

复方光明胶囊对大鼠视网膜光损伤中 Bax、bcl-2 影响的实验研究

彭 华¹⁾, 马 珊¹⁾, 王维绮²⁾, 卜文超¹⁾, 董玉¹⁾, 马素红¹⁾

(1) 云南省中医医院, 云南 昆明 650021; 2) 昆明医科大学附属口腔医院, 云南 昆明 650031)

[摘要] **目的** 观察复方光明胶囊对实验性大鼠视网膜光损伤后 Bax、bcl-2 的影响。 **方法** SD 大鼠 30 只 (60 只眼), 随机分为高、中、低剂量组, 模型组和正常组, 每组 6 只 (12 只眼)。造模前 7 d 给药, 连续灌胃 2 周。除正常组以外各组实验用大鼠距角膜 (150±3) mm 照射, 使大鼠眼在接受手术显微镜水平位时照度为 (22 000±1 000) Lux, 30 min 的持续光照射。光照后继续给药 1 周, 观察各组视网膜感光细胞中 Bax、bcl-2 表达差异。 **结果** 模型组较正常组 bcl-2 表达减弱、Bax 表达增强 ($P<0.05$), 高、中、低剂量组较模型组 bcl-2 表达增强、Bax 表达减弱 ($P<0.05$)。 **结论** 手术显微镜视网膜光损伤动物模型造模成功, 复方光明胶囊各剂量组对视网膜光损伤后有保护作用, 其中高、中剂量组有较为明显的优势。

[关键词] 复方光明胶囊; 视网膜光损伤; Bax; bcl-2

[中图分类号] R961 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 12-0015-04

Effect of Compound Light Capsule on the Expression of Bax and bcl-2 in Retina of Rats with Retinal Light Injury

PENG Hua¹⁾, MA Shan¹⁾, WANG Wei-qi²⁾, PU Wen-chao¹⁾, DONG Yu¹⁾, MA Su-hong¹⁾

(1) Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650032; 2) The Affiliated Stomatology Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Compound Light Capsule on the expression of Bax, bcl-2 in retina of rats with retinal light injury. **Methods** 30 SD rats (60 eyes) were divided into high dose group, middle dose group, low dose group, sham group, and normal group in random, 6 SD rats (12 eyes) in each group. Rats were given intragastric administration of Compound Light Capsule 7 days before modeling for 2 weeks. Experimental rats in each group were exposed to the light 150±3mm away from the corner except the normal group. The illumination of eyes in the horizontal position of operation microscope was 22000±1000 lux, and light exposure lasted for 30 minutes. Rats were given Compound Light Capsule for another 1 week after exposure to the light, then the expression of Bax and bcl-2 in rats in each group were observed. **Results** Compared with the normal group, the expression levels of bcl-2 decreased and the expression levels of Bax increased in sham group ($P<0.05$). The expression levels of bcl-2 increased and the expression levels of Bax decreased in high, medium and low-dose group ($P<<0.05$). **Conclusions** The establishment of the retinal light injury model is successful by the use of the operating microscope. Each dose of Compound Light Capsules shows a protective effect on retinal light injury, and high dose has the best efficacy.

[Key words] Compound light capsule; Retinal light injury; Bax; bcl-2

随着眼科光学诊疗器械的日益增多, 过强的光源导致的视网膜损伤不断见诸报道。认识其发病机制和防治方法, 对于减少医源性光损伤是大

有益处的。云南省中医医院复方光明胶囊具有活血化瘀、软坚散结、通络明目作用, 本实验拟通过实验性光损伤动物模型的建立, 给予该药物进

[基金项目] 云南省科技厅自然科学基金资助项目 (2009ZC153M); 云南省教育厅科研基金资助项目 (09Y0237)

[作者简介] 彭华 (1967~), 男, 云南楚雄市人, 医学学士, 主任医师, 主要从事眼科临床工作。

行干预,探讨复方光明胶囊对手术显微镜光源对视网膜光损伤的修复作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

SD 大鼠 30 只购于昆明医科大学动物实验中心,体重 180~270 g,动物购回驯养 1 周后分组。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立及分组 将动物随机分为 5 组:正常对照组、模型对照组、低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组,每组 6 只,12 只眼。正常对照组和模型对照组造模前 7 d 给予生理盐水,低、中、高剂量组采用复方光明胶囊混浊液按分组灌胃,每鼠每日 1 次。给药量按照实验动物与人用药量的换算公式计算所得,造模前 7 d 给药。除正常组以外各组用大鼠距角膜 (150 ± 3) mm 照射,使大鼠眼在接受手术显微镜水平时照度为 ($22\ 000 \pm 1\ 000$) Lux,30 min 的持续光照射。光照后继续给药 1 周。

