

引文格式:党鸿,辛晓蓉.白藜芦醇对急性低压缺氧诱导的大鼠视网膜损伤的保护作用[J].眼科新进展,2018,38(10):940-942,946. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0222

【实验研究】

白藜芦醇对急性低压缺氧诱导的大鼠视网膜损伤的保护作用[△]

党鸿 辛晓蓉

作者简介:党鸿,女,1990年10月出生,青海湟源人,在读硕士研究生。研究方向:视网膜疾病。E-mail:1023577564@qq.com;ORCID:0000-0002-1905-9809

About DANG Hong: Female, born in October, 1990. Postgraduate student. E-mail: 1023577564 @ qq. com; ORCID: 0000-0002-1905-9809

收稿日期:2018-04-23
修回日期:2018-07-26
本文编辑:方红玲
△基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81460086、81160122);青海省高端创新人才千人计划项目;留学人员科技活动择优资助项目;青海省自然科学基金项目(编号:2014-ZJ-911)
作者单位:810000 青海省西宁市,青海红十字医院眼科
通讯作者:辛晓蓉, E-mail: xrgc19@hotmail. com; ORCID: 0000-0003-1593-4140

Received date: Apr 23, 2018
Accepted date: Jul 26, 2018
Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81460086, 81160122); Thousand Talents Plan of Qinghai Province; Ministry of Human Resources and Social Security of PRC; Natural Science Foundation of Qinghai Province (No: 2014-ZJ-911)
From the Department of Ophthalmology, Qinghai Red Cross Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China
Responsible author: XIN Xiao-Rong, E-mail: xrgc19 @ hotmail. com; ORCID: 0000-0003-1593-4140

化学法观察大鼠视网膜组织中胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 的表达, RT-PCR 检测核转录因子-kappaB (nuclear factor-kappa B, NF-κB) 和脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA 的表达。结果 低氧模型组大鼠视网膜 GFAP 与 HIF-1 的表达较常氧对照组增加, BDNF mRNA (2.627 ± 0.633) 和 NF-κB mRNA (1.712 ± 0.198) 的相对表达量较常氧对照组 (2.000 ± 0.518、1.053 ± 0.483) 上调 (P = 0.013、0.008)。与低氧模型组对比, RES 干预组视网膜受损程度减轻, GFAP 与 HIF-1 的表达减少, BDNF mRNA 相对表达量 (2.053 ± 0.938) 显著下调, 差异有统计学意义 (P = 0.024), 而 NF-κB mRNA 相对表达量 (1.481 ± 0.397) 与低氧模型组相比, 差异无统计学意义 (P = 0.455)。结论 RES 对高海拔缺氧诱导的视网膜损伤有保护作用, 其机制可能与调节 GFAP、HIF-1、BDNF 以及 NF-κB 的表达有关。

【关键词】急性低压缺氧;白藜芦醇;视网膜;胶质纤维酸性蛋白;缺氧诱导因子-1;脑源性神经营养因子;核转录因子-kappa B
【中图分类号】R774

Protective effects of resveratrol on acute hypobaric hypoxia-induced rat retinal impairment

DANG Hong, XIN Xiao-Rong

[Abstract] Objective To investigate the protective effects of resveratrol (RES) on rat retinal impairment induced by acute hypobaric hypoxia as well as the mechanism involved in the pathological process. **Methods** Seventy-two Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, hypoxic model group, and RES intervention group. The control group was housed in normoxic condition. The hypoxic model group and the RES intervention group were maintained at a low-pressure oxygen cabin, as similar pressure as 5000 m above sea level. RES group was given intraperitoneal injection (30 mg · kg⁻¹, once a day). Retinal tissue was obtained after rats were treated after 7 days. Expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in retina were examined by immunohistochemistry. Nuclear factor-kappaB (NF-κB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression levels were determined by quantitative real time PCR. **Results** Increased immunohistochemical expression levels of GFAP and HIF-1 were found in the retinas of the hypoxic model group as compared to the control group. Hypobaric hypoxia upregulated the relative expression of BDNF (2.627 ± 0.633) and NF-κB mRNA (1.712 ± 0.198), compared with controls (2.000 ± 0.518, 1.053 ± 0.483), respectively (P = 0.013, 0.008). RES mitigated the retinal damage by the down-regulation of GFAP and HIF-1 expression in rat retinas; meanwhile, the administration of RES also down regulated mRNA level of BDNF (2.053 ± 0.938) as compared to hypoxic model group, and there was a significant difference (P = 0.024). NF-κB mRNA expression (1.481 ± 0.397) decreased in the RES-treated group, but no significant difference was seen when compared to hypoxic model group (P = 0.455). **Conclusion** The intervention of RES plays a protective role in high altitude hypoxia-induced retinal damage through modulating the gene expression of GFAP, HIF-1, BDNF and NF-κB.

