

急性心肌缺血诱发应激反应对大鼠视网膜细胞凋亡的影响

谢莉莎 杨继红 郭政

Impact of acute myocardial ischemic stress on apoptosis of retinal cells in rats

Xie Lisha, Yang Jihong, Guo Zheng. Shanxi Eye Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030002, China

Abstract Objective During the period of acute stress, sympathetic nerve is activated and massive catecholamine is released from sympathetic nerve endings. These may make organism injury. The aim of the study was to investigate the apoptosis of retina cells during acute stress induced by myocardial ischemia in rats. **Methods** Twenty-four health adult male Sprague-Dawley rats (48 eyes) were randomly divided into two groups. The left anterior descending branch of the coronary artery was ligated to induce acute myocardial ischemia in coronary artery occlusion (CAO) group and a thread was passed around the anterior descending branch of the coronary artery without ligation in control group. The sample of retina was collected at 3 hours and 6 hours of CAO for caspase-3 activity detection and TUNEL staining. **Results** Retinal edema was seen under the light microscope in CAO group. A few apoptosis cells were found in control group. The apoptotic cells rate was $16.8\% \pm 6\%$ and $26.9\% \pm 6.1\%$ respectively in CAO 3 hours group and 6 hours group, showing a significant difference in comparison with control group ($P = 0.004$), and the apoptotic retinal cells mainly located in inner nuclear layer, retinal ganglion cell layer and other retinal layer. Caspase-3 activity was significantly increased in the retina of the CAO group compared with control group in 3 hours and 6 hours ($P = 0.001$). **Conclusion** Acute stress can provoke the apoptosis of rat retinal cells.

Key words stress reaction; myocardial ischemia; retina; apoptosis

摘要 目的 采用细胞凋亡率和半胱氨酸天冬蛋白酶 3 (caspase-3) 活性为观察指标, 观察急性心肌缺血诱发机体急性应激反应对大鼠视网膜细胞凋亡的影响。 **方法** 将健康成年雄性 SD 大鼠 24 只分为两组。对照组: 穿线不结扎冠状动脉; 冠状动脉结扎组: 结扎冠状动脉左前降支。每组根据观察时点又分为 3 h、6 h 两个亚组。在预定时间分别取大鼠一眼做石蜡切片后进行 TUNEL 染色; 取另一眼视网膜, 进行 caspase-3 活性检测。TUNEL 染色以凋亡指数 (染色阳性细胞所占计数细胞总数的百分比) 表示, Caspase-3 采用活性表示。 **结果** 与对照组比较, 结扎冠状动脉 3 h、6 h 视网膜细胞凋亡指数均明显升高 ($P = 0.004, P < 0.05$), 且阳性细胞主要出现于视网膜的神经节细胞层和内核层; Caspase-3 活性均明显升高 ($P = 0.001, P < 0.05$)。 **结论** 急性心肌缺血诱发的急性应激反应可引发大鼠视网膜细胞凋亡增加, 凋亡主要出现在视网膜神经节细胞层和内核层。

关键词 应激反应; 心肌缺血; 视网膜; 凋亡

分类号 R 774.06 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0095-05

急性心肌缺血可引起机体交感神经系统兴奋, 促进交感神经末梢释放儿茶酚胺, 诱发神经-内分泌-免疫反应, 诱发机体应激反应。过度增高的儿茶酚胺可能导致机体细胞损伤^[1-3]。本研究采用急性心肌缺

血作为一种应激性刺激, 观察其是否可能引起视网膜细胞发生凋亡。

1 材料与方法

1.1 急性心肌缺血动物模型的制作

采用健康成年雄性大鼠 24 只 (山西医科大学实验动物中心提供), 体重 250 ~ 300 g。用 25% 乌拉坦 (1.2 g/kg) 麻醉动物, 所有手术切口均采用 1% 的盐酸利多卡因局部浸润麻醉, 总量不超过 1 mL。于颈部行

