

塞来昔布对糖尿病大鼠视网膜凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达的影响

李仕永,周占宇,刘 斐

作者单位:(266000)中国山东省青岛市,青岛大学医学院附属医院眼科

作者简介:李仕永,男,硕士。

通讯作者:周占宇,男,硕士研究生导师,副主任医师. zhouzhanyu1125@163.com

收稿日期:2010-06-07 修回日期:2010-07-30

Effect of celecoxib on the expression of inhibitor of apoptosis protein Bcl-2 in rats with experimental diabetes mellitus

Shi-Yong Li, Zhan-Yu Zhou, Fei Liu

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Correspondence to: Zhan-Yu Zhou. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China. zhouzhanyu1125@163.com

Received: 2010-06-07 Accepted: 2010-07-30

Abstract

• AIM: To investigate the effect of celecoxib on the inhibitor of apoptosis protein Bcl-2 in retinas of early diabetic rats.

• METHODS: Forty Wistar rats were used to establish diabetic models by intraperitoneal injecting with streptozotocin, and divided into diabetes mellitus group ($n=20$) and celecoxib group ($n=20$), ten else rats were in normal control group. All of the rats were executed 3 months later. Immunohistochemistry and computer-picture analytic system were used to observe the expression of Bcl-2 protein in retinas of rats.

• RESULTS: The expression of Bcl-2 in normal group was higher than that of celecoxib group and lower than that of diabetes mellitus group (all $P < 0.01$).

• CONCLUSION: Celecoxib can inhibit the expression of Bcl-2 in retina of diabetes mellitus.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; inhibitor of apoptosis protein Bcl-2; celecoxib

Li SY, Zhou ZY, Liu F. Effect of celecoxib on the expression of inhibitor of apoptosis protein Bcl-2 in rats with experimental diabetes mellitus. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(9):1672-1674

摘要

目的:探讨塞来昔布对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达的影响。

方法:将 40 只 Wistar 大鼠用链脲佐菌素(STZ) ip 制成

DM 大鼠模型,随机分成 DM 组($n=20$)和塞来昔布灌胃(celecoxib group, Cel)组($n=20$)。另 10 只正常大鼠为正常对照组(contrast group, Con)。3mo 后处死全部大鼠,制备大鼠视网膜石蜡切片,应用免疫组化法及 HP IAS-1000 型高清晰度彩色病理图文分析系统观测大鼠视网膜 Bcl-2 的表达。

结果:Con 组 Bcl-2 反应阳性弱,表达量低;DM 组 Bcl-2 反应呈强阳性,表达增高($P < 0.01$);Cel 组 Bcl-2 反应阳性减弱,表达降低($P < 0.01$)。

结论: Cel 能够减少 STZ 诱导的 DM 大鼠视网膜凋亡抑制 Bcl-2 蛋白表达。

关键词:糖尿病视网膜病变;凋亡抑制蛋白 Bcl-2;塞来昔布

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.010

李仕永,周占宇,刘斐.塞来昔布对糖尿病大鼠视网膜凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达的影响.国际眼科杂志 2010;10(9):1672-1674

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最常见和严重的眼部并发症,已成为目前世界上主要的致盲眼病之一,早期预防和治疗 DR 是当前眼科领域攻关的重要课题。视网膜新生血管的出现是 DR 最早出现的特异性改变,视网膜新生血管通常由视网膜毛细血管周细胞凋亡抑制所致。已有充分研究表明,在 DM 大鼠视网膜中 COX-2 表达含量常显著增高^[1]。实验证明,塞来昔布(celecoxib, Cel)作为新型的特异性 COX-2 抑制剂,通过抑制 COX-2 的活性抑制视网膜 VEGFmRNA 的表达,引起视网膜细胞合成 VEGF 蛋白减少^[2]。血管内皮生长因子(VEGF)是内皮细胞(endothelial cell, EC)的存活因子,它阻止了缺血诱导的细胞凋亡并且能诱导 EC 表达凋亡抑制蛋白 Bcl-2,从而参与毛细血管的凋亡过程 DR 病理变化,并在视网膜新生血管的发生发展过程中起着重要作用。利用选择性的 COX-2 抑制剂可使 VEGF 和 bFGF 等多种促血管生成因子的表达降低,下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达从而阻断这些模型中的新生血管生成。我们探讨选择性 COX-2 抑制剂-Cel 对链脲佐菌素(STZ)诱导的早期 DM 大鼠视网膜中 Bcl-2 表达情况。应用免疫组化法及彩色病理图文分析系统观测在不同处理因素下 DM 大鼠视网膜 Bcl-2 的表达,以探讨 Cel 对 DM 大鼠视网膜凋亡蛋白 Bcl-2 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年无眼疾的 Wistar 大鼠 40 只由青岛大学医学院实验动物中心提供,雌雄不限,体质量 210 ~ 320g。饲养于标准化饲养房。一次性 ip STZ(德国 Boehringer Mannheim 公司) 55mg/kg。另 10 只大鼠分为正常对照组(contrast group, Con),每只 ip 等体积枸橼酸盐溶液。注射