1.2.2 标本制备及 HE 染色 动物处死后摘除眼球,并在手术显微镜下去除角膜、晶体及玻璃体后,立即放入 10% 中性福尔马林溶液中固定 48 h,经逐级酒精脱水,二甲苯透明、浸蜡,石蜡包埋。经视乳头矢状面纵向做 4~5 μm 厚的切片,HE 染色:脱蜡、苏木素染色、伊红染色、梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.3 免疫组化检测 Bax、bcl-2 S-P 免疫组化染色试剂盒采用生物素标记的第二抗体与链霉菌抗生物素蛋白连接的过氧化物酶及底物色素混合液来测定细胞和组织中的抗原。染色的主要过程如下:石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS (pH7.4) 冲洗 3 次,每次 3 min。根据每一种抗体的要求,对组织抗原进行相应的修复。每张切片加 1 滴或 50 μL 过氧化物酶阻断溶液 (试剂 A),以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 10 min。PBS 冲洗 3×3 min。甩去 PBS 液,每张切片加 1 滴或 50 μL 的非免疫性动物血清 (试剂 B),室温下孵育 10 min。甩去血清,每张切片加 1 滴或 50 μL 的第一抗体 (用户自选),室温下孵育 60 min 或 4 摄氏度过夜,建议参阅每种抗体说明书。PBS 冲洗 3×5 min。甩去 PBS 液,每张切片加 1 滴或 50 μL 生物素标记的第二抗体 (试剂 C),室温下孵育 10 min。、PBS 冲洗 3×3 min。甩去 PBS 液,每张切片加 1 滴或 50 μL 链霉菌抗生物素过氧化物酶溶液 (试剂 D),室温下孵育 10 min。PBS 冲洗 3×3

min。甩去 PBS 液,每张切片加 2 滴或 100 μL 新鲜配制的 DAB 或 AEC 溶液,显微镜下观察 3~10 min,阳性显色为棕色或红色。自来水冲洗,苏木素复染,0.1% 盐酸酒精分化,0.1% 氨水或 PBS 冲洗返蓝。如果用 DAB 显色,则切片经过梯度酒精脱水干燥, (二甲苯透明),中性树胶封固;如果用 AEC 显色,则切片不能经酒精脱水,而直接用水性封片剂封片。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 软件进行统计分析,计量数据资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色

正常对照大鼠视网膜结构层次分明,光感受器细胞视杆内、外节排列整齐规则,分界清晰,内、外核层排列紧密,染色均匀,细胞形态规整。模型对照组大鼠视网膜外核层变薄,细胞排列较正常组稀疏,出现较多染色不规则或破碎的细胞核。内外节排列紊乱,分界欠清楚,出现不规则淡染区。高、中、低剂量治疗组:视网膜外核层较模型组增厚,细胞排列致密。

2.2 bax 表达

正常对照组大鼠视网膜感光细胞外核层胞浆内 Bax 阳性物质分布稀疏,含量较少,呈淡黄色细颗粒状,而模型对照组大鼠视网膜细胞均出现棕黄色阳性着色,含量较多,定位于细胞浆,与正常对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。低、中剂量治疗组视网膜外核层棕黄色颗粒较模型对照组有所减少,与模型对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。高剂量治疗组视网膜外核层淡黄色颗粒分布更为稀疏,含量也较少,与模型对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

2.3 Bcl-2 表达的影响

正常对照组大鼠视网膜感光细胞外核层胞浆内 Bcl-2 阳性物质呈淡黄色细颗粒,分布稀疏,含量较少,而模型对照组视网膜细胞浆出现棕黄色阳性着色,含量较多,与正常对照组比比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。低、中剂量组视网膜外核层棕黄色颗粒数量增多,与模型组比较有统计学意义。高剂量组视网膜外核层阳性物质含量明显增多,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 1 Bax 含量表达的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 Comparison of Bax expression levels ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	平均灰度
正常对照组	12	109.22 ± 10.40*
模型对照组	12	71.24 ± 15.54 [▲]
高剂量组	12	129.98 ± 11.31 [▲]
中剂量组	12	112.65 ± 13.83*
低剂量组	12	92.39 ± 7.69 [▲] *

与正常对照组比较, [▲] $P < 0.05$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$.

