测细胞存活,评价 EPO 对细胞存活的影响,结果显示 EPO 能部分抵抗谷氨酸对混合培养 RGCs 的兴奋毒性<sup>[13]</sup>。本研究显示,EPO 能够下调急性高眼压所致兔视网膜谷氨酸的高表达,表明急性高眼压所致缺血缺氧引起了视网膜谷氨酸的表达和释放;而皮下注射 rhEPO 可以下调细胞内谷氨酸的表达和释放,推测这可能也是 EPO 保护缺血-再灌注损伤视网膜功能的机制之一。

参考文献

1 牛建军,王一,曾玉晓,等. 重组人促红细胞生成素对视神经不完全



损伤后视网膜神经元的保护作用[J]. 眼科新进展, 2007, 27: 501 - 504

2 王建明, 胡海涛, 卢涯, 等. 重组人促红细胞生成素对急性高血压兔视网膜电图的影响[J]. 眼科学报, 2005, 21: 161 - 164

3 王建明, 宋艳萍, 孙乃学, 等. 重组人促红细胞生成素对急性高血压兔视神经和视网膜超微结构的保护作用[J]. 国际眼科杂志, 2008, 8: 2221 - 2223

4 Schumer RA, Podos SM. The nerve of glaucoma[J]. Arch Ophthalmol, 1994, 112: 37 - 44

5 Tamai M. Dual nature of excitatory amino acids in the vertebrate retina [J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1994, 98: 411 - 418

6 王慧, 刘求理, 罗学港, 等. 脑源性神经营养因子对高血压后视网膜节细胞的保护作用[J]. 解剖学研究, 2002, 24: 119 - 122

7 Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 10659 - 10664

8 Böcker-Meffert S, Rosenstiel P, Röhl C, et al. Related erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 2021 - 2026

9 吕国蔚, 崔秀玉, 赵兰峰, 等. 低氧预适应的脑机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2004, 20: 98 - 103

10 王建明, 宋艳萍, 孙乃学, 等. 重组人促红细胞生成素对急性高血压兔视网膜缺氧诱导因子 1 $\alpha$  表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29: 271 - 273

11 孟岩, 牛膺筠, 曲虹, 等. rhEPO 对光损伤诱导的 RPE 细胞 Caspase-3 表达的作用[J]. 眼科研究, 2007, 25: 404 - 407

12 朱弼珺, 王卫峻, 许迅. 促红细胞生成素对早期糖尿病大鼠视网膜谷氨酸含量和超微结构的影响[J]. 眼科, 2008, 17: 246 - 249

13 姚慧萍, 钟一声, 程瑜, 等. 促红细胞生成素对谷氨酸作用的视网膜神经细胞的保护作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2007, 27: 1428 - 1431

(收稿: 2009-03-18 修回: 2009-10-12)

(本文编辑: 尹卫靖)

· 临床经验 ·

## 高度近视眼角膜生物学特性与年龄的相关性研究

李红霞 樊 凡 薛安全 许爱琴 方海珍 郑景伟 吕 帆

高度近视在亚洲人群中呈相对较高的患病率, 高度近视眼后节的病理改变已被确认<sup>[1-3]</sup>。对于高度近视眼前节如角膜是否有变化尚存在争议, 已有研究证实高度近视角膜厚度基本稳定, 但角膜微观结构有所改变<sup>[4]</sup>。本研究探讨在高度近视人群中随着时间的推移或年龄的增长, 高度近视角膜生物学特性的改变以及不同年龄人群之间的差异, 报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 高度近视组 111 例(213 眼); 等效球镜(SE) -6 ~ -28.00 D, 平均(-13.33 ± 5.58) D; 年龄 6 ~ 83 岁, 平均(33.97 ± 19.14) 岁。按年龄分为 4 组: A 组 6 ~ 20 岁, 36 例(72 眼); B 组 21 ~ 40 岁, 34 例(64 眼); C 组 41 ~ 60 岁, 29 例(54 眼); D 组 61 ~ 83 岁, 12 例(23 眼)。对照组 111 例(222 眼): 双眼 SE 为 -3.00 ~ +3.00 D, 平均(-0.48 ± 1.02) D, 最佳矫正视力 ≥ 5.0; 年龄 8 ~ 77 岁, 平均(32.16 ± 17.64) 岁; 按年龄分为 4 组: A 组 8 ~ 20 岁, 38 例(76 眼); B 组 21 ~ 40 岁, 35 例(70 眼); C 组 41 ~ 60 岁, 27 例(54 眼); D 组 61 ~ 77 岁, 11 例(22 眼)。排除可能影响角膜及眼压的疾病, 即手术史、外伤史、角膜接触镜配戴史及糖尿病等其他系统性疾病病史者。

**1.2 方法** 采用自动电脑验光仪(KR-8100)和综合验光仪(OU-400)(日本 Topcon 公司)进行规范视力检测和验光, 获得测试对象的双眼屈光度和矫正视力。采用眼反应分析仪(ocular response analyzer, ORA)(美国 Reichert Ophthalmic Instruments 公司)测量角膜滞后性(corneal hysteresis, CH)。ORA 是在传统

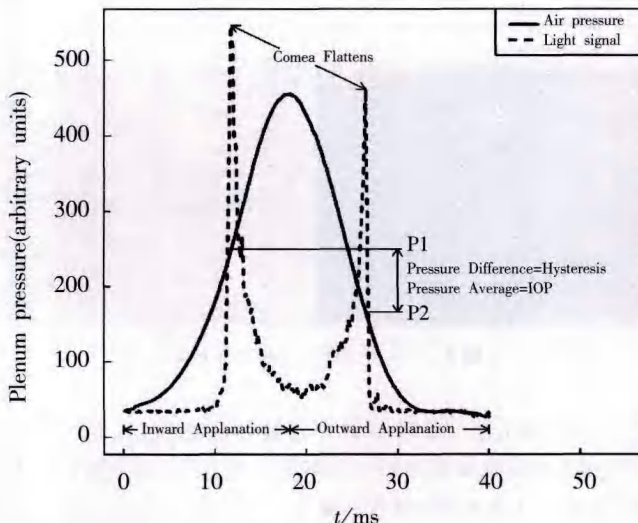


图1 P1 为角膜第 1 次被压平瞬间气体压力, P2 为角膜从内陷状态重新恢复过程中, 角膜再次变平时的气体压力值, 二者之差称为 CH

非接触眼压计(non-contact tonometer, NCT)的基础上附加可测量 CH 装置。同时得到另外 3 个参数: Goldman 相关眼压(IOP<sub>G</sub>)、角膜补偿眼压(IOP<sub>CC</sub>)、膜阻力因子(CRF)。CH 是 NCT 一次喷气、光电传感器先后 2 次达到峰值时所得 IOP 的差值(图 1)。吹在角膜表面的空气压力是按照一精确测定的曲线变化的。理论上, 在 NCT 喷气压力下角膜由凸变凹过程中, 角膜变平时光电传感器第 1 次达到峰值时所得的 IOP 值应该与 NCT 喷气压力降低时角膜由凹变凸过程中再次变平时光电传感器第 2 次达到峰值时读得的值相同。但是由于角膜具有黏弹性, 2 次读得的 IOP 值不同。CH 被描述为由于角膜对

本课题为国家“十一五”科技支撑计划项目资助(2007BAI18B09)

作者单位: 325000 温州医学院眼视光学院(李红霞, 研究生, 现在洛阳市第一人民医院眼科 471000)

通讯作者: 吕帆 (Email: lufan@mail.eye.ac.cn)