

碱性成纤维细胞生长因子对视网膜缺血再灌注损伤中凋亡相关基因表达的影响

牛膺筠 高云霞 袁春燕 丁玉芝 杨文毅

【摘要】 目的 探讨碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对视网膜缺血再灌注损伤(RIRI)中凋亡相关基因表达的影响。方法 将 28 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、缺血组和治疗组,其中后两组又按照不同再灌注时间分为再灌注后 1、6、12、24、48、72 h 6 个时间段。建立 RIRI 动物模型,以 bFGF(治疗组)或平衡盐溶液(缺血组)玻璃体腔注射,通过免疫组织化学链酶卵白素-生物素复合体法检测不同时段视网膜组织中野生型(WT)p53、c-fos、c-jun 基因的表达变化。结果 缺血组视网膜再灌注后 6 h 可发现有 WTp53、c-fos 和 c-jun 蛋白的表达,24 h 达到高峰,48 h 仍持续强表达,72 h 表达已明显下降。bFGF 治疗组各观察指标变化规律基本与缺血组相似,但表达量相对明显减弱。二组比较,在再灌注 6~48 h 各时段差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 RIRI 能引起 WTp53、c-fos、c-jun 基因在视网膜神经节细胞层与内核层表达的增高;WTp53、c-fos、c-jun 基因可能通过在与 RIRI 的细胞凋亡中起作用而参与了 RIRI 的发生机制;bFGF 可以抑制 RIRI 时 WTp53、c-fos、c-jun 基因在视网膜表达的增高,从而对 RIRI 起治疗作用。

【关键词】 成纤维细胞生长因子,碱性; 再灌注损伤; 视网膜; 基因表达

中图分类号:R774.13 R446

Effect of basic fibroblast growth factor on expression of apoptosis-related genes in retinal ischemia-reperfusion injury NIU Ying-jun, GAO Yun-xia, YUAN Chun-yan, et al. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China

Corresponding author: NIU Ying-jun, Email: niuyingjun@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on expression of apoptosis-related genes in retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI). **Methods** Twenty-eight rats were divided into normal, ischemia and treatment group randomly; and the latter two groups were subdivided into 6 subgroups according to different time points: 1 hour, 6, 12, 24, 48, and 72 hours after reperfusion. The rats' model of experimental RIRI was established. After intravitreally injected with bFGF (treatment group) or balanced saline solution (ischemia group), the expressions of wide type p53 (WTp53), c-fos, and c-jun in each subgroups were detected by strept-avidin-biotin complex of immunohistochemistry. **Result** In ischemia group, the expression of WTp53, c-fos and c-jun was found 6 hours after reperfusion, reached the peak at the 24th hour after reperfusion, kept expressing strongly at the 48th hour, and decreased obviously at the 72nd hour. In treatment group, the rule of changes of expression of WTp53, c-fos and c-jun was similar to which in ischemia group, except that the expression amount was obvious decreased. There was statistical significance of the expression of WTp53, c-fos and c-jun between the ischemia and treatment group 6-48 hours after reperfusion ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of WTp53, c-fos, and c-jun in retinal ganglion cell layer and inner nuclear layer may increase led by RIRI; WTp53, c-fos, and c-jun may be involved in the generant mechanisms of RIRI by playing parts in apoptosis; bFGF can inhibit the increase of expression of WTp53, c-fos, and c-jun in RIRI. Thus, which may has therapeutic effect on RIRI.

【Key words】 Fibroblast growth factor, basic; Reperfusion injury; Retina; Gene expression

视网膜缺血再灌注损伤(RIRI)是眼科常见的病理过程,其结果主要导致视网膜神经节细胞及内核层细胞凋亡^[1]。而细胞凋亡过程受到许多基因调控,野

生型(WT)p53、c-fos、c-jun 基因均为其中重要的凋亡调控基因。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是一种多功能生物活性物质,可抑制凋亡、促进神经元的修复与再生^[2]。我们通过研究 RIRI 玻璃体腔注射 bFGF 后 WTp53、c-fos、c-jun 基因表达的变化,探讨 bFGF 在 RIRI 中发挥作用的途径,为 bFGF 对 RIRI 的治疗提供理论依据。

