• 929 •

姜黄素对大鼠视网膜缺血/再灌注损伤时 内质网应激的影响

彭栋梁 王晓娜 杨 军

(河南中医药大学第三附属医院麻醉科,郑州,450003)

摘要 目的:探讨姜黄素对大鼠视网膜缺血/再灌注损伤(RIRI)时内质网应激(ERS)的影响。方法:选取清洁级 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠96只,采用随机数字表法分为3组(n=32);对照组(C组)、缺血/再灌注组(I/R组)和姜黄素组 (CUR 组)。I/R 组和 CUR 组采用前房灌注法使眼内压升高而制备大鼠 RIRI 模型,缺血 60 min,再灌注 24 h 后结束实验。 于缺血前 60 min 时, CUR 组腹腔注射姜黄素 100 mg/kg, C 组和 I/R 组腹腔注射等容量生理盐水。各组于再灌注 24 h 时 处死8只大鼠,取视网膜组织,光镜下观察病理学改变;采用 TUNEL 法检测视网膜组织细胞凋亡情况并计算凋亡指数 (AI)。3 组于再灌注 24 h 时处死 8 只大鼠, 取视网膜组织, 电镜下观察大鼠视网膜组织超微结构改变。3 组于再灌注 24 h 时处死 8 只大鼠,取视网膜组织,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测大鼠视网膜组织中 CCAAT 增强子结合蛋白 (C/EBP)同源蛋白(CHOP)、活化的转录因子4(ATF4)和X-盒结合蛋白-1(XBP1)mRNA 表达。3 组于再灌注24 h 时处死 8 只大鼠,取视网膜组织,蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测大鼠视网膜组织中、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X蛋白(Bax)及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(caspase-3)的蛋白表达,计算Bcl-2/Bax比值。结果:与C组比较,I/ R 组大鼠视网膜组织 XBP-1、ATF4 和 CHOP mRNA 表达明显上调(P<0.05): 与 I/R 组比较, CUR 组大鼠视网膜组织 XBP-1、ATF4 和 CHOP mRNA 表达明显下调(P<0.05)。与C组比较, I/R 组大鼠视网膜组织 CHOP、Bax 和 caspase-3 蛋白 表达升高,Bel-2 蛋白表达及 Bel-2/Bax 比值均下降,与 C 组比较,差异均有统计学意义(P<0.05), CUR 组大鼠视网膜组 织 CHOP、Bax 和 caspase-3 蛋白表达下降, Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值均升高, 与 I/R 组比较, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。与C组比较,I/R组大鼠视网膜组织出现形态结构及超微结构损伤,AI值升高(P<0.05)。与I/R组比较, CUR 组大鼠视网膜组织形态结构及超微结构损伤均减轻, AI 值降低(P<0.05)。结论:姜黄素可减轻大鼠 RIRI, 其机制 可能与抑制 ERS 介导的细胞凋亡有关。

关键词 姜黄素;CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白;活化的转录因子4;X-盒结合蛋白-1(XBP1);内质网应激;细胞凋亡; 再灌注损伤;视网膜

Effect of Curcumin on Endoplasmic Reticulum Stress during Retinal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