本课题为国家自然科学基金项目 (30772083)、山西省科技攻关项目 (2007031096-2) 资助

作者单位: 030002 太原, 山西医科大学 [谢莉莎 (研究生)、郭政]; 030002 山西省眼科医院 (杨继红)

通讯作者: 杨继红 (Email: Yjh187@yahoo.com.cn)

气管切开插管及人工机械通气 (RR 75 次/min, V_T 8 mL/kg), 于胸骨左缘第 4~5 肋间旁开胸骨正中线 1 cm 处沿肋间开胸, 逐层钝性分离, 直至暴露心脏, 切开心包膜。用 6/0 无损伤线结扎冠脉左前降支, 并计时。逐层关闭胸腔, 在完全关闭胸腔前抽尽胸腔积气。关闭胸腔后, 逐步调整人工通气, 使动物恢复自主呼吸。对照组动物开胸暴露心脏后行冠状动脉左前降支下穿线后关闭胸腔。

1.2 动物分组

将动物平均分为两组。(1)对照组: 动物麻醉后打开胸腔, 冠状动脉左前降支下穿线不结扎; (2)冠状动脉阻塞 (coronary artery occlusion, CAO) 组: 结扎冠状动脉左前降支。两组根据采集样本观察时点各分为结扎冠状动脉左前降支或者冠状动脉左前降支下穿线 3 h 组及 6 h 组。

1.3 样本的采集和处理

分别于结扎冠状动脉左前降支 (或冠状动脉下穿线) 后 3 h 和 6 h 摘除双眼球。任取一眼球置入 4% 多聚甲醛中固定 18 h, 小心剥去晶状体后依次浸入浓度为 70%、80%、95% 和 100% 的乙醇中各 1 h, 正丁醇 I、II、III 共 24 h, 浸蜡 6 h 后石蜡包埋, 用 Leica 切片机制备 5 μ m 连续切片, 进行 TUNEL 染色。采用凋亡测定试剂盒, 以缺血凋亡心肌细胞为阳性对照。以磷酸缓冲液替代 TbT 酶制作阴性对照。取另一眼视网膜, 吸去血迹称重, 加入裂解液后于冰上剪碎组织, 用匀浆机制成匀浆后离心 (4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min, 10 min), 取上清液采用半胱氨酸天冬蛋白酶 3 (caspase-3) 测定试剂盒 (Caspase-3 Apoptosis Detection kit, Biological, Massachusetts, USA), 测定 caspase-3 活性。

1.4 统计学方法

所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计学软件分别对视网膜细胞凋亡率及 caspase-3 比活性行析因设计的方差分析, 组间的两两比较采用 LSD *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜下视网膜组织病理学改变

CAO 组动物, 视网膜内外核层水肿, 细胞排列较紊乱, 神经节细胞层 (GCL) 空泡变性^[1-3]。

2.2 TUNEL 染色检测

TUNEL 染色, 正常细胞核呈蓝色, 凋亡细胞核呈棕黄色。对照组大鼠视网膜偶见凋亡细胞 (图 1A、1B, 图 2)。CAO 3 h 组可见 GCL 及内核层 (INL) 部分凋亡细胞, 外核层、光感受器细胞层及色素上皮细胞层偶见凋亡, 凋亡细胞主要集中于视网膜内侧细胞层 (图 1C)。CAO 6 h 组, 可见 GCL 及 INL 凋亡细胞增多, 视网膜其余各层凋亡细胞比 CAO 3 h 组明显增加 (图 1D, 图 2)。CAO 后 3 h 及 6 h 细胞凋亡发生率分别为: GCL 分别为 23.5% \pm 7.5% 和 36.0% \pm 7.8%, 与对照组比较差异有统计学意义 ($n=6, P < 0.05$); INL 分别为 14.3% \pm 5.4% 和 18.4% \pm 5.0%, 与对照组