[Key words] acute hypobaric hypoxia; resveratrol; retina; glial fibrillary acidic protein; hypoxia-inducible factor-1; brain-derived neurotrophic factor; nuclear factor-kappa B

【摘要】 目的 探讨白藜芦醇对急性低压缺氧诱导的大鼠视网膜损伤的保护作用及机制。**方法** 将72只健康SD大鼠随机分成3组:常氧对照组、低氧模型组、低氧+白藜芦醇(resveratrol, RES)干预组(RES干预组)。常氧对照组大鼠在常氧环境下喂养,低氧模型组及RES干预组大鼠置于低压氧舱内(模拟5000 m的海拔高度)喂养,RES干预组每日并给予腹腔注射30 mg · kg⁻¹ RES 1次。各组大鼠在不同处理7 d后剥离视网膜,免疫组织

高原地区由于海拔高、气压低,形成了特殊的气候环境。急进高原受到低氧等诸多因素的影响,会

出现一系列高原反应,严重者可发生高原病,如高原肺水肿、高原脑水肿等^[1]。视网膜作为神经中枢系

统的一部分,对缺氧非常敏感,低压缺氧状态下影响血-视网膜毛细血管屏障,进一步发生高原视网膜病变(high altitude retinopathy, HAR)^[1-2]。随着越来越多的人进入高原,发生 HAR 的几率也相应增加。近年来国内外学者对高原特发病的研究逐渐深入,但对于 HAR 发病从分子细胞水平的研究及干预措施方面的探讨相对较少,因此研究 HAR 的病因及治疗极为重要。白藜芦醇(resveratrol, RES)是植物产生的一种天然抗毒素,通过清除自由基、抗氧化的作用而发挥抗感染、抗氧化、脑和神经保护等作用^[3]。本研究通过模拟海拔 5000 m 的缺氧环境,探讨 RES 对急性低压缺氧诱导的大鼠视网膜损伤的干预作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源 雄性清洁级 SD 大鼠 72 只[实验动物许可证号 SCXK(陕)2012-003],由西安交通大学动物实验中心提供,体质量(210±20)g。

1.1.2 主要试剂与仪器 RES(北京博奥拓达科技有限公司),胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(Proteintech 公司),缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)抗体(Novusbio 公司)。RNA 逆转录试剂盒(TAKARA 公司),SYBR GREEN 试剂盒、384 孔 RT-PCR 板、RT-PCR 反应膜(美国 ABI 公司),RT-PCR 引物(上海生工生物工程有限公司),荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 将 72 只健康 SD 大鼠随机分成 3 组:常氧对照组($n=24$)、低氧模型组($n=24$)和低氧+RES 干预组(简称 RES 干预组; $n=24$)。常氧对照组大鼠在常氧环境下喂养,低氧模型组及 RES 干预组大鼠置于低压氧舱内(模拟 5000 m 的海拔高度),每 24 h 开舱 0.5 h 给大鼠加食、喂水,并给 RES 干预组大鼠每日腹腔注射 30 mg·kg⁻¹ RES 1 次,低氧模型组大鼠注射等量生理盐水,持续 7 d。