Peng Dongliang, Wang Xiaona, Yang Jun

(Department of Anesthesiology, the Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China) Abstract Objective: To investigate the effect of curcumin on endoplasmic reticulum stress (ERS) retinal ischemia/reperfusion injury (RIRI) in rats. Methods: A total of 96 Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into normal control group (C group), ischemia/reperfusion group (I/R group) and curcumin group (CUR group), with 32 rats in each group. The rat model of RIRI was established by using anterior chamber eannulation to elevate intra-ocular pressure above systolic pressure for 60 minutes, and the test was finished after 24 h for reperfusion. Curcumin (100 mg/kg) was injected into the abdominal cavity 60 min before ischemia in CUR group, and the same dose of 0.9% normal saline was injected into the abdominal cavity at the same time points in C group and I/R group, respectively. In order to take the retinal tissue of rats, I/R model was established successfully and then eight rats were sacrificed 24 h after reperfusion, the changes of pathology of retinal tissue of rat were observed after conventional hematoxylin-eosin (HE) staining, and the cell apoptosis was detected by TUNEL method and the apoptosis index (AI) of retinal ganglion was calculated. Eight rats were sacrificed 24 h after reperfusion and retinal tissue was collected, and the ultrastructural changes of retinal tissue of rats were observed by transmission electron microscope. Eight rats were sacrificed 24 h after reperfusion and retinal tissue was collected, and the expressions of CCAAT-enhancer binding protein homologous protein (CHOP), activation of transcription factors (ATF4) and X-4 box binding protein 1 (XBP1) mRNA in retinal tissue were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Eight rats were sacrificed 24 h after reperfusion and retinal tissue was collected, and the expressions of CHOP, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (caspase-3) proteins in retinal tissue were measured by Western Bolt, and the ratio of Bcl-2 to Bax was calculated. Results: Compared with C group, the expressions of XBP1, ATF4 and CHOP mRNA of retinal tissue were significantly increased (P < 0.05) in L/R group. Compared with L/R group, the expressions of XBP1, ATF4 and CHOP mRNA of retinal tissue were significantly decreased (P < 0.05) in CUR group. Compared with C group, the expressions of CHOP, Bax and caspase-3 proteins were significantly higher (P < 0.05), while the expression of Bcl-2 protein and the ratio of Bcl-2 to Bax were both lower (P < 0.05) in L/R group. Compared with L/R group, the expressions of CHOP, Bax and caspase-3 protein were significantly lower (P < 0.05), while the expressions of CHOP, Bax and caspase-3 protein were significantly lower (P < 0.05), while the expression of Bcl-2 to Bax were both higher (P < 0.05) in CUR group, the expressions of CHOP, Bax and caspase-3 protein were significantly lower (P < 0.05), while the expression of Bcl-2 to Bax were both higher (P < 0.05) in CUR group, the expression of Bcl-2 to Bax were both higher (P < 0.05) in CUR group, the expression of Bcl-2 to Bax were both higher (P < 0.05) in CUR group, the expression of Bcl-2 to Bax were both higher (P < 0.05) in CUR group, the structure of Bax were both higher (P < 0.05) in CUR group, the structure of retinal tissue of rats were more significantly injured, and AI was higher (P < 0.05) in L/R group, the injuries of the structure and the ultrastructure of retinal tissue of rats were distinctly alleviative, and AI was lower (P < 0.05) in CUR group. **Conclusion**: Curcumin can significantly reduce RIRI in rats, and the mechanism may be related to alleviate ERS related cell apoptosis of retina.

Key Words Curcumin; CCAAT-enhancer binding protein homologous protein; Activation of transcription factors; X-4 box binding protein 1; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis; Ischemia/reperfusion; Retina
中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673 - 7202.2018.04.035

视网膜缺血/再灌注损伤(Retinal Ischemical Reperfusion Injury, RIRI) 是临床常见的眼科疾病之 一,主要发生于青光眼、糖尿病视网膜病变、缺血性 视神经病变、增殖性视网膜病变、视网膜中央动静脉 栓塞、视网膜血管性疾病、新生儿视网膜病变、视神 经病变等眼部疾病,是眼科临床诊疗工作中常见的 视网膜病理过程,表现为血液再通后视网膜损伤严 重,视功能反而进一步下降。因此,临床上有必要探 讨其有效的防治措施。姜黄素是一种从姜科植物姜 黄等的根茎中提取出的黄色色素,为酸性多酚类物 质,具有抗炎、抗氧化等药理作用^[1]。有研究表明, 姜黄素可减轻大鼠 RIRI,作用机制与其抑制炎性反 应及细胞凋亡等有关^[2-3]。但姜黄素抑制细胞凋亡 的机制仍未明确。因此,本实验采用大鼠 RIRI 模 型,观察内质网应激(ERS)及视网膜细胞凋亡,并给 予姜黄素进行干预,探讨该药对大鼠 RIRI 的影响及 其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

 1.1.1 动物 C57BL/6 雄性大鼠 96 只,8 周龄,体 重 20~24 g,购自南京大学模式动物研究所,饲养于 恒温恒湿、12 h光照/12 h黑暗的环境,自由摄食和 饮水。

 1.1.2 药物 姜黄素(美国 Sigma-Aldrich 公司,批 号:C7727),生理盐水(石家庄四药有限公司),托吡 卡胺(武汉五景药业有限公司),氯霉素滴眼液(长 春迪瑞制药有限公司)。