表 2 大鼠视网膜 Bcl-2 表达的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Comparison of retinal Bcl-2 expression levels ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	平均灰度
正常对照组	12	114.01 ± 3.23*
模型对照组	12	127.26 ± 5.93 [▲]
高剂量组	12	98.85 ± 7.46 [▲]
中剂量组	12	105.01 ± 8.88 [▲]
低剂量组	12	112.65 ± 6.35*

与正常对照组比较, [▲] $P < 0.05$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

随着眼科光学诊疗器械的日益增多, 过强的光源导致的视网膜损伤不断见诸报道. 认识其发病机制和防治方法, 对于减少医源性光损伤是大有益处的. 此外, 视网膜光损伤是研究视网膜变性类疾病的良好动物模型. 文献报道瘀血与光损伤的作用, 祖国医学古籍中有不少类似视网膜光损伤症状的记述, 多归属于“视瞻昏渺”、“目昏”、“视物不真”、“肝风目暗”范畴. 云南省中医院内制剂复方光明胶囊, 为眼科老中医苏藩主任多年临床观察的研究成果, 该药具有活血化瘀, 软坚散结, 通络明目. 药物组成以血竭为君药, 水蛭、土鳖虫、川芎为臣, 地龙为佐, 冰片为使, 以上诸药共凑活血化瘀, 祛瘀明目的功效, 在临床应用多年, 对眼底疾病如视网膜静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变、老年性黄斑变性等有显著疗效^[1]. 彭华等^[2]发现复方光明胶囊对SD大鼠视网膜光损伤后闪光ERG中a、b波振幅的降低有保护作用.

视细胞凋亡是视网膜光损伤的重要机制, 光损伤启动了视细胞凋亡的发生, 外核层细胞核的丢失是视细胞凋亡的结果^[3]. 视网膜光损伤后视网膜形态的改变主要表现为外核层变薄及内外节细胞排列

紊乱. 本实验结果发现, 正常对照组视网膜形态正常, 结构层次清晰, 内外节细胞排列整齐规则, 内外节分界清晰; 模型对照组大鼠视网膜外核层出现较多淡染细胞核, 内外节排列紊乱, 分界欠清, 表明光照后大鼠视网膜外核层光感受器细胞破碎消失, 数量减少. 各剂量组复方光明胶囊中视网膜外核层较模型对照组增厚, 细胞排列致密, 不规则淡染区较模型对照组减少, 表明复方光明胶囊可有效地保护大鼠光损伤后视网膜组织的作用.

Hao 等^[4]发现视网膜光损伤后感光细胞的凋亡至少有两个途径, 强光通过激活视紫红质蛋白引发凋亡, 而低强度光则主要依赖激活转导信号蛋白. 视网膜光损伤中细胞凋亡程序启动, Bax 蛋白是 Bcl-2 家族蛋白促进凋亡的亚家族^[5], Bax 是在研究 Bcl-2 时发现的与 Bcl-2 相关的蛋白, 共有 3 种: bax- α 、bax- β 、bax- γ , 其功能与 Bcl-2 相反. DUNKERN 等^[6]研究发现, 光损伤引起的视网膜细胞的凋亡中有 Bcl-2 基因表达水平的降低. 而 TSANG 等^[7]发现, 抗凋亡基因 Bcl-2 的表达能部分地阻止光感受器细胞的凋亡. Bcl-2 基因及其表达蛋白可抑制多种组织细胞的凋亡, 并延长细胞寿命, 所以被称为凋亡抑制基因, 它可以通过多条途径抑制细胞凋亡.

Bcl-2 基因及其表达蛋白可抑制多种组织细胞的凋亡, 并延长细胞寿命, 所以被称为凋亡抑制基因, 它可以通过多条途径抑制细胞凋亡. 其主要机制可能为: (1) 通过线粒体外膜上的 Bcl-2 蛋白调节线粒体功能; (2) 通过胞质内质网 Bcl-2 蛋白控制钙离子流动; (3) Bcl-2 不直接阻止细胞凋亡, 而是调节促凋亡或坏死的过程; (4) Bcl-2 经 Raf21 信号传导途径发挥作用. 已有相关研究报告中药复方制剂 (滋阴明目丸) 可通过影响 Bcl-2 的表达而抑制视细胞的凋亡^[8].

实验结果表明: (1) 模型对照组 Bax 蛋白表达的平均灰度减少, Bcl-2 灰度值增加, 表明视网膜光损伤后 Bax 蛋白表达增强, 促进细胞凋亡作用减弱, Bcl-2 表达减弱, 有抑制细胞凋亡的作用.