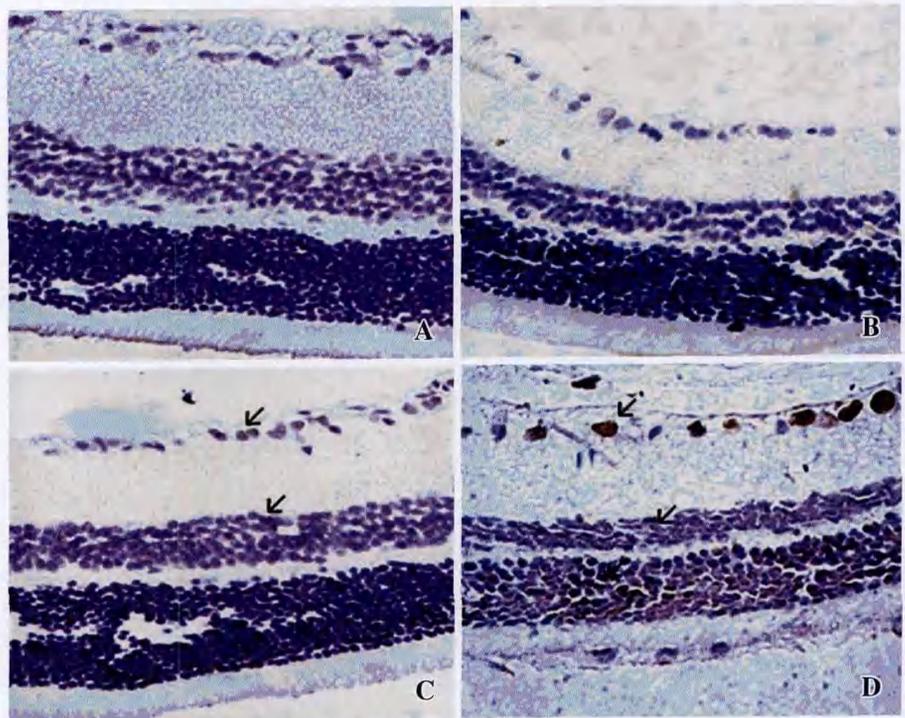


图 1 视网膜 TUNEL 染色 (×400) 蓝色为正常细胞核, 棕黄色为凋亡细胞核 A: 对照组 3 h TUNEL 染色 B: 对照组 6 h TUNEL 染色 C: CAO 组 3 h TUNEL 染色, 可见 GCL 及 INL TUNEL 阳性细胞 (箭头) D: CAO 组 6 h TUNEL 染色, 可见 GCL 及 INL 明显 TUNEL 阳性细胞 (箭头), 各层细胞凋亡均较 CAO 3 h 明显

Fig. 1 TUNEL staining of rat retina exhibit normal cellular nuclei (blue) and apoptotic cellular nuclei (brown) (× 400) A: TUNEL staining of retina in contol group at 3 hours showed that there was hardly apoptosis cell B: TUNEL staining of retina in contol group at 6 hours C: TUNEL staining of retina showed the positive cells of TUNEL in GCL and INL in CAO 3 hours group compared with normal group (arrow) D: TUNEL staining of retina showed increased positive cells for TUNEL in GCL and INL in CAO 6 hours group (arrow)

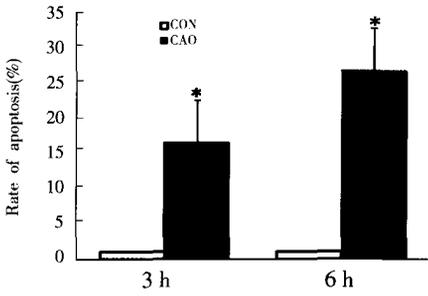


图2 冠状动脉结扎后视网膜细胞凋亡率的变化

Fig.2 Rate of apoptosis in two groups ($F = 78.79, P < 0.01$; $* P < 0.01$ vs control group) (One-way ANOVA, LSD t test)