1.1.3 试剂与仪器 逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒 [宝生物工程(大连)有限公司],CCAAT 增强子结 合蛋白(C/EBP)同源蛋白(CHOP)、活化的转录因 子4(ATF4)和 X-盒结合蛋白-1(XBP1)及甘油醛-3磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列(生工生物工程(上 海)股份有限公司),原位细胞凋亡检测试剂盒(德 国罗氏公司),CHOP、B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、 Bcl-2相关X蛋白(Bax)及含半胱氨酸的天冬氨酸 蛋白水解酶3(caspase-3)一抗及GAPDH一抗(美国 CST公司),二抗工作液(辣根过氧化物酶偶联山羊 抗兔免疫球蛋白G,IgG,中国碧云天生物技术研究 所),其余均为市售分析纯。显微手术器械(苏州 66 视觉医疗器械厂),眼科显微镜(德国蔡司公司), T110TM型聚合酶链式反应(PCR)仪、680型全自动 酶标仪及电转仪和电泳仪(美国 BIO-RAD 公司), Powerlab系统(澳大利亚 AD Instruments 公司), BX51荧光显微镜、BX-50型光学显微镜(日本 Olympus 公司),Hitachih-7000FA 透射电镜(日本日立公 司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 采用随机数字表法分为3 组:对照组(C组)、缺血/再灌注组(L/R组)和姜黄 素组(CUR组),每组32只。模型制备方法如下:腹 腔注射1.5%戊巴比妥钠100 mg/kg麻醉后,消毒铺 巾,将大鼠侧卧位置于预先准备好的泡沫平板上,用 胶布固定。右眼作为手术眼,左眼作为对照眼。在 手术开始前,使用托吡卡胺散瞳,然后用氯霉素滴眼 液轻轻冲洗结膜囊。使用30G的锐利针头作为穿 刺针,另外一端与输液瓶相连,然后打开输液带阀门 通道,呈45°刺破角膜,使针尖缓缓进入前房,避免损 伤眼球组织内的晶体和虹膜,用胶布把输液带固定 在桌子上。慢慢抬高输液瓶,使其与右眼垂直平面 的高度为150 cm,此时前房内压力达到110 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa),光镜下观察大鼠眼睛,可见 眼球内球结膜和虹膜变为苍白、水肿。缺血60 min 后关闭输液带阀门通道,拔出针头,结膜囊涂红霉素 眼膏;再灌注24 h后结束实验。

1.2.2 给药方法 分别于缺血前 15 min 和再灌注 前 5 min 时,CUR 组腹腔注射姜黄素 25 μg/kg,C 组 和 I/R 组腹腔注射等容量生理盐水。

1.2.3 光镜下检测大鼠视网膜组织形态学的变化

3 组于再灌注 24 h 时处死 8 只大鼠,迅速摘除 眼球,在冰水浴中环角巩膜缘切开,弃去眼前节和晶 体,外翻眼球,解剖显微镜下剥离视网膜,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,常规脱水透明,石蜡包 埋,制备切片(厚约 4 μm)。石蜡切片常规脱蜡人 水,蒸馏水冲洗,苏木精染色 5~10 min,自来水充分 冲洗 10 min,75% 盐酸乙醇分化 3 s,然后自来水中 冲洗 15~30 min 以返蓝。伊红染色,梯度乙醇脱 水,二甲苯透明,中性树脂封片,光学显微镜下观察 视网膜组织病理学结果。

1.2.4 电镜下观察大鼠视网膜组织超微结构的改变 3 组于再灌注 24 h 时处死 8 只大鼠,迅速摘除 眼球,在冰水浴中环角巩膜缘切开,弃去眼前节和晶体,外翻眼球,解剖显微镜下剥离视网膜,置于 2.5%戊二醛溶液,固定 24 h。经漂洗、再固定、脱水、环氧树脂包埋,超薄切片后装上铜载网格,行铅 铀双染,置于透射电镜下观察超微结构并拍照。

1.2.5 TUNEL 法检测大鼠视网膜组织细胞凋亡情况 石蜡切片二甲苯与梯度乙醇脱蜡与水化后,磷酸盐缓冲液(PBS)彻底冲洗,37 ℃下使用蛋白酶 K 工作液处理 30 min;采用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂 盒进行处理;拍照后用甲基绿复染数秒后立即用自 来水冲洗、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封 片,荧光显微镜下观察视网膜细胞凋亡情况。200 倍光学显微镜下观察细胞凋亡情况,染色后,凋亡细胞核为棕褐色,未发生凋亡细胞核为蓝紫色。每张 切片随机选取 5 个视野,计算细胞凋亡指数(AI) = 凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.2.6 逆转录-PCR(RT-PCR)检测大鼠视网膜组织 CHOP、ATF4和XBP1mRNA的表达 3组于再灌注 24h时处死8只大鼠,迅速摘除眼球,在冰水浴中环 角巩膜缘切开,弃去眼前节和晶体,外翻眼球,解剖 显微镜下剥离视网膜,迅速用预冷的生理盐水冲洗 后放入液氮冷却,-80℃冻存。取视网膜组织100 mg,提取总RNA,紫外分光光度计测定总RNA浓 度,OD260/OD280比值在1.78~2.0范围内的RNA 样品为合格样品。应用RT-PCR测定CHOP、ATF4 和XBP1mRNA表达水平。各目的基因的引物序列 如下: CHOP: 正义链: 5'-GGGAAACAGCGCATGAAG-GA-3',反义链:5'-GCGTGATGGTGCTGGGTACA-3'; ATF4:正义链:5'-CCAGGGCCCACCAGACAGT-3',反 义链:5'-CGCCAGTGAGGGCCTTCCTGC-3';XBP1:正 义链:5'-CTGCCGCTCATGGTTCCGGG-3',反义链:5'-TCTCCTCCGGGCTCAGGTGC-3';GAPDH:正义链:5'-AACAAGTAACCCTCAACCCTG-3',反义链:5'-ACAC-CCTCTGATACCCACATT-3'。建立反应体系,GAPDH 作为内参照基因分别将其与 CHOP、ATF4 和 XBP1 在同一反应体系内进行扩增。反应条件:95 ℃ 预变 性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 15 s 共 40 个循环。GAPDH、CHOP、ATF4 和 XBP1 基因产物长度分别为 377 bp、173 bp、204 bp 和 103 bp,反应结束后,按仪器默认条件收集荧光,把离心 管迅速放入 PCR 扩增仪,按扩增程序进行 PCR 扩 增。PCR 产物于1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系 统拍照,采用 Image J 软件进行各目的条带光密度的 半定量分析。