(2) 各剂量组复方光明胶囊使光损伤后大鼠视网膜 Bax 蛋白表达减弱, bcl-2 表达增强, 各剂量组均有作用, 中高剂量组效果更为明显. 通过上述机理诱导细胞凋亡趋势减弱, 达到有效拮抗视网膜光损伤后的光感受器细胞凋亡.

本研究虽然观察到复方光明胶囊对视网膜光损伤有保护作用. 但中药复方的成分较为复杂, 为进一步明确复方光明胶囊对光损伤的作用机理还需要

(下转第 32 页)

K⁺ 内流增加, 从而引发疼痛。而氯胺酮作为 NMDA 受体抑制剂, 其治疗缓解神经病理性疼痛可能的机制是阻断了伤害性刺激引起兴奋性递质对小胶质细胞表面的 NMDA 受体激活, 从而抑制了钙通道, 使钙离子内流减少, 阻断了上传至脊髓的疼痛信号; 另外, 氯胺酮可能直接抑制了脊髓兴奋性递质的释放, 使其对 NMDA 受体的兴奋作用受到抑制, 从而缓解神经病理性疼痛^[8,9]。

总之, 神经病理性疼痛在临床上发病率极高, 发生机制复杂, 临床治疗效果不佳。本研究提示氯胺酮可以明显抑制缓解神经病理性疼痛, 其可能机制是通过抑制小胶质细胞的活化, 抑制了兴奋性递质对 NMDA 受体的激活而缓解了神经病理性疼痛, 这为神经病理性疼痛的治疗提示了新的靶点。

[参考文献]

- [1] SMITH T E, CHONGMS. Neuropathic pain[J]. Hosp Med, 2000, 61: 760 - 766.
- [2] KIM S H, CHUNGM. An experimented model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat[J]. Pain, 1992, 50: 355 - 363.

- [3] HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. Pain, 1988, 32(1): 77 - 78.
- [4] POYHIA R, VAINIO A. Topically administered ketamine reduces capsaicin-evoked mechanical hyperalgesia [J]. Clin Pain, 2006, 22: 32 - 36.
- [5] KUBOTA T, MIYATA A. Successful use of ketamine for intractable burning pain of HTLV-1-associated myelopathy [J]. Pain Symptom Manage, 2005, 30: 397 - 399.
- [6] TSUDA M, INOUE K. Neuropathic pain and ATP receptors in spinal microglia [J]. Brain Nerve, 2007, 59: 953 - 959.
- [7] TSUDA M, TOYOMITSU E, KOMATSU T, et al. Fibronectin/Integrin system is involved in P2X4 receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury [J]. Glia, 2008, 56(5): 579 - 585.
- [8] HEWITT D J. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain [J]. Clin Pain, 2006, 16: 73 - 79.
- [9] 冷玉芳, 白浩, 高翔博. 氯胺酮对神经病理性疼痛大鼠脊髓 P2 × 4 受体 mRNA 表达的影响 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2010, 16(1): 30 - 33.

(2012 - 10 - 10 收稿)

(上接第 17 页)

进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 苏藩, 马力, 孙丽平, 等. 复方光明胶囊治疗视网膜静脉阻塞的临床研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2002, 23(2): 27.
- [2] 彭华. 复方光明胶囊对光损伤 SD 大鼠闪光视网膜电图的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2012, 22(1): 11 - 13.
- [3] 刘学政, 高显会, 萧鸿, 等. 实验性大鼠视网膜光损伤与视细胞凋亡的关系 [J]. 眼视光学杂志, 2002, 4(4): 217 - 221.
- [4] HAO W, WENZEL A, OBIN M S. Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration [J]. Nature genetics, 2002, 32(2): 254 - 260.

- [5] OLTVAIZN, CLMILLIMAN, AND S J. Korsmeyer, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609 - 619.
- [6] DUNKERN T R, BKAINA. Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells [J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(1): 348 - 361.
- [7] TSANG S H. Retarding photoreceptor degeneration in Pd-egtml/Pdegtml mice by an apoptosis suppressor gene [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997, 38(5): 943 - 950.
- [8] 朱惠安, 李传课, 罗耀红, 等. 滋阴明目丸对大鼠光损伤模型视网膜 p53、Bcl-2 及细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2006, 16(2): 96 - 98.

(2012 - 09 - 06 收稿)