

丁苯酞对兔视网膜缺血再灌注损伤中细胞凋亡的影响

张雅馨, 苏杰, 黄帅, 张新跃, 刘颖, 王林洪

作者单位: 华北理工大学附属医院眼科, 河北 唐山 063000

通信作者: 王林洪, 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为眼底病和小儿斜弱视, E-mail: 15383055898@126.com

摘要:目的 观察丁苯酞对兔视网膜缺血再灌注损伤(RIRI)后凋亡因子P53/Bcl-2表达的影响。方法 选取新西兰白兔80只(均为雄性),采用随机数字表法分为对照组10只,RIRI组和给药组各35只,其中对照组再分为6 h、24 h两个亚组,RIRI组和给药组均再分为再灌注后1 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、7 d等7个亚组。制作兔RIRI模型的方法采用高眼压灌注法,HE染色法观察视网膜组织形态变化,免疫组化法检测P53及Bcl-2的表达,TUNEL法检测神经节细胞的凋亡。结果 P53、Bcl-2及TUNEL凋亡细胞均在对照组检测到极少的表达,在RIRI组组内不同时间点的表达均为先增多后减少的趋势,24 h时达到最高峰,分别为 (22.60 ± 1.14) (P53, 24 h)、 (28.00 ± 1.87) (Bcl-2, 24 h)、 (27.20 ± 0.83) (凋亡, 24 h),差异有统计学意义(均 $P < 0.01$);给药组最高峰出现在24 h,分别为 (13.40 ± 0.54) (P53, 24 h)、 (34.60 ± 1.67) (Bcl-2, 24 h)、 (19.40 ± 2.30) (凋亡, 24 h),差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。组间比较P53及TUNEL凋亡细胞的表达各个时间点均较RIRI组明显减少(均 $P < 0.05$),Bcl-2蛋白的表达较RIRI组增多($P < 0.01$)。结论 RIRI后行丁苯酞药物治疗可抑制视网膜神经节细胞P53的表达,增强Bcl-2的表达,减少神经节细胞的凋亡,对RIRI有一定的保护作用。

关键词: 丁苯酞; 视网膜缺血再灌注; 基因,P53; 基因,Bcl-2; 凋亡

Effect of DL-3n-butylphthalide on retinal cell apoptosis in rabbits with ischemia-reperfusion injury

ZHANG Yaxin, SU Jie, HUANG Shuai, ZHANG Xinyue, LIU Ying, WANG Linhong

Author Affiliation: Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China

Abstract: Objective To observe the effect of butylphthalide on the expression of apoptotic factor P53/Bcl-2 after retinal ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Methods** A total of 80 healthy New-Zealand white rabbits were randomly divided into control group ($n = 10$), RIRI group ($n = 35$) and drug group ($n = 35$). The control group was subdivided into 2 subgroups: 6 h, 24 h. The RIRI group and drug group was subdivided into 7 subgroups: 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 d after reperfusion. The rabbit model of retinal ischemia-reperfusion injury was established by high intraocular pressure perfusion. To observe morphology and degree of injury, detecting the expression of P53 and Bcl-2 in the retina by immunohistochemical method and detecting apoptosis of retinal ganglion cell by TUNEL was performed. **Results** P53, Bcl-2 and TUNEL apoptotic cells were rarely expressed in the control group, and increased first and then decreased in 1, 6, 12, 24, 48, 72 h and 7 d after retinal ischemia reperfusion of RIRI group. The peak respectively appeared at 24 h, which were (22.60 ± 1.14) (P53, 24 h), (28.00 ± 1.87) (Bcl-2, 24 h), (27.20 ± 0.83) (apoptotic, 24 h), with statistical significance (all $P < 0.01$). In drug group, the peak respectively appeared in 24 h, which were (13.40 ± 0.54) (P53, 24 h), (34.60 ± 1.67) (Bcl-2, 24 h), (19.40 ± 2.30) (apoptotic, 24 h), and the difference was statistically significant (all $P < 0.01$). The expressions of P53 and TUNEL apoptotic cells in each group were significantly lower than those in the RIRI group at each time point ($P < 0.05$), and Bcl-2 protein increased in RIRI group ($P < 0.01$). **Conclusion** Butylphthalide treatment can inhibit the P53 ganglion cells, enhance the expression of Bcl-2, reduce the apoptosis of retinal ganglion cells after retinal ischemia-reperfusion injury, which has a protective effect on retinal ischemia-reperfusion injury.