1.2.2 免疫组织化学方法检测 GFAP 和 HIF-1 的表达 腹腔注射 100 g·L⁻¹水合氯醛麻醉大鼠后,快速取出眼球,固定于 40 g·L⁻¹多聚甲醛溶液中。将固定好的标本常规脱水、浸蜡、包埋,制成厚 4 μm 石蜡切片,均贴片于体积分数 0.05% 多聚赖氨酸处理的载玻片上。常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,抗原修复,滴加一抗(GFAP 为 1:800;HIF-1 为 1:30),4℃孵育过夜,滴加辣根酶标记的二抗,37℃孵育 30 min,辣根过氧化物酶活性标记的工作液,免疫组织化学染色按 ABC 检测试剂盒(A-22066, Eugene, OR)操作步骤进行。加入 DAB 显色液,苏木素复染,脱水、透明,中性树胶封片后光学显微镜下观察结果。

1.2.3 RT-PCR 检测核转录因子 κB 与脑源性神经营养因子 mRNA 的表达 腹腔注射 100 g·L⁻¹水合氯醛麻醉大鼠,麻醉后快速取出眼球,去除晶状体与玻璃体,并完整剥离视网膜。加 1 mL RNAiso Plus 与视网膜混匀,提取细胞总 RNA,按照 SYBR GREEN 试剂盒进行 RT-PCR。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)上游引物:5'-GGAGGCTAAGTGGAGCTGAC-3',下游引物:5'-CATGTTTCGATTTCGAGTGGTCTT-3';核转录因子 κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)上游引物:5'-GCAC-CAAGACCGAAGCAA-3',下游引物:5'-TCCCCGTACCCGCGTAGTC-3';β-actin 上游引物:5'-CCCATCTATGAGGTTACGC-3',下游引物:5'-TTTAATGTCACGCGATTTTC-3'。逆转录合成 cDNA,将获取的 cDNA 分别加入各引物的反应体系中进行 RT-PCR。以 cDNA 产物为模板,PCR 的循环参数:50℃反转录 3 min,95℃初始 PCR 活化 3 min,95℃变性 10 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 40 次。扩增后进行熔解曲线分析和数据的定量分析。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计学分析。实验数据经 W 检验呈正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene 检验方差齐,用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RES 对视网膜 GFAP 和 HIF-1 表达的影响 常氧对照组视网膜神经纤维层及神经节细胞层 GFAP 呈阳性表达(图 1A),低氧模型组视网膜 GFAP 阳性表达增强(图 1B),而 RES 干预组视网膜 GFAP 的表达较低氧模型组减弱(图 1C)。常氧对照组视网膜 HIF-1 少许表达(图 2A),低氧模型组视网膜内界膜及内丛状层 HIF-1 阳性表达增强(图 2B),而 RES 干预组视网膜 HIF-1 的表达较低氧模型组明显减弱(图 2C)。

2.2 RES 对视网膜 BDNF、NF-κB mRNA 表达的影响 3 组大鼠视网膜 BDNF mRNA 和 NF-κB mRNA 的表达差异均有统计学意义($F=4.250/5.278$; $P=0.020/0.008$)。低氧模型组 BDNF mRNA (2.627 ± 0.633)和 NF-κB mRNA (1.712 ± 0.198)的相对表达量较常氧对照组($2.000 \pm 0.518/1.053 \pm 0.483$)均显著上调($P=0.013/0.008$)。与低氧模型组对比,RES 干预组视网膜受损程度减轻,BDNF mRNA 相对表达量显著下调(2.053 ± 0.938 , $P=0.024$),而 NF-κB mRNA 相对表达量(1.481 ± 0.397)无明显变化($P=0.455$)。