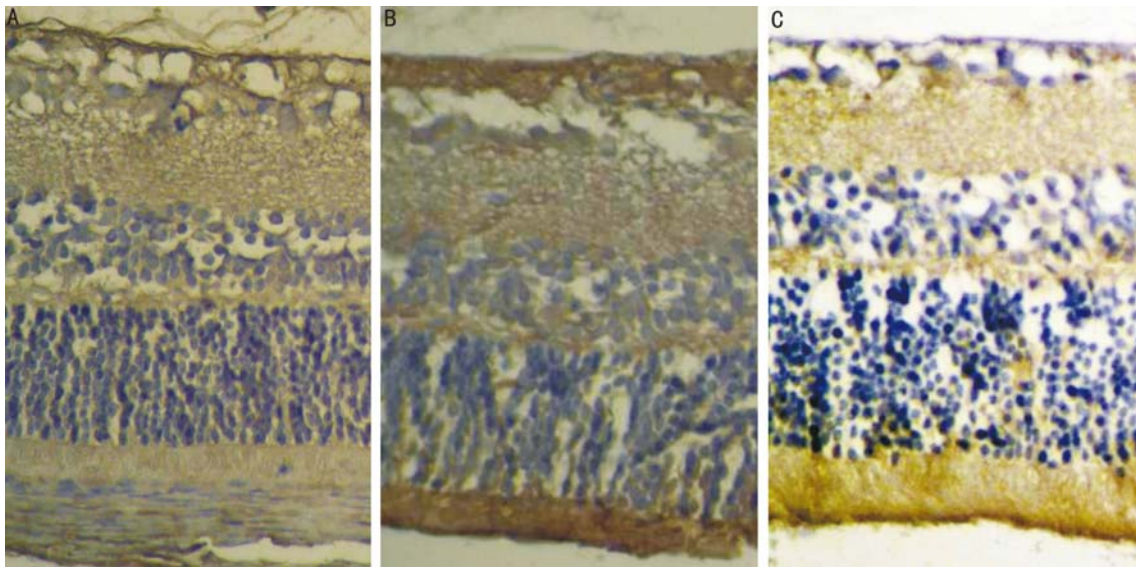


图1 Bcl-2 凋亡抑制蛋白的表达 A:Con 组;B:DM 组;C: Cel 组。

STZ 24~48h 检测尿糖(+++)以上,72h 后取尾血测血糖 $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 者确定为 DM 大鼠。模型建立后每周监测 1 次定性尿糖、体质量、24h 尿量和饮水量,每月检测 1 次血糖。DM 大鼠随机分为 DM 组和 Cel 灌胃组,每组 20 只。DM 模型建立 2d 后,Cel 灌胃组大鼠经口灌胃 Cel 50mg/kg, 2 次/d,DM 组灌胃等体积生理盐水。各组大鼠单笼喂养,自由进食、饮水。饲养 3mo。除去死亡及血糖恢复正常大鼠,最终每组 15 只入组。