Key words: DL-3n-Butylphthalide; Retinal ischemia-reperfusion injury; Genes, P53; Genes, Bcl-2; Apoptosis

近年来,由多种缺血性眼病所引发的视网膜的缺血再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI)病例逐年增多,严重危害着病人的健康。视

网膜是眼球后部的一层薄膜,可以看作是大脑的一部分,主要是由丛状层和神经纤维层构成的白质、光感受器和神经节细胞构成的灰质和Müller细胞

及小星型细胞构成的神经胶质组成,对缺血缺氧环境极为敏感,且易受损伤,而且主要供给视网膜血供的终末动脉—视网膜中央动脉极易发生阻塞、缺血,一旦发生便可极快地损伤视网膜。RIRI 是临床常见疾病,即缺血性眼病病人视网膜在恢复供血后,视功能不升反降,主要发生于糖尿病、视网膜中央静脉阻塞、缺血性病变、青光眼等疾病中,其视神经损害主要表现在视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 的凋亡^[1],隋源等^[2]研究指出, RIRI 中神经元的丢失也主要集中体现在 RGCs。因此,视网膜缺血性疾病的预防及早期治疗极为重要。已有研究表明,丁苯酞对于脑缺血再灌注损伤中神经功能损伤具有很强的保护作用^[3],笔者自 2016 年 11 月至 2017 年 1 月就丁苯酞对 RIRI 中细胞凋亡的作用进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物 健康雄性新西兰白兔 80 只,体重(2.5 ± 0.5) kg, 外眼及眼底检查均正常,饲养环境相同,均由华北理工大学动物实验中心提供。实验中充分保证动物福利、给予动物人道关怀,动物处置也符合伦理学原则。

1.2 主要试剂 丁苯酞(恩必普,石药集团恩必普药业有限公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);封闭用正常山羊血清工作液 SP-9001(北京中杉金桥生物技术有限公司);抗 P53 多克隆抗体、抗 Bcl-2 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);山羊超敏二步法检测试剂盒(二抗)(北京中杉)等。

1.3 模型制备 采用前房高眼压灌注法^[4]制备缺血再灌注模型。术前给予丙美卡因点眼,复方托吡卡胺点眼至瞳孔完全散大后固定白兔,25% 乌拉坦耳缘静脉麻醉,剂量 4 mL/kg。麻醉成功后,白兔取仰卧位,将 4.5 号头皮针(连接 250 mL 0.9% 盐水袋)刺入前房,盐水袋垂直于兔眼,高度 150 cm,此时眼底镜可见视网膜缺血水肿、苍白,持续 1 h。对照组不予任何处理。氯霉素全程间断点眼保持角膜湿润,预防感染。

1.4 分组与给药 采用随机数字表法将实验动物分成对照组(10 只)、RIRI 组(35 只)、给药组(35 只)三组,其中对照组再分为 6 h、24 h 两个亚组(排除时间和环境因素),RIRI 组和给药组均再分 7 个亚组,分别为再灌注后 1 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、7 d。排除标准:未到达预定时间死亡及造模失败、有严重手术并发症的白兔。将丁苯酞软胶囊用食用麻油稀释到 10 mg/mL。治疗组于造模成功后