3 讨论

急进高原缺氧环境后,机体各组织器官都会出现不同程度的缺氧应激反应,而中枢神经系统对缺

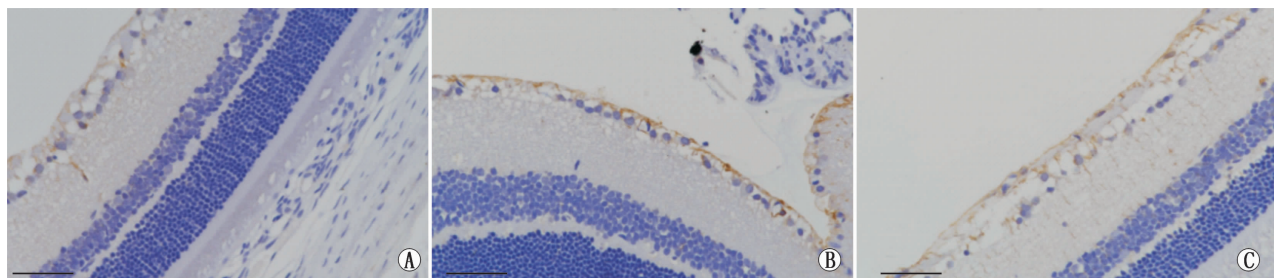


图1 GFAP在各组大鼠视网膜组织中的表达。A:常氧对照组;B:低氧模型组;C:RES干预组。标尺=50 μm

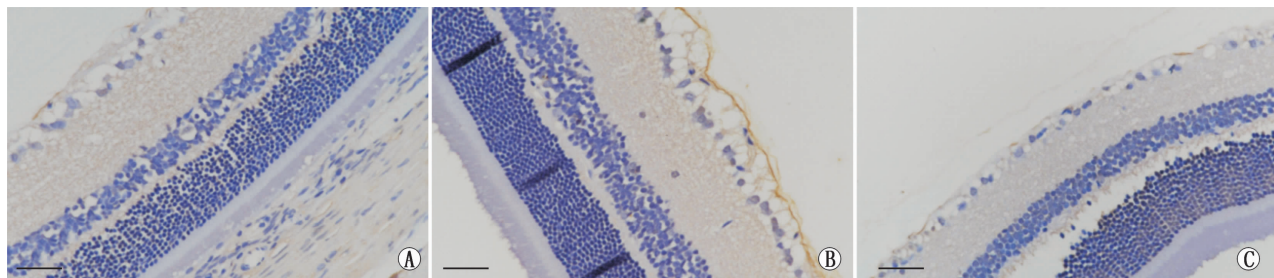


图2 HIF-1在各组大鼠视网膜组织中的表达。A:常氧对照组;B:低氧模型组;C:RES干预组。标尺=50 μm

氧极为敏感,急性缺氧时整个神经系统兴奋性增强,视网膜作为中枢神经系统的延伸组织,对缺氧非常敏感,急性缺氧能使视网膜发生一系列病理生理变化。高原缺氧环境下检测视网膜电流图结果表明^[4],在高原缺氧环境下视网膜的内核层、外核层及神经节细胞层功能均发生变化。

以往研究表明,缺氧导致参与脑脊液-视神经屏障的重要细胞成分——脑膜上皮细胞的增殖率下降,引起内质网及线粒体功能障碍^[5-6]。通过本研究我们进一步探讨了低压缺氧对视网膜的影响以及RES的干预机制。GFAP是一种参与构成细胞骨架的中间丝蛋白,是胶质细胞的标志性蛋白,其过度表达用于标记星形胶质细胞发生反应性胶质化^[7]。HIF-1是一种氧依赖转录激活因子,是参与调节细胞内氧代谢的关键因子之一,在低氧适应机制中发挥重要的作用^[8]。免疫组织化学检测结果提示低氧环境使大鼠视网膜GFAP、HIF-1阳性表达增强。低氧环境下大鼠视网膜组织的GFAP表达增强可能提示胶质细胞的功能反应性提高。而氧感受器感受到缺氧后HIF-1被激活,从而通过调节目的基因维持氧稳态。RES干预组的GFAP、HIF-1表达明显减少,说明RES的保护作用可能是通过减轻低氧损伤而间接抑制了GFAP、HIF-1的表达,减轻了视网膜的缺氧应激反应,以维持视网膜的功能。

BDNF是视网膜分泌的最丰富的因子之一,其在多种视网膜损伤条件下具有保护视神经和视网膜神经节细胞的作用。研究提示持续高眼压大鼠视网膜中上调的BDNF通过保护RGC树突可减少RGC的凋亡及延缓视力的丧失^[9];糖尿病视网膜