1.2 方法 喂养 3mo 末,以过量戊巴比妥钠麻醉处死大鼠,轻摘左眼球,放入预先配置的 40g/L 中性甲醛溶液中。将各组大鼠的右侧眼球,也固定于 40g/L 多聚甲醛液中(4℃,12h)。于锯齿缘后 0.15mm 处剪开眼球壁,去除眼前节和玻璃体,余下的眼杯进行全层石蜡包埋,制作 5~7 μm 切片。以微波处理 10min (95℃);30mL/L H_2O_2 -700mL/L 甲醇室温处理 30min;30mL/L 正常小牛血清室温孵育 30min;抗 Bcl-2 抗体即一抗(Santa Cruz, USA, 为多克隆抗体,浓度各为 1:150),湿盒内 4℃ 孵育 20h;生物素标记的羊抗兔血清即二抗(Vector Laboratory, USA) 1:200,湿盒内 37℃ 孵育 1h;卵白素 2 生物素即 ABC 复合物(Vector Laboratory, USA)湿盒内于 37℃ 孵育 1h;DAB 呈色,显微镜下监视反应,约 10min,以蒸馏水停止反应。苏木素复染梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照:以正常小牛血清代替一抗,其余步骤同上。随机选取 Con 和 Cel 及 DM 各组视网膜切片 3 张,每张切片随机取 5 个视野,应用 HP IAS-1000 型图像分析系统测定 Bcl-2 在视网膜血管的免疫反应强度(平均黑度)计算阳性信号平均灰度值,用阳性产物的灰度值来表示免疫反应表达程度。

统计学分析:采用统计学软件包 SPSS 13.0。所测数据行方差分析和 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在 Con 组 Bcl-2 阳性反应仅出现于节细胞层、内网层、内核层和外网层的血管,反应较弱多呈浅棕黄色;DM 组除血管的阳性染色加深外色素上皮细胞亦出现强阳性反应,呈深棕黄色;而 Cel 灌胃组 Bcl-2 免疫阳性仅见神经节细胞胞质中,阳性细胞数明显少于 DM 组,且较正常对照组减少(图 1)。大鼠视网膜血管 Bcl-2 表达强度(灰度)Con 组为 138.8 ± 8.5 , DM 组 168.9 ± 7.5 , Cel 灌胃组为

124.2 ± 7.0 。可见 Cel 使 Bcl-2 免疫阳性反应明显减低($q = 17.5002, P < 0.01$);DM 组较 Con 组则明显增高($q = 25.9887, P < 0.01$)。

3 讨论

DR 是糖尿病的主要并发症之一,几乎所有 DM 病程达 10a 以上的患者均出现一定程度的 DR,也是成人失明的主要原因之一。DM 可引起视网膜缺氧,视网膜感光层受损^[3]。其中因毛细血管周细胞丧失而最终形成视网膜新生血管是 DR 最早出现的特征性改变,其性质为细胞凋亡。对动物模型的研究可以观察不同病程的细胞凋亡情况,周细胞的凋亡,这可能是引起新生血管形成和增生性糖尿病视网膜病变的重要因素之一。在 DR 早期通过各种相关的抑制因素使细胞凋亡得到控制,也就意味着从根本上控制了 DR 的发生和发展。因此对有关抑制细胞凋亡的基因、各种因子以及药物的研究也就成了热点课题。目前为止发现多种与凋亡有关的基因,并将其分为两大类:生存基因和凋亡基因。Bcl-2 基因是凋亡基因最具代表的一种,在细胞凋亡中所起的作用较为肯定。体外实验显示 Bcl-2 抑制凋亡的发生,研究证明 Bax 是 Bcl-2 的同源性蛋白,在细胞凋亡中所起的作用却相反。两种基因之间的比例决定了细胞的命运是生存还是凋亡。生存基因中最具代表性的为 Bcl-2。Bcl-2 基因首先在人淋巴瘤瘤转位上发现,随后的研究表明是正常的细胞调节基因,在神经细胞等正常组织细胞中广泛表达。基因编码的蛋白质属膜蛋白 26kD 主要位于核膜、线粒体膜及内质网膜上。在细胞凋亡中所起的作用较为肯定,体外实验显示, Bcl-2 抑制凋亡的发生。它通过阻断细胞凋亡信号传导系统的最后共同通路而抑制凋亡,从而避免细胞死亡。它对视网膜周细胞和内皮细胞的凋亡抑制作用已在动物实验中得到证实。

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)又名前列腺素内过氧化物合成酶,是前列腺素合成的限速酶,它能将花生四烯酸催化合成各种前列腺素产物,后者参与维持机体各种生理和病理过程,包括炎症、损伤、修复、新生血管的生成及肿瘤的生长和转移^[4]。缺血引起的视网膜新生血管是许多眼底疾病如 DR、早产儿视网膜病变(ROP)、视网膜静脉阻塞(RVO)等的主要病理特征之一。COX-1 在视网