开始灌胃给药,给药剂量为 40 mg/kg,每日 1 次,直至处死。对照组和 RIRI 组每日给予相同体积食用麻油灌胃。

1.5 标本的制备 将实验动物按照规定时间于耳缘静脉过量麻醉处死后摘取眼球,快速置于 40 g/L 多聚甲醛中固定 24 h 以上。将眼球壁自视乳头处纵行剪开,在平行、垂直于视神经平面各取一块约 1 cm × 0.5 cm 视网膜组织置于包埋盒中,经过水洗、脱水、透明、石蜡包埋、切片,分别行 HE 染色、免疫组化法检测 B 细胞淋巴瘤-2 基因(Bcl-2)、抑癌基因(P53)表达量及 TUNEL 检测细胞凋亡。

1.6 结果的判读 封片后,每张切片随机取 4 个面积为 0.2 mm × 0.2 mm 的高倍镜视野(400 ×)观察组织形态变化,应用计算机辅助图像分析技术系统分析,计数各组阳性细胞数,计算平均值。

1.7 统计学方法 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准,组内不同时间点比较采用单因素方差分析(ANOVA),各组间同一时间点比较采用 *t* 检验,两两比较采用 LSD 检验。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 光学显微镜下观察视网膜组织形态变化 对照组兔视网膜组织结构与人相似。RIRI 组 1 h 视网膜神经纤维层及内丛状层组织出现轻度水肿,厚度增加,染色较淡;6 ~ 24 h 三个时间点,组织水肿逐渐加剧,其中神经纤维层和内丛状层最明显,可见 RGCs 排列稀疏;24 h 视网膜内界膜不平滑,全层均可见高度水肿,神经纤维层明显变薄,内核层细胞杂乱排列,RGCs 数量大幅减少,细胞变性,边界不清(图 1)。48 h、72 h 各层组织水肿明显减轻;120 h、7 d,视网膜水肿大幅消退,内层明显萎缩,RGCs 数量减少且稀疏排列。给药组视网膜缺血再灌注后视网膜组织形态变化与 RIRI 组相比均较后者轻,可见丁苯酞能明显的减轻缺血再灌注后视网膜组织的损伤。

2.2 Bcl-2 和 P53 蛋白的表达

2.2.1 Bcl-2 的表达 Bcl-2 具有抑制凋亡的作用,其阳性表达为细胞质的棕黄色染色。本实验中对对照组检测到极少阳性染色细胞,两个时间点无明显差异,而 RIRI 组两时间点与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 RIRI 可以使 Bcl-2 表达增加(表 1)。RIRI 组在缺血再灌注后 1 h 时可见极少数阳性表达;6 h、12 h 神经节细胞层阳性表达逐渐增多;24 h 阳性表达达到高峰,除神经节细胞层外,内核层也可见阳性表达,外核层及色素上皮层未见

阳性表达(图2);48 h、72 h可见神经节细胞层阳性表达逐渐下降,至7 d时已几乎无阳性细胞表达。给药组 Bcl-2 表达变化趋势同 RIRI 组相似,但各个时间点表达强度较 RIRI 组明显增强(7 d 除外),同 RIRI 组各时段相比较差异有统计学意义(表2)。

表1 RIRI 组和对照组 Bcl-2 在再灌注后 6 h、24 h 阳性细胞数/($n=5$,个/平方毫米, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	t 值	P 值
对照组	0.40 ± 0.54	0.60 ± 0.54	-0.57	>0.05
RIRI 组	13.00 ± 0.70	28.00 ± 1.87	-16.77	<0.01
t 值	31.50	31.43		
P 值	<0.01	<0.01		

表2 RIRI 组和给药组 Bcl-2 再灌注后各时间段阳性细胞数/($n=5$,个/平方毫米, $\bar{x} \pm s$)

再灌注时间	RIRI 组	给药组	t 值	P 值
1 h	3.80 ± 0.83	7.40 ± 1.14	-5.56	<0.01
6 h	13.00 ± 0.70^a	21.00 ± 1.22^a	-12.64	<0.01
12 h	18.40 ± 1.14^b	26.60 ± 1.34^b	-10.41	<0.01
24 h	28.00 ± 1.87^c	34.60 ± 1.67^c	-5.88	<0.01
48 h	18.20 ± 1.30^d	23.40 ± 1.14^d	-6.71	<0.01
72 h	9.00 ± 0.70^e	15.80 ± 0.83^e	-13.88	<0.01
7 d	0.60 ± 0.54^f	1.00 ± 0.70^f	-1.00	>0.05
F 值	367.56	466.55		
P 值	<0.01	<0.01		