病变患者视网膜中BDNF减少,对早期患者可造成视网膜细胞凋亡和神经退行性病变,晚期患者则会出现神经和血管损伤^[10]。本研究结果表明,急性低压缺氧使大鼠视网膜中BDNF和NF-κB mRNA表达显著上调,RES下调了这两种基因的表达。其机制可能是急性低压缺氧对大鼠视网膜的损伤诱导了保护因子BDNF的上调,而RES对低氧诱导的视网膜损伤有抑制作用,从而间接下调了BDNF的表达。NF-κB具有多向转录调节作用的核蛋白因子,成为促炎症基因表达的重要枢纽,几乎存在于所有类型细胞中。NF-κB的异常活化可启动其下游基因的转录,增强促炎症因子作用及氧化应激反应,最终引起细胞凋亡。NF-κB对氧化应激的敏感性高,研究表明在缺氧诱导的氧化应激反应中,NF-κB的活化是缺氧转录反应的关键组成部分,可通过不同途径诱导多种细胞因子的表达,促进炎症反应^[11]。本研究发现急性缺氧使大鼠视网膜组织NF-κB表达上调,说明急性缺氧对大鼠视网膜的损伤作用可能跟NF-κB的激活有关,而NF-κB能够进一步介导炎症细胞因子IL-1α、IL-1β、IL-6的表达,故其机制可能是过度激活的NF-κB诱导了某些炎症因子的表达,促进了视网膜的损伤,而RES下调了NF-κB的表达。

急性高原低压缺氧环境导致大鼠视网膜损伤,RES对此损伤有保护作用,其机制可能与调节GFAP、HIF-1、BDNF及NF-κB等的表达有关。高海拔急性缺氧环境对大鼠视网膜的损伤由多种因素造成的,其具体的机制有待进一步研究。

(下转第946页)

后7 d、14 d神经纤维层和内核层由于细胞凋亡而变薄^[13]。我们推测挫伤后早期应用甘露醇可扩充血浆容量^[11-12],改善血液流变学,减少因缺氧造成的局部组织坏死,也能改善细胞代谢,提高愈后功能^[13-15]。

综上所述,甘露醇可明显降低视网膜挫伤后神经上皮层AQP-4的表达,提示甘露醇对AQP-4有抑制作用。应用甘露醇治疗视网膜挫伤后神经上皮层水肿及研发新型脱水剂具有一定意义。

参考文献

[1] FU Q, WANG Z Y. The thickness of sensory layer of the experimental contusive of retina in rabbit[J]. *J Clin Ophthalmol*, 2008, 16(3): 262-264.
付群, 王志玉. 实验性兔视网膜挫伤后不同时间的视网膜厚度研究[J]. 临床眼科杂志, 2008, 16(3): 262-264.

[2] ZHAO J, MOORE A N, CLIFTON G L, DASH P K. Sulforaphane enhances aquaporin-4 expression and decreases cerebral edema following traumatic brain injury[J]. *Neurosci Res*, 2005, 82(4): 499-506.

[3] LI F M. Ophthalmology[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996: 3281-3285.
李凤鸣. 眼科全书[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 3281-3285.

[4] DOU H L, SONG C. Changes of retinal tissue and ultrastructure after ocular contusion[J]. *J Ocul Traum Occupat Eye Dis*, 1993, 15(1): 8-10.
窦宏亮, 宋琛. 眼球钝挫伤后视网膜组织及超微结构的变化[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 1993, 15(1): 8-10.

[5] YAKATA K, HIROAKI Y, ISHIBASHI K, SOHARA E, SASAKI S, MITSUOKA K, et al. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity Biochim[J].

Biophys Acta, 2007, 1768(3): 688-693.

[6] YAMAMOTO N, YONEDA K, ASAI K, SOBUE K, TADA T, FUJITA Y, et al. Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 90(1): 26-38.

[7] ZHAO L, BRINTON R D. Vasopressin-induced cytoplasmic and nuclear calcium signaling in embryonic cortical astrocytes: Dynamics of calcium and calcium dependent kinase translocation[J]. *Neuroscience*, 2003, 23(10): 4228-4239.

[8] YU L. New clinical application of mannitol[J]. *Chin Pract Med*, 2009, 4(14): 146-147.
于莉. 甘露醇的临床新用途[J]. 中国实用医药, 2009, 4(14): 146-147.