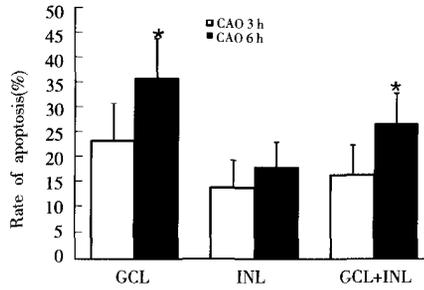


图3 冠状动脉结扎后视网膜不同细胞层凋亡率的变化

Fig.3 Rate of apoptosis in different retinal layers in two groups ($* P < 0.05$ vs respective CAO 3 h value) (Student's t test)

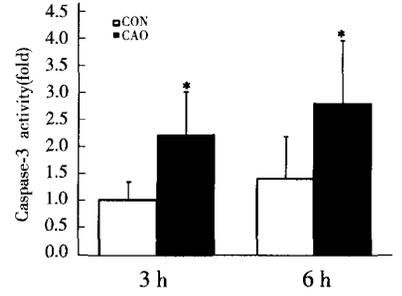


图4 冠状动脉结扎后视网膜细胞 caspase-3 活性的变化

Fig.4 Caspase-3 activity in two groups ($* P < 0.05$ vs respective control group) (Student's t test)

比较差异有统计学意义 ($n = 6, P < 0.05$), CAO 6 h 组与 CAO 3 h 组比较差异无统计学意义 ($n = 6, P > 0.05$; 总凋亡率分别为 $16.8\% \pm 6\%$ 和 $26.9\% \pm 6.1\%$, 以对照组比较差异有统计学意义 ($n = 6, P < 0.05$) (图 3)。

2.3 Caspase-3 活性

CAO 组大鼠视网膜 caspase-3 活性明显升高, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 4); CAO 后 6 h 组 caspase-3 活性高于 3 h 组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

急性心肌缺血, 作为一种急性伤害性刺激, 除了直接对心肌造成损伤诱发心绞痛外^[4], 还可能引起机体应激反应, 使全身交感-肾上腺素能活性增强。通过神经机制引起某些神经递质或炎症介质等化学活性物质合成、分泌上调, 导致和加重神经所支配组织发生反应^[5], 激活大脑-内分泌-免疫系统的“对话”^[6-9], 诱发机体的连锁免疫反应, 引起或加重机体的炎症反应, 进而引起全身病理生理发生变化^[10-12]。

本研究小组前期研究结果显示, 急性心肌缺血早期 (30 min 内) 可引起视网膜内去甲肾上腺素表达显著升高。使用吗啡和曲马多预处理可减轻视网膜损伤, 减少去甲肾上腺素在视网膜的表达^[1-3]。这一结果支持急性心肌缺血伤害性刺激信号通过交感神经传递至视网膜的推断。除却儿茶酚胺的直接作用^[13], 某些炎症介质, 如 P 物质在视网膜表达增加^[14], 可能参与视网膜应激反应。另外, 细胞因子 TNF α 和 IL-1 可通过作用于核因子 κ B (NF- κ B), 激活诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 基因表达的启动子, 使 iNOS 表达增强, 产生大量的一氧化氮^[15]。视网膜细胞凋亡的时程变化与 iNOS 的表达存在着一致的趋势, 均呈先增高后降低的趋势, 且细胞凋亡发生于视网膜 GCL 及 INL, 与

iNOS 的表达部位相同, 提示二者之间存在相关性^[16]。然而 NF- κ B 的激活在细胞凋亡中是起促进作用还是起抑制作用尚无定论, 可能与损伤的原因和细胞的种类有关^[17]。