注:1.^a组内 1 h 与 6 h 比, $P<0.01$;2.^b组内 12 h 与 6 h 比, $P<0.01$;3.^c组内 24 h 与 12 h 比, $P<0.01$;4.^d组内 48 h 与 24 h 比, $P<0.01$;5.^e组内 72 h 与 48 h 比, $P<0.01$;6.^f组内 7 d 与 72 h 比, $P<0.01$

2.2.2 P53 的表达 p53 能通过下调 Bcl-2 基因表达而产生促节细胞凋亡作用,其阳性表达为细胞核质的棕色或浅棕色染色。对照组神经节细胞检测到极少阳性表达,两个时间点无明显差异,而 RIRI 组两时间点与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),提示 RIRI 可以使 P53 表达增加(表3)。RIRI 组在缺血再灌注后 1 h 时可见极少数阳性表达;6 h、12 h 神经节细胞层可见阳性表达逐渐增多;24 h 阳性表达到达高峰,除神经节细胞层外,内核层也可见阳性表达,外核层及色素上皮层未见阳性表达(图3);48 h、72 h 可见神经节细胞层阳性表达逐渐下降,至 7 d 时阳性细胞表达较少。给药组 P53 表达变化趋势同 RIRI 组相似,但各时间点表达强度明显减弱,同 RIRI 组各时段相比较差异有统计学意义(表4)。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 凋亡阳性细胞表达于细胞核,颜色为棕黄色。对照组可见极少凋亡阳性细胞,两个时间点无明显差异,而 RIRI 组两时

表3 RIRI 组和对照组 P53 在再灌注后 6 h/24 h 阳性细胞数/($n=5$,个/平方毫米, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	t 值	P 值
对照组	0.40 ± 0.54	0.60 ± 0.54	-1.26	>0.05
RIRI 组	10.40 ± 1.34	22.60 ± 1.14	-15.49	<0.01
t 值	15.43	39.80		
P 值	<0.01	<0.01		

表4 RIRI 组和给药组 P53 再灌注后各时间段阳性细胞数/($n=5$,个/平方毫米, $\bar{x} \pm s$)

再灌注时间	RIRI 组	治疗组	t 值	P 值
1 h	3.84 ± 0.44	0.40 ± 0.54	10.75	<0.01
6 h	10.40 ± 1.34^a	6.80 ± 0.83^a	5.09	<0.01
12 h	15.60 ± 1.34^b	10.80 ± 0.83^b	6.78	<0.01
24 h	22.60 ± 1.14^c	13.40 ± 0.54^c	16.26	<0.01
48 h	17.00 ± 1.00^d	8.20 ± 0.44^d	17.96	<0.01
72 h	8.40 ± 0.54^e	5.80 ± 0.83^e	5.81	<0.01
7 d	3.60 ± 0.54^f	2.00 ± 0.70^f	4.00	<0.05
F 值	263.52	217.05		
P 值	<0.01	<0.01		

注:^a组内 1 h 与 6 h 比, $P<0.01$;^b组内 12 h 与 6 h 比, $P<0.01$;^c组内 24 h 与 12 h 比, $P<0.01$;^d组内 48 h 与 24 h 比, $P<0.01$;^e组内 72 h 与 48 h 比, $P<0.01$;^f组内 7 d 与 72 h 比, $P<0.01$

