

17 β -雌二醇对高氧诱导的大鼠视网膜细胞凋亡的保护作用

范海燕,倪卫杰,施彩虹

作者单位:(201900)中国上海市,上海交通大学医学院附属第三人民医院眼科

作者简介:范海燕,女,上海交通大学医学院在读眼科学硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:倪卫杰,副主任医师,研究方向:眼底疾病诊断及治疗方面的基础和临床研究. niweijie21@sohu. com

收稿日期:2009-01-20 修回日期:2009-02-20

Protective effects of 17 β -estradiol on retinal cell apoptosis caused by hyperoxia

Hai-Yan Fan, Wei-Jie Ni, Cai-Hong Shi

Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Correspondence to: Wei-Jie Ni. Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China. niweijie21@sohu. com

Received: 2009-01-20 Accepted: 2009-02-20

Abstract

• AIM: To explore the protective effects of 17 β -estradiol on the cell apoptosis in retinal ganglion cell layer which is induced by hyperoxia.

• METHODS: Forty-eight 7-day-old SD rats were divided into four groups: normal group, high oxygen group, 17 β -estradiol treatment group and vegetable oil treatment group. Rats of the high oxygen group were put into the environment exposed to 750mL/L oxygen for 5 days and backed to room air for another 5 days to establish the oxygen-induced retinopathy (OIR) model. The treatment group were given 17 β -estradiol by injection with the dose of 0.5 μ L/d (2g/L) before exposed to 750mL/L oxygen. The vegetable oil treatment group is similar to 17 β -estradiol treatment group, but the medicine changed. Ocular cross-sections were prepared for staining of HE and eyeball slicing parallel TUNEL staining. To observe the cell morphology of 4 groups RGCL. And the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) of immunohistochemical staining.

• RESULTS: Part of apoptosis and positive TUNEL staining in 4 groups of mice. The number of TUNEL-positive cells in pure oxygen exposure significantly more than the normal group, estradiol high-oxygen group was significantly less than pure oxygen group and solvent group hyperoxia. Retinal immunohistochemistry iNOS estradiol intervention group with a simple high-oxygen group has significant difference ($P < 0.05$), hyperoxia group and normal control

group has significant difference ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: 17 β -estradiol have protective effects on cell apoptosis caused by hyperoxia in retinal ganglion cell layer. The mechanism may relate with NO.

• KEYWORDS: 17 β -estradiol; apoptosis; retinopathy of prematurity; iNOS

Fan HY, Ni WJ, Shi CH. Protective effects of 17 β -estradiol on retinal cell apoptosis caused by hyperoxia. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(3):447-450

摘要

目的:探讨17 β -雌二醇对高氧诱导的视网膜神经节细胞层(retinal ganglion cell layer, RGCL)细胞凋亡的保护作用并探讨其机制。

方法:7天龄SD大鼠48只随机分为4组,每组12只,分为正常对照组、单纯高氧组、雌二醇高氧组及溶媒高氧组,单纯高氧组于氧浓度750mL/L的容器内饲养5d,再置正常空气下饲养至17天龄,雌二醇高氧组饲养方法同单纯给氧组,在大鼠7~17天龄间每日皮下注射17 β -雌二醇(E2,植物油稀释,配制浓度为2g/L)0.5 μ L/d,溶媒高氧组饲养方法同雌二醇高氧组,药物改为相同体积植物油。眼球切片并行TUNEL染色和HE染色,观察4组RGCL的细胞形态,免疫组化染色观察诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达。

结果:4组小鼠RGCL均见部分细胞凋亡及TUNEL染色阳性,单纯高氧组的TUNEL阳性细胞数显著多于正常组,雌二醇高氧组显著少于单纯给氧组和溶媒高氧组。视网膜免疫组织化学检测雌二醇干预组iNOS与单纯高氧组有统计学差异($P < 0.05$),单纯高氧组与正常对照组有统计学差异($P < 0.05$)。