基金项目:山东省教育委员会基金资助项目(JOOK53)

作者单位:266003 青岛,青岛大学医学院附属医院眼科(牛膺筠、袁春燕、丁玉芝、杨文毅);临沂市人民医院(高云霞)

通讯作者:牛膺筠,Email: niuyingjun@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

健康无眼疾的 Wistar 大鼠 28 只(青岛市实验动物与动物实验中心提供),体重 250~300 g,雌雄不分,室温环境饲养。随机分为 3 组:正常组(4 只)、缺血组(其余 24 只鼠左眼, RIRI 后玻璃体腔中注入生理盐水)和 bFGF 治疗组(同缺血组 24 只鼠右眼, RIRI 后玻璃体腔中注入 bFGF);其中缺血组和 bFGF 治疗组又按照不同的再灌注时间分为再灌注后 1、6、12、24、48、72 h 6 个时间段(每个时间段 4 只大鼠)。

重组 bFGF(暨南大学生物工程研究所),兔抗大鼠 WTP53、c-fos、c-jun 多抗(美国 Santa Cruz 生物技术公司),链霉亲和素-生物素复合物(SABC)免疫组织化学试剂盒(武汉 Boster 生物工程公司)。

1.2 实验方法

采用前房穿刺加压法建立大鼠 RIRI 模型^[1],分别于再灌注后 1、6、12、24、48、72 h 处死动物,摘除眼球,制作石蜡切片^[2]。石蜡切片脱蜡,复水至水, H₂O₂ 室温 10 min, 复合消化液室温 10 min, 正常山羊血清室温 10 min, 加一抗(兔抗大鼠 WTP53、c-fos、c-jun 多抗) 37℃ 2 h, 加二抗(生物素化山羊抗兔 IgG) 37℃ 20 min, SABC 法染色, 二氨基联苯胺(DAB)显色。苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片。

WTP53、c-fos、c-jun 阳性表达为棕黄色, 每只眼球取两张切片进行分析, 应用图象分析系统对免疫组织化学切片进行图像分析(每张切片以视神经为基准分别向两侧各取 2 个视野), 得到视野中棕黄色阳性染色的平均吸光度[A, 旧称光密度(OD)]值, 对视网膜组织中 WTP53、c-fos、c-jun 表达进行相对定量。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 SPSS10.0 软件进行两样本均数差别的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 WTP53 与 c-fos、c-jun 蛋白的表达

正常大鼠视网膜中几乎无 WTP53、c-fos 及 c-jun 蛋白表达。缺血组中三者均于 RIRI 后 6 h 神经节细胞层有少量表达, 表达主要在视网膜神经节细胞层, 位于细胞核内, 随时间延长表达量逐渐增加; 24 h 到高峰, 此时除在神经节细胞层有强表达外, 内核层也有散在表达(图 1); 48 h 仍持续强表达; 72 h 时已明显下降, 但仍较正常组高。治疗组同缺血组在不同时段比较, 三者表达均减弱(图 2)。各时段缺血组与治疗组的 WTP53、c-fos 及 c-jun 蛋白阳性表达结果相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1~3)。