间点与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),提示 RIRI 可以使凋亡增加(表5)。RIRI 组再灌注后 1 h 神经节细胞层已经出现少量凋亡阳性表达;24 h 前阳性表达呈上升趋势,24 h 阳性表达出现峰值(除神经节细胞层外,内核层、外核层也可见阳性细胞)(图4);48 h、72 h 凋亡细胞数目呈下降趋势;7 d 时可见视网膜凋亡阳性细胞数极少,细胞核大量丢失。给药组凋亡细胞表达变化趋势同 RIRI 组,但各时间点表达强度明显减弱(7 d 除外),同 RIRI 组各时段相比较差异有统计学意义(表6)。

表5 RIRI 组和对照组在再灌注后 6 h、24 h 凋亡阳性细胞数/($n=5$,个/平方毫米, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	t 值	P 值
对照组	0.20 ± 0.44	0.80 ± 0.44	-2.12	>0.05
RIRI 组	13.40 ± 0.54	27.20 ± 0.83	-30.85	<0.01
t 值	41.74	62.22		
P 值	<0.01	<0.01		

3 讨论

丁苯酞化学名称为消旋-3-正丁基苯酞(dl-3n-butylphthalide),是我国近年自主研发的一类新药。既往大量的实验研究及临床观察证实了丁苯酞在人体内靶点众多,能广泛分布于胃、肠、脑、脂肪等

表 6 RIRI 组和给药组再灌注后各时间段凋亡阳性细胞数/
($n=5$, 个/平方毫米, $\bar{x} \pm s$)

再灌注时间	RIRI 组	治疗组	t 值	P 值
1 h	4.40 $\pm$ 0.89	0.80 $\pm$ 0.83	6.57	<0.01
6 h	13.40 $\pm$ 0.54 ^a	8.40 $\pm$ 1.51 ^a	6.93	<0.01
12 h	20.20 $\pm$ 0.83 ^b	12.80 $\pm$ 1.64 ^b	8.97	<0.01
24 h	27.20 $\pm$ 0.83 ^c	19.40 $\pm$ 2.30 ^c	7.12	<0.01
48 h	17.20 $\pm$ 1.30 ^d	12.40 $\pm$ 1.51 ^d	5.36	<0.01
72 h	8.80 $\pm$ 0.83 ^e	5.00 $\pm$ 1.00 ^e	6.51	<0.01
7 d	0.80 $\pm$ 0.83 ^f	0.40 $\pm$ 0.54 ^f	0.89	>0.05
F 值	532.89	115.73		
P 值	<0.01	<0.01		

注:1. ^a 组内 1 h 与 6 h 比, $P < 0.01$; 2. ^b 组内 12 h 与 6 h 比, $P < 0.01$; 3. ^c 组内 24 h 与 12 h 比, $P < 0.01$; 4. ^d 组内 48 h 与 24 h 比, $P < 0.01$; 5. ^e 组内 72 h 与 48 h 比, $P < 0.01$; 6. ^f 组内 7 d 与 72 h 比, $P < 0.01$

器官,直接透过血-脑屏障,能作用于心脑血管缺血疾病的多个病理环节,对脑缺血性疾病、血栓形成、血小板聚集、甚至急性缺血性脑卒中等疾病起到明显改善作用,不仅能改善线粒体功能,还对脑部缺血区域的血流量、微循环、清除自由基和脑部功能代谢均起到改善作用,促进功能恢复的同时无明显不良反应及毒副作用^[5-10]。Xu 等^[11]实验研究证实了丁苯酞对脑组织缺血性神经损伤有很强的保护作用,可最大程度恢复神经功能。有学者^[12-13]研究丁苯酞对凋亡相关因子的影响的实验结果表明丁苯酞对脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与上调 Bcl-2 的表达、下调 Bax 的表达有关。袁晓勇^[14]通过研究家兔体内丁苯酞药动学发现其口服给药吸收迅速,30 min 即可达最大血药浓度,且能迅速消除。虽然口服给药生物利用度较低,但大量实验研究表明口服给药方式在体内诸多器官广泛分布,以脑组织为主要靶器官,能起到有效的抑制细胞凋亡、减轻神经损伤的作用。本次实验也表明了丁苯酞对 RCGs 的凋亡具有较好的保护作用。