结论:17 β -雌二醇可较高氧诱导的视网膜细胞凋亡少,机制可能与NO相关。

关键词:17 β -雌二醇;凋亡;早产儿视网膜病变;诱生型一氧化氮合酶

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2009.03.013

范海燕,倪卫杰,施彩虹. 17 β -雌二醇对高氧诱导的大鼠视网膜细胞凋亡的保护作用. 国际眼科杂志 2009;9(3):447-450

0 引言

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是以视网膜新生血管为主要表现的疾病,早产、出生低体重和吸高浓度氧为已知的发病因素,目前的研究发现视网膜细胞凋亡也是其主要损害之一。雌激素是一类维持机体正常生理状态的重要性激素,目前研究发现雌激素对于神经细胞包括视网膜神经节细胞具有保护作用^[1]。我们通过观察各组视网膜神经节细胞层(retinal ganglion cell

layer, RGCL)的细胞形态和 TUNEL 染色,明确雌激素对于高氧诱导的视网膜细胞凋亡的作用,并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 7 天龄 Sprague Dawley (SD) 新生大鼠 48 只(中国科学院上海实验动物中心提供), 17- β 雌二醇(17 β -estradiol) (Sigma 公司, 美国), 原位细胞凋亡检测试剂盒 (Roche 公司, 美国), 氧气分析仪 (梅城电化分析仪器厂, CY-12C), 小鼠抗大鼠诱生型一氧化氮合酶 (iNOS) 多克隆抗体 (Santa cruz 公司, 美国), 即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒和 DAB 染色盒 (武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法 48 只 7 天龄 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 12 只。组 1 (正常组): 幼鼠在正常空气环境下饲养至 17 天龄。组 2 (单纯给氧组): 小鼠置于密闭容器内, 调节氧气流量, 使容器内氧浓度保持在 750 ± 20 mL/L, 在该容器中饲养 5d 至小鼠 12 天龄, 然后置于正常空气环境下饲养至 17 天龄。组 3 (雌二醇干预组): 饲养同组 2, 但在小鼠吸氧前即 7 天龄时行皮下注射雌二醇 (E2, 植物油稀释, 配制浓度为 2g/L) 0.5 μ L/d, 1 次/天, 至小鼠 17 天龄。组 4 (溶媒高氧组): 饲养及给药方法同组 3, 药物改为相同体积的植物油。取各组 17d 幼鼠右眼球, 常规脱水, 石蜡包埋。将蜡块行矢状位连续切片, 片厚 5 μ m, 每个组织块随机取连续切片 3 张行 HE 染色, 观察 RGCL 层的细胞形态和组织结构。凋亡细胞常为单个细胞, 形态特点为细胞体积缩小、染色质致密聚集成斑块状。

1.2.1 TUNEL 染色 眼球行石蜡切片, 常规脱蜡水化, 30mL/L 过氧化氢室温下处理 10min, 蒸馏水洗后加 Proteinase K (0.01mol/L TBS 1:200 新鲜稀释) 于 37 $^{\circ}$ C 下消化 15min, 0.01mol/L PBS 洗后加标记缓冲液 20 μ L, 甩干后将包括阳性对照片在内的每张切片加标记液 20 μ L (TdT 和生物素各 1 μ L, 18 μ L 标记缓冲液), 另取 1 张切片仅加入 20 μ L 标记缓冲液作为阴性对照, 置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中反应 2h, 经封闭液处理后滴加 1:100 稀释的 1mL 抗体稀释液加生物素抗地高辛抗体 10 μ L 混匀液, 置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中反应 30min, 滴加 1:100 稀释链酶亲和素-一过氧化物酶, 混匀后滴加 50 片, 37 $^{\circ}$ C 湿盒中反应 30min, DAB 显色, 观察 RGCL 细胞染色情况, 比较阳性和阴性对照片, 将细胞核中有棕黄色颗粒者判定为阳性细胞。TUNEL 标记后, 由两名非本课题组并且熟悉凋亡细胞形态的实验人员对所有 TUNEL 标记切片进行计数, 首先计数 TUNEL 标记阳性细胞 (细胞核被标记呈棕黑色); 其次结合光镜下细胞形态, 鉴别阳性细胞中凋亡细胞 (符合凋亡细胞形态特征)。