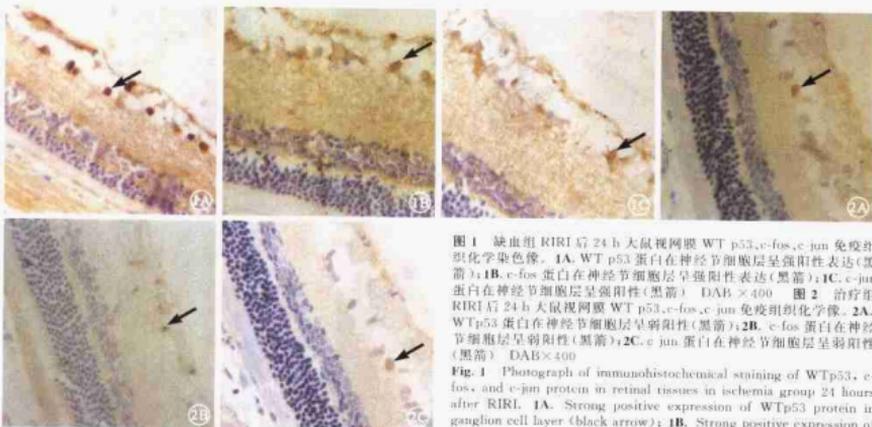


图1 缺血组 RIRI 后 24 h 大鼠视网膜 WTP53、c-fos、c-jun 免疫组织化学染色像。1A. WT p53 蛋白在神经节细胞层呈强阳性表达(黑箭); 1B. c-fos 蛋白在神经节细胞层呈强阳性表达(黑箭); 1C. c-jun 蛋白在神经节细胞层呈强阳性表达(黑箭) DAB $\times 400$ 图2 治疗组 RIRI 后 24 h 大鼠视网膜 WTP53、c-fos、c-jun 免疫组织化学像。2A. WTP53 蛋白在神经节细胞层呈弱阳性(黑箭); 2B. c-fos 蛋白在神经节细胞层呈弱阳性(黑箭); 2C. c-jun 蛋白在神经节细胞层呈弱阳性(黑箭) DAB $\times 400$

Fig. 1 Photograph of immunohistochemical staining of WTP53, c-fos, and c-jun protein in retinal tissues in ischemia group 24 hours after RIRI. 1A. Strong positive expression of WTP53 protein in ganglion cell layer (black arrow); 1B. Strong positive expression of c-fos protein in ganglion cell layer (black arrow); 1C. Strong positive expression of c-jun protein in ganglion cell layer (black arrow). DAB $\times 400$

positive expression of c-jun protein in ganglion cell layer (black arrow) of WTP53, c-fos, and c-jun protein in retinal tissues in bFGF group 24 hours after RIRI. 2A. Weak positive expression of WTP53 protein in ganglion cell layer (black arrow); 2B. Weak positive expression of c-fos protein in ganglion cell layer (black arrow); 2C. Weak positive expression of c-jun protein in ganglion cell layer (black arrow). DAB $\times 400$

表 1 RIRI 后不同时段 WTP53 蛋白的表达变化(平均 A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	眼数(只)	RIRI 后时段(h)					
		1	6	12	24	48	72
缺血组	24	0.005±0.001	2.175±0.568	6.637±0.996	9.590±0.677	9.113±1.095	4.068±0.628
治疗组	24	0.004±0.001	1.442±0.203	3.996±0.853	5.092±0.312	6.426±0.720	2.756±0.697
t 值		1.886	3.954	5.630	8.835	5.596	2.917
P 值		0.156	0.029	0.011	0.003	0.011	0.062

表 2 RIRI 后不同时段 c-fos 蛋白的表达变化(平均 A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	眼数(只)	RIRI 后时段(h)					
		1	6	12	24	48	72
缺血组	24	0.024±0.005	2.909±0.802	8.152±1.168	11.361±1.525	9.309±1.334	4.535±0.658
治疗组	24	0.022±0.005	1.656±0.476	4.637±0.584	7.380±1.169	6.626±1.227	3.565±0.899
t 值		1.419	6.803	11.035	13.944	5.821	3.130
P 值		0.251	0.006	0.002	0.001	0.010	0.052

表 3 RIRI 后不同时段 c-jun 蛋白的表达变化(平均 A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	眼数(只)	RIRI 时段(h)					
		1	6	12	24	48	72
缺血组	24	0.054±0.006	3.618±1.001	8.685±1.495	12.896±2.302	10.056±1.196	5.117±0.669
治疗组	24	0.046±0.011	2.049±0.663	5.066±0.823	8.146±1.175	7.464±2.08	3.669±1.247
t 值		2.770	8.855	10.297	7.076	4.722	2.702
P 值		0.070	0.003	0.002	0.006	0.018	0.074