细胞凋亡的发生由凋亡基因来进行调控,从一些早期的研究我们可以得知在视网膜缺血再灌注模型中,凋亡细胞存在于视网膜的神经节细胞层以及内核层^[15]。任玉伟和宿华威^[16]的实验研究表明 Bcl-2 蛋白具有抑制细胞凋亡作用,而 P53 则作为调控 Bax/Bak 的上游调控机制诱导细胞凋亡^[17]。本次实验通过等剂量的丁苯酞与食用麻油灌胃给药,可见在缺血再灌注损伤后 1~24 h Bcl-2/P53 表达均明显增加,24 h 达到高峰,24 h 后则表达逐渐降低,差异有统计学意义。在给药组中我们可以见到

Bcl-2 的表达均比同一时间点的 RIRI 组增强,差异有统计意义(7 d 组除外);P53 的表达给药组均低于同一时间点的 RIRI 组,差异有统计意义,证明了丁苯酞可以通过上调 Bcl-2 和下调 P53 的表达起到抑制细胞凋亡的作用。而 TUNEL 试验中给药组各时间点凋亡细胞数均小于 RIRI 组,差异有统计学意义(7 d 组除外),也同样证实了丁苯酞对视网膜缺血再灌注损伤中细胞凋亡起到了保护作用。本实验中 7 d 时凋亡和 Bcl-2 蛋白的阳性表达的组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),可能是与在 7 d 时观察时间过长,RIRI 对视网膜的损伤逐渐减轻及视网膜自身修复作用逐渐加强有关。

从本次实验结果整体来看可以得出,丁苯酞能上调 Bcl-2 和下调 P53 的表达,减少凋亡细胞的表达数目,对 RIRI 后的细胞凋亡起到了一定的保护作用,提示丁苯酞可以透过血-视网膜屏障。但并未能完全避免凋亡的发生,可能的原因为一旦凋亡机制启动,凋亡的发生可能是无法避免的。本次实验没有给予不同浓度的剂量,故不同药物浓度对 RIRI 的影响有待进一步深入研究。

(本文图 1~4 见插图 7-1)

参考文献

- [1] FUKUDA K, HIROOKA K, MIZOTE M, et al. Neuroprotection against retinal ischemia-reperfusion injury by blocking the angiotensin II type1 receptor[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7):3629-3638.
- [2] 隋源, 李雪丽, 勾晓梅, 等. 视网膜缺血再灌注后视网膜的病理变化及造模前后 CREB 的表达[J]. 临床眼科杂志, 2017(6): 555-559.
- [3] 王林, 王瑞刚, 王原. 丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤模型细胞凋亡作用及机制初步研究[J]. 生物医学工程与临床, 2017, 21(5):471-475.
- [4] 李娟娟, 李燕, 汤志伟. 激活的小胶质细胞在大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型中的作用[J]. 眼科新进展, 2015, 35(1):9-14.
- [5] 鄢学芬, 詹瑾, 黄叶宁, 等. 丁苯酞的药理作用与临床评价[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(17):1498-1500.
- [6] ZHAO Y, LI J, ZHANG P, et al. Protective effects of dl-3n-butylphthalide against diffuse brain injury [J]. Neural Regeneration Research, 2013, 8(28):2615-24.
- [7] 陈静, 杜业亮, 李增芬. 丁基苯酞对慢性脑缺血大鼠海马区 NO 表达的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(5):5-8.
- [8] 魏欢, 李玲, 战丽萍, 等. 丁基苯酞上调 PGC-1 α 发挥内皮细胞保护作用的机制研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 28(8):697-700.
- [9] ZHANG P L, LU H T, ZHAO J G, et al. Protective effect of dl-3n-butylphthalide preconditioning on focal cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats[J]. Acta Neuropsychiatrica, 2012, 25(1):12.
- [10] 朱海生. 丁苯酞在急性脑梗死治疗中的抗炎作用分析[J]. 中