[9] FELIPE A M, FREDERICO C M, ROBERTO M V, REMO S. Axonal loss after traumatic optic neuropathy documented by optical coherence tomography[J]. *Am J Ophthalmol*, 2003, 135(3): 406-408.

[10] MIYAHARA T, KURIMOTO Y, KUROKAWA T, KURODA T, YOSHIMURA N. Alterations in retinal nerve fiber layer thickness following indirect traumatic optic neuropathy detected by nerve fiber analyzer, GDx-N[J]. *Am J Ophthalmol*, 2003, 136(2): 361-364.

[11] SUN W R, ZHAO G Q, LIANG C P, WANG H H, YANG W Y, ZHAO J, et al. Study on enzyme histochemistry and histology of retinal contusion[J]. *Ophthalmol Res*, 1996, 1(2): 101-104.
孙为荣, 赵桂秋, 梁婵萍, 王颀华, 杨文毅, 赵洁, 等. 视网膜挫伤的酶组织化学及组织学研究[J]. 眼科研究, 1996, 1(2): 101-104.

[12] LIU Y W, LIU Q X. Clinical analysis of ocular trauma[J]. *Jilin Med J*, 2004, 25(10): 36.
刘英伟, 刘秋霞. 眼球顿挫伤的临床分析[J]. 吉林医学, 2004, 25(10): 36.

[13] WANG Z Y, SHI A Y. Pathology observation of retinal contusion rabbit model[J]. *Int Eye Sci*, 2009, 9(8): 1469-1471.
王志玉, 史爱云. 视网膜挫伤兔模型的病理学观察[J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(8): 1469-1471.

(上接第942页)

参考文献

[1] IMRAY C, BOOTH A, WRIGHT A, BRADWELL A. Acute altitude illnesses[J]. *BMJ*, 2011, 15: 343.

[2] BOSCH M M, MERZ T M, BARTHELMES D, PETRIG B L, TRUFFER F, BLOCH K E, et al. New insights into ocular blood flow at very high altitudes[J]. *Appl Physiol*, 2009, 106(2): 454-460.

[3] FRÉMONT L. Biological effects of resveratrol[J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 663-673.

[4] SCHATZ A, WILLMANN G, FISCHER MD, SCHOMMER K, MESIAS A, ZRENNER E, et al. Electroretinographic assessment of retinal function at high altitude[J]. *Appl Physiol*, 2013, 115(3): 365-372.

[5] XIN X R, GONG T X. Effects of hypoxia on production of ATP and expression of mitochondria C in human meningeal cells as the cerebral fluid-optic nerve barrier[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(1): 28-31.
辛晓蓉, 巩天祥. 缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞ATP水平和细胞色素C表达的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(1): 28-31.

[6] XIN X R, GONG T X. Effects of hypoxia on endoplasmic reticulum and mitochondrial membrane potential in human me-

ningothelial cells in cerebral fluid-optic nerve barrier[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2014, 34(11): 1009-1012.

辛晓蓉, 巩天祥. 缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞内质网和线粒体膜电位的影响[J]. 眼科新进展, 2014, 34(11): 1009-1012.

[7] FRANCKE M, FAUDE F, PANNICKE T, BRINGMANN A, ECKSTEIN P, REICHELT W, et al. Electrophysiology of rabbit müller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(5): 1072-1079.

[8] Semenza GL. Oxygen homeostasis[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2010, 2(3): 336-361.

[9] FENG L, CHEN H, YI J, TROY JB, ZHANG HF, LIU X. Long-term protection of retinal ganglion cells and visual function by brain-derived neurotrophic factor in mice with ocular hypertension[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(8): 3793-3802.

[10] OLA MS, NAWAZ MI, EL-ASRAR AA, ABOUAMMOH M, AL-HOMIDA AS. Reduced levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the serum of diabetic retinopathy patients and in the retina of diabetic rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(3): 359-367.

[11] TAYLOR CT. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- κ B in hypoxic inflammation[J]. *J Physiol*, 2008, 586(17): 4055-4059.