3 讨论

眼科临床上许多疾病均可导致 RIRI, 国外学者发现凋亡可能是在 RIRI 中神经元死亡的主要类型^[4,5]。牛膺筠等^[3]通过对大鼠 RIRI 模型中视网膜超微结构观察发现, RIRI 后 24 h 视网膜神经节细胞数量明显减少, 可见凋亡小体。以上研究均证实了细胞凋亡是 RIRI 的重要发生机制之一。

p53 基因是一种重要的抑癌基因。近年来人们发现, p53 基因与细胞凋亡有密切关系, WTP53 参与细胞凋亡调节, 诱导细胞凋亡发生。体外实验和动物实验证实, 神经细胞发生凋亡时, 伴随着 WTP53 基因高水平的表达^[6,7]。应用 WTP53 基因的抑制物可防止细胞凋亡^[8], 提示 WTP53 基因在神经细胞凋亡过程中起重要作用。我们应用免疫组织化学法检测到 RIRI 后 WTP53 蛋白表达增加, 主要位于神经节细胞层与内核层。表达规律为: 再灌注后 6 h WTP53 蛋白开始表达, 24 h 达高峰, 72 h 明显减少。提示 WTP53 的过表达可能导致了视网膜神经节细胞的凋亡。

研究表明, c-fos 和 c-jun 与细胞凋亡有密切关系^[10]。这些原癌基因编码的蛋白, 在细胞核内起转录因子作用, 它们在凋亡过程中被激活^[10]。c-fos 和 c-jun 蛋白组成异源二聚体 fos-jun, 称为激活蛋白(AP)-1。AP-1 是一个重要的转录因子, 结合于 DNA 上, 可诱导细胞凋亡或细胞增生。Cotman, Anderson 等^[11]用 β-

淀粉样蛋白诱导神经细胞凋亡, 发现凋亡细胞中 c-fos 和 c-jun 基因表达均增加。国汉邦等^[9]将 WTP53 基因导入神经细胞后, 导致细胞发生凋亡, 同时 c-fos 和 c-jun 的表达增加, 提示 WTP53 基因诱导的细胞凋亡可能与 c-fos 和 c-jun 表达升高有关。同时在我们的实验过程中发现 c-jun、c-fos 基因的表达规律与 TUNEL 法检测凋亡细胞的表达规律^[12]相符合, 证实 c-jun、c-fos 基因与视网膜神经节细胞凋亡密切相关。以往研究结果认为 c-jun、c-fos 基因为双向调控基因, 既能诱导细胞增生, 也能诱导细胞凋亡^[13]。细胞是向凋亡方向发展还是向生长、分化的方向发展, 取决于细胞接受何种信号以及细胞所处的生长环境。我们的实验结果提示 c-jun、c-fos 基因在缺血再灌注损伤的条件下, 调控细胞向凋亡的方向发展。

本研究结果显示, 治疗组 6~48 h 各时间段较缺血组 WTP53、c-jun 及 c-fos 蛋白表达明显减少, 说明玻璃体腔内注射 bFGF 可明显减少缺血再灌注视网膜组织中 WTP53、c-jun、c-fos 蛋白的表达。由此推论, 抑制细胞凋亡调控基因 WTP53、c-fos 和 c-jun 表达, 从而抑制神经细胞的凋亡, 可能是 bFGF 治疗 RIRI 的作用机制之一。

4 参考文献

- Muller A, Pietri S, Villain M, et al. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp Eye Res*, 1997, 64: 637-643.