本研究通过结扎大鼠冠状动脉左前降支诱发急性心肌缺血, 造成急性应激反应动物模型, 观察机体急性应激反应状态下是否可能诱发视网膜细胞损伤。研究结果显示, 急性心肌缺血 3 h 即发生视网膜细胞凋亡增加, 细胞凋亡主要见于 GCL 及 INL 细胞。机体应激反应可能诱发视网膜损伤。该发现可能对视网膜疾病发病机制的探讨有一定的参考。

细胞凋亡作为一种特殊的细胞死亡形式, 具有重要的生物学意义并且受到复杂分子生物学机制的调控, 其不仅参与了正常视网膜的发生、发育过程, 可能与多种眼病的发生也有紧密联系。视网膜细胞凋亡主要出现在外核层、INL 和 GCL, 被清除后造成永久性视网膜变薄, 视力损害^[18]。本实验显示, 急性应激反应中视网膜细胞凋亡主要集中于 GCL 及 INL, 且随着时间延长凋亡细胞增多, 符合上述视网膜细胞凋亡规律。Caspase 是凋亡发生过程中所需的重要金属蛋白酶, 其中 caspase-3 的激活是凋亡发生过程中蛋白级联反应的限速酶, 也是细胞凋亡的主要效应因子和执行者^[19], 其在凋亡早期被激活而发挥作用, 但在细胞凋亡的晚期和死亡细胞, caspase-3 的活性明显下降。由 TUNEL 染色结果可知, 随时间延长, 节细胞凋亡较内核层细胞凋亡更明显, 总凋亡细胞数增多 ($P < 0.05$); 6 h 与 3 h 相比, caspase-3 活性升高不明显 ($P > 0.05$), 其原因可能为 CAO 后 6 h 视网膜细胞凋亡开始进入晚期。

目前认为, 死亡受体途径及线粒体途径是细胞凋亡的两条主要信号转导途径。肿瘤坏死因子 (TNF) 受体是具有代表性的死亡受体家族, TNF 作用于 TNF 受

体后形成的复合物与含有相同死亡结构域的接头蛋白 TRADD (TNFR-associated death domain protein, TRADD) 结合, TRADD 活化后激活 caspase-9 前体, 通过 caspase 家族的级联反应激活 caspase-3 后诱导细胞凋亡^[20]。线粒体途径是指细胞损伤后, 细胞色素 C 从线粒体释放, 与细胞凋亡激活因子 1 结合, 活化 caspase-9 前体, 进而通过 caspase 家族的级联反应激活 caspase-3, 诱发细胞凋亡^[21]。本小组之前的相关研究显示, CAO 后视网膜色素上皮细胞、视细胞内节、双极细胞和神经节细胞内的线粒体明显空泡变性^[1], 提示线粒体途径可能参与了此处视网膜细胞凋亡。

参考文献

- 1 杨继红, 卫建平, 郭政, 等. 急性心肌梗死对视网膜的影响及其机制 [J]. 眼科新进展, 2003, 23: 389 - 392
- 2 杨继红, 郭政, 卫建平, 等. 大鼠急性心肌梗死状态下视网膜 5-羟色胺的表达及其干预的研究 [J]. 眼科研究, 2005, 23: 30 - 33
- 3 杨继红, 郭政, 卫建平, 等. 曲马多对急性心肌梗死状态下视网膜的保护作用 [J]. 中国实用眼科杂志, 2004, 22: 57 - 61
- 4 Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, et al. Adenosine reduces cardiac TNF- α production and human myocardial injury following ischemia-reperfusion [J]. J Surg Res, 1998, 76(2): 117 - 123
- 5 Meunier JC, Molleauer C, Toll L, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL₁ receptor [J]. Nature, 1995, 377: 532 - 535
- 6 Watkins LR, Maier SF. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain [J]. Ann Rev Psychol, 2000, 51: 29 - 57
- 7 Rosen SD, Camici PG. The brain-heart axis in the perception of cardiac pain: the elusive link between ischaemia and pain [J]. Ann Med, 2000, 32(5): 350 - 364
- 8 Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, et al. The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune

system [J]. Pharmacol Rev, 2000, 52: 595 - 638

- 9 Burkhard B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: Immunoregulatory properties of CNS-resident cells [J]. Glia, 2000, 29 (4): 293 - 304
- 10 Liu T, Clark RK, McDonnell PC, et al. Tumor necrosis factor expression in ischemia neurons [J]. Stroke, 1994, 25(7): 1481 - 1485
- 11 Yang GY, Gong C, Qin Z, et al. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia mice [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1996, 69(1): 135 - 140
- 12 Palmieri EA, Benincasa G, Di Rella F, et al. Differential expression of TNF- α , IL-6, and IGF-1 by graded mechanical stress in normal rat myocardium [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282: H926 - 934
- 13 Schömig A. Catecholamines in myocardial ischemia: systemic and cardiac release [J]. Circulation, 1990, 82(3): 13 - 22
- 14 Yang JH, Meng XX, Xie LS, et al. Acute myocardial ischemia up-regulates substance P in the retina of rats [J]. Neurosci Letters, 2008, 443: 218 - 222
- 15 赵献明, 李浪. 急性心肌梗死心肌损伤的免疫学机制研究进展 [J]. 临床荟萃, 2007, 22(3): 221 - 223
- 16 李艳, 李贵仁, 康凤英. 缺血再灌注大鼠视网膜诱导型一氧化氮合酶与细胞凋亡的研究 [J]. 眼科新进展, 2004, 24(6): 452 - 454
- 17 陈跃国, 张成, 吴庭槐, 等. 小鼠视网膜缺血 - 再灌注后核因子- κ B 的激活 [J]. 中华眼科杂志, 2003, 39(9): 560 - 564
- 18 王云松. 细胞凋亡与眼科疾病 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2001, 4(11): 841 - 842
- 19 Haunstetter A, Lzumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. Circ Res, 1998, 82: 1111 - 1129
- 20 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor mediated apoptosis via two sequential signaling complexes [J]. Cell, 2003, 114: 181 - 190
- 21 Herr I, Debatin K. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy [J]. Blood, 2001, 98: 603 - 604

(收稿: 2008-09-26 修回: 2008-12-22)

(本文编辑: 高红)

· 短篇论著 ·

基质金属蛋白酶及其组织抑制因子在人眼葡萄膜中的表达及分布

栗映梅 申家泉

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一大类含二价锌离子的蛋白水解酶, 能够降解除多糖以外的几乎全部细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。TIMPs 是 MMPs 的内源性抑制因子, 与 MMPs 结合形成复合体, 抑制 MMPs 对 ECM 的降解。眼部许多疾病都与此有关, 如翼状胬肉、角膜溃疡、色素膜炎、脉络膜黑色素瘤、青光眼、白内障、糖尿病性视网膜病变等。本研究检测 MMPs 在正常人眼葡萄膜中的表达和

分布, 为进一步研究其在葡萄膜疾病中的作用提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 兔抗人多克隆抗体: MMP-1、2、3、7、9 及 TIMP-1、2、3、4 (武汉博士德生物工程有限公司); 免疫荧光 SABC-Cy3 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司 SA1074)。

1.2 标本 20 例正常供体眼来自山东省立医院眼库, 供者年龄 20 ~ 49 岁。纵切眼球, 取中央 4 ~ 5 mm 宽的环形标本, 10% 中性甲醛固定, 脱水, 石蜡包埋。

1.3 方法 所有切片先行苏木精 - 伊红染色, 虹膜、睫状体、脉络膜结构完整的眼球行免疫荧光染色。蜡块 4 μ m 连续切

本课题为山东省自然科学基金课题资助 (Y2002C32)

作者单位: 250021 济南, 山东大学附属省立医院眼科 (栗映梅, 研究生, 现在济南市第二人民医院眼科 250001)

通讯作者: 栗映梅 (Email: liyingmei77@sohu.com)