膜新生血管发生发展中起重要作用。Cel 是一种新型的非甾体抗炎药,能够独特的抑制与基础表达的环氧化酶类物质的合成,抑制炎症部位的前列腺素合成,下调 VEGF 的表达可能抑制视网膜新生血管形成。大鼠发生 DM 后可引起前列腺素和血栓素等炎症介质增高^[5]。这些炎症介质直接参与了眼底炎症反应症状的产生,如血管扩张、血流改变、液体渗出、血浆蛋白产生及血小板沿视网膜血管壁的聚集。由于视网膜长期暴露于高血糖水平,COX-2 表达含量增加,随之 COX-2 代谢途径的产物-前列腺素增加。前列腺素是血管形成前因子,与血管高通透性及新生血管生成相关。前列腺素在 DM 大鼠视网膜中表达含量增加 40% 左右,前列腺素增加及氧化应激反应均可导致 VEGF 表达上调,COX-2 的过度表达与 VEGF 表达增加及新生血管生成密切相关。其中 PGE2 表达增加而引起白细胞介导的血管内皮细胞的损伤^[6]。血小板、白细胞聚集和内皮细胞损伤导致视网膜组织缺血、缺氧和新生血管形成。并且通过电镜观察发现 DM 组大鼠视网膜发生了严重的内皮细胞病理改变,可见在 DR 早期细胞超微结构和分泌功能就发生了改变。

通过选择性的 COX-2 抑制剂和下游的前列腺素受体抑制剂可能阻断这些模型中的新生血管生成。而 COX-2 抑制剂也可使 VEGF, bFGF, TGF 等多种促血管生成因子的表达下降。有良好的证据显示在活体内 VEGF 能启动动脉、静脉、淋巴管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 的生长,是 EC 的存活因子,它阻止了缺血诱导的细胞凋亡并且能诱导 EC 表达凋亡抑制蛋白 Bcl-2 和 A1。由此可见,VEGF, Bcl-2 表达,形成延续反应的复杂的调节环路,因此阻断 COX-2 在视网膜病变中的用,减少 VEGF 的产生,下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达,进而抑制血管凋亡影响 DR 的发生和发展。我们应用免疫组化及计算机图像分析方

法发现相对于 Con 组和 DM 组 Cel 能够减少 STZ 诱导的 DM 大鼠视网膜凋亡抑制 Bcl-2 蛋白表达。本实验结果表明, Cel 能够下调 STZ 诱导的 DM 大鼠视网膜凋亡抑制 Bcl-2 蛋白表达,说明 Cel 有改善视网膜血循环的功能。我们推测 Cel 是通过抑制 COX-2 的活性,抑制炎症介质的产生,减少液体渗出,抑制血小板的聚集,抑制黏附分子减少 VEGF 的产生,而进一步下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2。

总之, Cel 对 DM 大鼠凋亡的影响,对于人类应用选择性 COX-2 抑制剂治疗早期 DM 提供一定的理论基础。为临床防治 DR 提供了希望,随着细胞凋亡研究的不断深入和各种技术手段的提高,选择性 COX-2 抑制剂与 DR 及细胞凋亡之间的关系逐渐显露。利用细胞凋亡的调控机制,延缓或逆转细胞凋亡,以达到从根本上防治 DR 的目的是很有可能的。

参考文献

- 1 Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP, *et al.* Effect of cyclosporin-A on the blood-retinal barrier permeability in streptozotocin induced diabetes. *Mediat Inflamm* 2000;9(5):243-248
- 2 付金玲,王桂云,隋桂琴,等. 塞来昔布对实验性糖尿病大鼠早期视网膜病变的影响. *中国老年学杂志* 2008;28(9):858-860
- 3 Moore P, El-sherbeny A, Roon P, *et al.* Apoptosis cell death in the mouse retinal ganglion cell layer is induced *in vivo* by the excitatory amino acid homocysteine. *Exp Eye Res* 2001;73(1):45-57
- 4 高媛,张明昌. 环氧化酶-2 与眼部疾病的关系. *国外医学眼科学分册* 2005;29(4):245-248
- 5 Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 2004;79(2):275-285
- 6 Yanni SE, Barnett JM, Clark ML. The role of PGE2 receptor EP4 in pathologic ocular angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(11):5479-5486