- 2 Cuevas P, Carceller F, Ortega SN, et al. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science*, 1991, 254: 1208-1210.
- 3 牛膺筠, 张瑞, 周占宇, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对鼠视网膜缺血再灌注损伤的治疗作用. *中华眼科杂志*, 2002, 38: 530-533.
- 4 Buchi ER. Cell death in rat retina after a pressure-induced ischemia-reperfusion insult; an electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res*, 1992, 55: 605-613.
- 5 Kuroiwa S, Katai N, Yoshimura N. A Possible Role for P16INK4 in Neuronal Cell Death after Retinal Ischemia-reperfusion Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39: 610-617.
- 6 Wood K, Youle R. The role of free radicals and P53 in neuron apoptosis in vivo. *Neurosci*, 1995, 15: 5851-5857.
- 7 La Feria F, Hall C, Ngol., et al. Extracellular deposition of β -amyloid upon P53-dependent neuronal cell death in transgenic mice. *Clin Invest*, 1996, 98: 1626-1632.
- 8 蒋雷, 夏永静, 黎健. 野生型 p53 基因导入对培养的兔血管平滑肌细胞生长的抑制作用. *中华心血管病杂志*, 1997, 25: 301-304.
- 9 国汉邦, 黎健, 董军, 等. 野生型 p53 基因导入诱导神经细胞凋亡. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2002, 9: 92-95.
- 10 Smeyne R, Vendrell M, Hayward M, et al. Continuous-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*, 1993, 363: 166-169.
- 11 Cotman C, Anderson A. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 1995, 10: 19-45.
- 12 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. *中华眼底病杂志*, 2003, 3: 160-163.
- 13 彭黎明. 细胞凋亡的基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 38-45.

(收稿日期: 2004-02-05)

(本文编辑: 朱敏)

读者 · 作者 · 编者

中华医学会杂志社对一稿两投和一稿两用问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益, 现将中华医学会系列杂志对一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下: (1) 本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处, 但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿, 应向有关期刊编辑部作出说明。(2) 如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表, 除非文种不同, 否则不可再将该文投寄给他刊。(3) 请作者所在单位在来稿介绍信中注明该文稿有无一稿两投问题。(4) 凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿, 则表明稿件仍在处理中, 作者欲投他刊, 应事先与该刊编辑部联系并申述理由。(5) 编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时, 应认真收集有关资料并仔细核实后再通知作者, 同时立即进行退稿处理, 在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时, 应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。(6) 一稿两用一经证实, 本刊将择期在杂志中刊出其作者单位和姓名及撤销该论文的通告; 对该作者为第一作者所撰写的一切文稿, 2 年内将拒绝在中华医学会系列杂志发表; 就此事件向作者所在单位和该领域的其他科技期刊进行通报。

中华医学会杂志社

本刊对文稿中参考文献书写格式的要求

按 GB7714-87《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。尽量避免引用摘要作为参考文献。确需引用个人通讯时, 可将通讯者姓名和通讯时间写在括号内插入正文相应处。参考文献中的作者, 1~3 名全部列出, 3 名以上只列出前 3 名, 后加“等”或其他与之相应的文字。外文期刊名称用缩写, 以《Index Medicus》中的格式为准; 中文期刊用全名。每条参考文献均须著录起止页。参考文献必须由作者与其原文核对无误。将参考文献按引用先后顺序(用阿拉伯数字标出)排列于文末。举例:

专著:作者. 书名. 版本. 出版地: 出版者, 出版年. 起止页.

1 李凤鸣, 罗成仁. 眼的先天异常. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 107-120.

2 Shieds JA, Shieds CL. Intraocular tumors, a text and atlas. Philadelphia: WB Saunders, 1992. 117-136.

专著中析出文献:析出作者. 析出题名. 见: 原文献作者. 原文献题名. 卷(册). 版本. 出版地: 出版者, 出版年. 起止页.

1 廖菊生. 黄色斑点状眼底合并黄斑变性. 见: 李凤鸣, 主编. 眼科全书. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 2260-2261.

2 Guyer DR, Yannuzzi LA, Slakter JS, et al. Diagnostic indocyanine green videoangiography. In: Ryan SJ, ed. *Retina*. Vol 2. 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1994. 985-996.

期刊:作者. 题(著)名. 刊名, 出版年, 卷号: 起止页.

1 严密, 陆方, 张建军, 等. 光动力疗法治疗渗出型老年性黄斑变性的初步报告. *中华眼底病杂志*, 2001, 16: 213-216.

2 Tso MOM. Pathogenetic factor of aging macular degeneration. *Ophthalmology*, 1988, 92: 628-635.

本刊编辑部