1.2.2 iNOS 免疫组织化学检测 按试剂盒说明进行石蜡切片常规切片脱蜡至水, 滴加 3mL/L 过氧化氢室温孵育 10min, 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 值 6.0) 高压抗原修复 3min, 滴加正常血清封闭液 10min, 滴加 iNOS (工作浓度为 1:50) 一抗工作液 4 $^{\circ}$ C 过夜, 滴加生物素标记山羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 30min, 链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptavidin-biotin peroxidase complex, SABC) 37 $^{\circ}$ C 30min, DAB 显色, 苏木素复染后封片。应用美国 Image-Pro plus 专业图像分析软件对视网膜细胞中 iNOS 的免疫组织化学反应做定量测定: 每只眼球随机抽取 3 张切片, 测其累计吸光度 (A) 并取均值。分析过程中所有切片的放大倍数 ($\times 400$)、光源强度均相同。

统计学分析: 使用 SPSS 13.0 软件对所有数据进行统计学分析。两组间均数比较, 组间两两比较均采用方差分

析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜观察 RGCL 层凋亡细胞的观察: 光镜下正常组 RGCL 细胞形态基本正常, 组 2, 3, 4 的 RGCL 内可见个别细胞呈现凋亡形态, 凋亡细胞表现为细胞体积缩小, 染色质致密聚集成斑块状。

2.2 TUNEL 染色 4 个组每个眼球随机抽取两张切片经 TUNEL 技术染色后, 在光学显微镜下见 RGCL 部分细胞的细胞核呈棕黄色颗粒, 即阳性细胞 (图 1A ~ D)。组 1, 2, 3, 4 平均每个眼球切片的阳性细胞数分别是 1.11, 9.60, 3.60, 9.50, 其差异有统计学意义 (P = 0.000), 单纯给氧组较正常组凋亡阳性细胞数显著增多 (P = 0.000), 雌二醇干预组显著少于单纯给氧组 (P = 0.000) 和植物油给氧组 (P = 0.000), 植物油组与单纯高氧组之间没有统计学差异 (P = 0.999)。

2.3 免疫组化结果 正常组 (图 2A) 17 天龄大鼠 iNOS 在视网膜各层几乎没有表达, 高氧组 (图 2B) 和植物油组 (图 2D) 在视网膜各层呈强阳性表达, 雌二醇干预组 (图 2C) 呈弱阳性表达, 主要位于神经纤维层、神经节细胞层、内丛状层以及外丛状层。对各组 iNOS 的免疫反应程度 A 测定结果为: 正常组 2033 ± 1177 , 单纯高氧组 5692 ± 3863 , 雌二醇干预组 2291 ± 1303 , 高氧溶媒组 5143 ± 2395 , 正常组 iNOS 表达与单纯高氧组有统计学差异 (P = 0.014), 雌二醇干预组与高氧对照组具有显著统计学差异 (P = 0.017), 溶媒组与高氧组的差异没有统计学意义 (P = 0.682)。

3 讨论

1980 年以后, 随着医疗护理技术的不断提高及新生儿重症监护病房 (NICU) 的建立, 早产儿的存活率随之不断提高。早产低体重儿由于呼吸系统发育不成熟, 通气和换气功能障碍, 生后给予一定量的氧气吸入才能提高血氧浓度, 减少脑缺氧, 维持生命, 然而国内外学者的研究证明持续大流量的吸氧可以引起视网膜细胞的凋亡加速^[2]。雌激素是一类维持机体正常生理状态的重要性激素, 包括天然雌激素和人工合成雌激素两大类。天然雌激素为甾体类激素, 包括雌二醇 (est radiol, E2)、雌三醇 (estriol, E3) 和雌酮 (estrone, E1); 人工合成雌激素为非甾体类激素, 但主要结构类似断裂的甾体结构, 仍然有明显雌激素样作用, 主要有乙烯雌酚和氯烯雌酚等。下丘脑分泌促性腺激素释放激素, 调节垂体释放促卵泡生成素和黄体生成素, 调节卵巢释放雌激素和孕激素 (在男性为睾丸产生的睾酮); 同时雌激素和孕激素又负反馈作用于下丘脑和垂体, 共同维持人体性激素水平的相对稳定。近年研究发现雌激素受体除了分布于性器官外, 在眼组织中也有明显分布, 尤其是视网膜和葡萄膜^[3,4]。其作用除了一般生理作用外, 还通过 VEGF 调控新生血管生成, 通过雌激素受体调控一氧化氮的基础释放以及降低炎症反应程度和缺血再灌注组织的损伤。雌激素在体内通过与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 结合而发挥生理功能, ER 有 ER- α , ER- β 两种亚型。ER- α 主要分布在年轻女性的视网膜神经感觉层和视网膜色素上皮细胞层, 在男性和绝经后女性视网膜神经感觉层和视网膜色素上皮细胞层中分布却很少^[2,3]; 而 ER- β 主要分布在视网膜神经节细胞层和脉络膜。细胞凋亡是生理性或某些因素诱发的程序化的细胞死亡, 凋亡过程受基因调控, 有着一系列形态和生化改变, 特征性的是细胞核 DNA 被核酸内切酶降解, 产

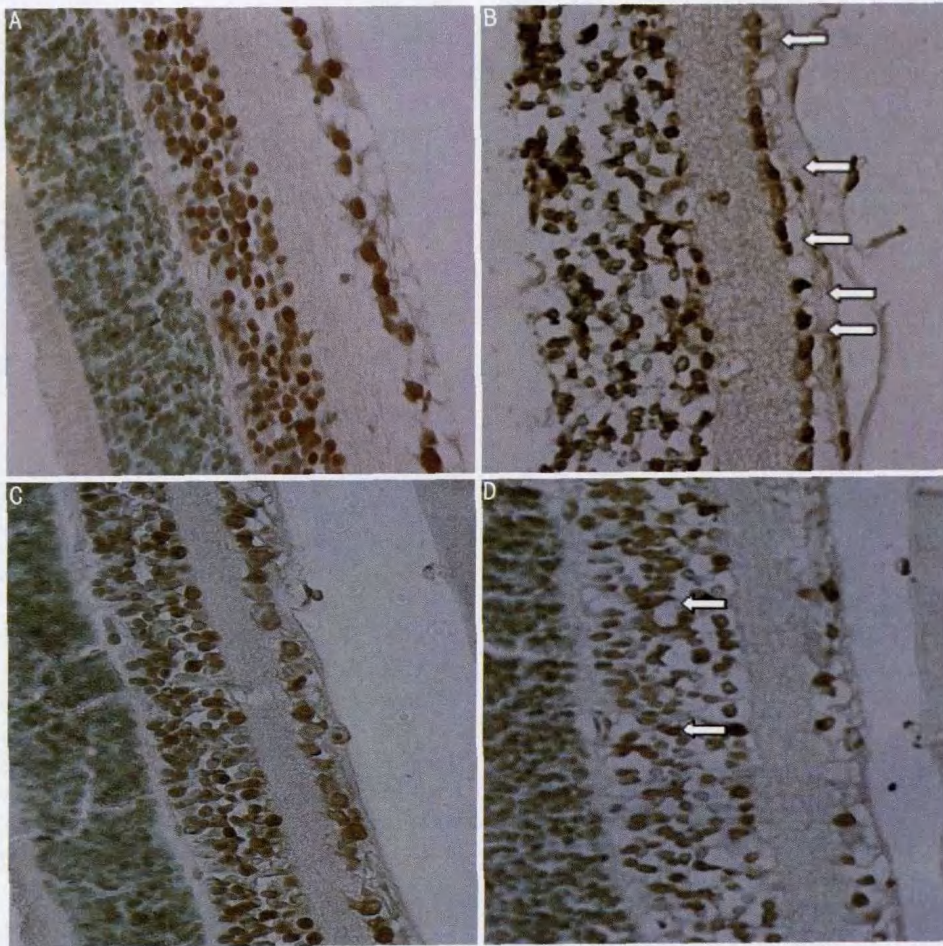


图1 大鼠 RGCL 细胞(TdT 标记,TUNEL ×400) A:正常组;B:高氧组;C:干预组;D:溶媒组

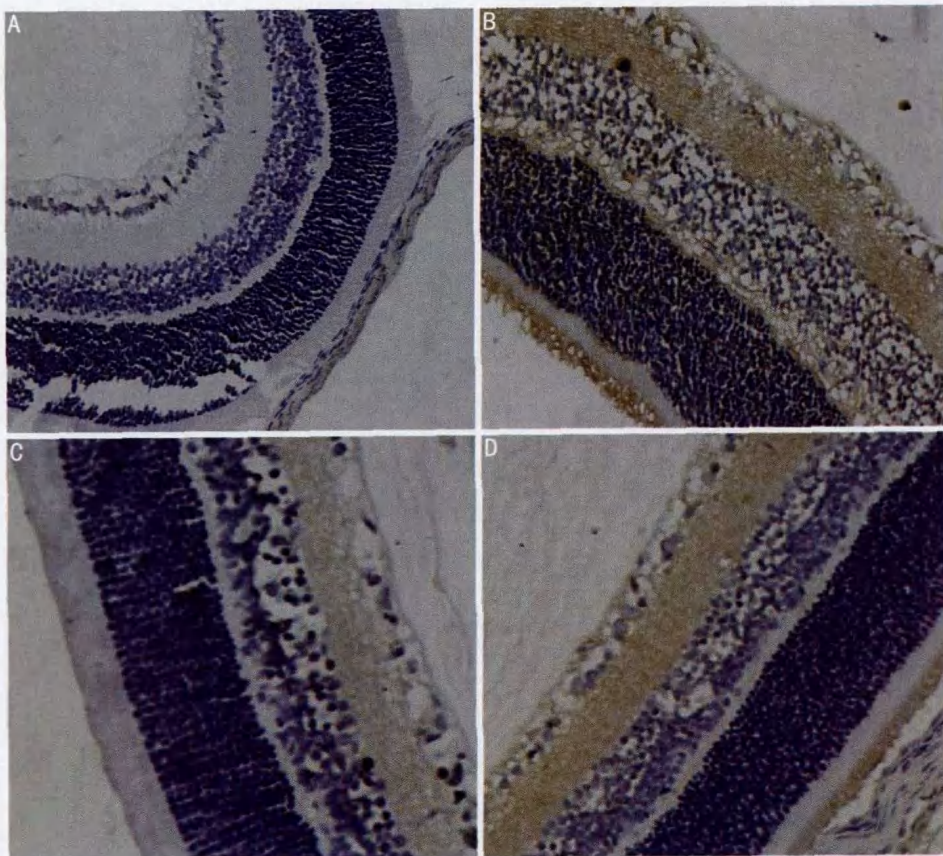


图2 大鼠视网膜 iNOS 表达(SABC ×400) A:正常组;B:高氧组;C:雌二醇干预组;D:溶媒组

生大小为180~200个碱基对整数倍的寡核苷酸片段,可被TUNEL技术特异性标记,表现为细胞核的棕黄色染色。Sennlaub等^[5]发现,ROP小鼠视网膜的内核层存在显著的细胞凋亡,Brafman等^[6]发现缺氧诱导因子相关的基因缺失能引起视网膜内核层细胞凋亡数目的显著减少,在本研究中通过吸入高氧的方法建立早产儿视网膜病变模型,通过对ROP小鼠视网膜TUNEL染色观察,发现单纯高氧组的RGCL中有一定数目的细胞呈现特征性的凋亡改变,较正常组显著增多,而雌二醇干预组的凋亡细胞数目较单纯给氧组明显减少。RGCL层的细胞主要为视网膜神经节细胞和苗勒氏细胞,视网膜神经节细胞是青光眼、眼外伤等神经退行性病变的主要损伤细胞,它的死亡常导致视功能的不可逆性损害^[7],凋亡的细胞具体是何种细胞尚需要进一步的实验来证明。视网膜细胞凋亡的机制可能与NO毒性作用有关。NO是一种血管内皮舒张因子,过量的NO可与线粒体释放的超氧化物阴离子反应生成过氧化亚硝基阴离子,并进一步分解成OH⁻,OH⁻等氧自由基产物,氧化蛋白质的巯基,引起DNA的损伤,使线粒体电子传递受阻,导致细胞能量代谢障碍^[8]。另外Taylor等^[9]和Brune^[10]研究发现,NO激活千道尔顿核小体激酶信号通路促进细胞发生凋亡。NOS是NO合成的限速酶,是调节NO的最重要环节。Brooks等^[11]研究显示,内皮细胞产生的NO与ROP的眼底病变程度有关,去除NOS的小鼠或NOS被抑制后,小鼠的视网膜血管闭塞及玻璃体新生血管形成减少,ROP严重程度减轻。NOS有3种类型即内皮细胞型(eNOS)、神经元型(nNOS)和细胞因子诱导型(iNOS),前两者通常在生理情况下起作用,iNOS在某些诱导因素(如缺血缺氧)存在时表达,发挥细胞毒性作用,参与自身免疫病理损害^[12],Sennlaub等^[13]发现,缺血性视网膜病变内核层的细胞凋亡同诱导性一氧化氮合成酶(iNOS)的表达密切相关。在本实验中,单纯给氧组iNOS的表达较正常组增高,而雌激素干预组较单纯给氧组iNOS表达减弱,说明雌激素可以通过抑制iNOS的合成,减少NO的表达,从而减轻NO对视网膜细胞的损伤。而Huang等^[14]研究发现,雌激素可通过血管内皮细胞上的雌激素受体(ER),促进NO的基础释放。我们认为两者之间的结果差异可能与是否有诱导NOS活化的细胞因子存在和雌激素作用于不同的受体亚型有关,其具体机制有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Zhou X, Li F, Ge J, et al. Retinal Ganglion Cell Protection by 17-beta-Estradiol in a Mouse Model of Inherited Glaucoma. *Dev Neurobiol* 2007; 67(5):603-616
- 2 Yang C, Lafleur J, Mwaikambo BR, et al. Lysophosphatidic acid receptor (LPA1) mediates oxygen-induced retinal ganglion cell degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; Epub ahead of print
- 3 Kobayashi K, Kobayashi H, Ueda M, et al. Estrogen receptor expression in bovine and rat retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(11): 2105-2110
- 4 Trotter A, Maier L, Kohn T, et al. Growth of the uterus and mammary glands and vaginal cytologic features in extremely premature infants with postnatal replacement of estradiol and progesterone. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186(2):184
- 5 Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O. Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *J Neurosci* 2002;22(10):3987-3993
- 6 Brafman A, Mett I, Shafir M, et al. Inhibition of oxygen-induced retinopathy in RTP801-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(10):3796-3805
- 7 陆士恒,柳林. 视网膜神经节细胞保护的药物治疗. 国际眼科杂志 2008;8(3):568-570
- 8 Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(16):7162-7166
- 9 Taylor EL, Megson IL, Haslett C, et al. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death and Differ* 2003;10: 418-430
- 10 Brune B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it on? *Cell Death and Differ* 2003;10:864-869
- 11 Brooks SE, Gu X, Samuel S, et al. Reduced severity of oxygen induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:222-228
- 12 Wang R, Ghahary A, Shen YJ, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997;108:438-444
- 13 Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O. Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *J Neurosci* 2002;22(10):3987-3993
- 14 Huang A, Sun D, Koller A, et al. 17beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. *Circulation* 2000;101:94-100