1.2.7 Western Blot 检测大鼠视网膜组织 CHOP、 Bcl-2、Bax 及 caspase-3 的表达水平 3 组于再灌注 24 h 时处死 8 只大鼠,迅速摘除眼球,在冰水浴中环 角巩膜缘切开,弃去眼前节和晶体,外翻眼球,解剖 显微镜下剥离视网膜,迅速用预冷的生理盐水冲洗 后放入液氮冷却,-80 ℃冻存。采用 Western blot 法检测视网膜组织 Bax、Bcl-2、caspase-3 和 CHOP 蛋 白的表达。将视网膜组织块加蛋白裂解液进行匀浆 裂解,提取蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,然后 把蛋白样品分装到离心管中,并加入上样缓冲液, 100 ℃沸水中煮沸 5 min, 使蛋白变性, 制成蛋白浓 度为4g/L的电泳样品,-20℃保存以备用。制备 10% SDS-PAGE 分离胶和 5% 浓缩胶,各取 4 μL 蛋 白样品进行上样,电泳4~5h,转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF)膜上,然后用 5% 牛奶封闭,分别加入 Bax 一抗(稀释度1:1000)、Bcl-2一抗(稀释度1:1 000)、caspase-3 一抗(稀释度 1:1 000)、CHOP 一抗 (稀释度1:1000)和GAPDH一抗(稀释度1:500), 4 ℃孵育过夜。TBST 冲洗 5~10 min,反复 3 次,加 入辣根过氧化酶标记的山羊抗兔 IgG (稀释度 1:500),室温孵育1~2h,洗膜、显影、定影。采用 Gel Doc 凝胶成像分析系统进行扫描并测定各蛋白 条带的灰度值,以各目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度 值的比值分别反映各目的蛋白的相对表达。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均数 ±标准差(x

±s)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠视网膜组织形态学比较 光镜下,C 组大鼠视网膜结构正常,各层细胞排列整齐,未见空 泡变性细胞,炎性反应细胞极少见。见图 1。L/R 组 大鼠视网膜结构紊乱,内核层到神经节细胞层出现 水肿,神经节细胞层细胞开始减少,可见细胞空泡化 现象,炎性反应细胞增多。见图 2。CUR 组大鼠视 网膜结构相对完整,水肿明显减轻,炎性反应细胞较 少,神经节细胞层空泡变性细胞数量减少。见图 3。



图 1 光镜下 C 组大鼠视网膜组织病理学结果 (HE 染色,×400)



图 2 光镜下 I/R 组大鼠视网膜组织病理学结果 (HE 染色,×400)



图 3 光镜下 CUR 组大鼠视网膜组织病理学结果 (HE 染色, ×400)

2.2 3 组大鼠视网膜组织细胞超微结构的改变 C 组大鼠视网膜神经节细胞结构正常,细胞核完整,细胞器结构完整且数目丰富,线粒体无水肿,嵴可见,电子密度低。见图4。L/R 组大鼠视网膜神经节细胞体积变小,线粒体明显肿胀,嵴消失,核膜不完整,甚至固缩、断裂,染色质浓缩且分布不均,细胞出现

一定程度的凋亡征象。见图 5。CUR 组大鼠视网膜 神经节细胞肿胀减轻,线粒体肿胀不明显(黑色箭头 所示),嵴可见,核膜较完整,染色质部分浓缩,分布 尚均匀。见图 6。



图 4 光镜下 C 组大鼠视网膜神经节细胞超微结构 (透射电镜,×15 000)



图 5 光镜下 I/R 组大鼠视网膜神经节细胞超微结构 (透射电镜,×15 000)



图 6 光镜下 CUR 组大鼠视网膜神经节细胞超微结构 (透射电镜,×15 000)

2.3 3 组大鼠视网膜组织细胞凋亡情况的比较 TUNEL 染色结果显示,C 组视网膜未见细胞凋 亡发生;L/R 组可见视网膜神经节细胞和内核层细 胞发生明显凋亡(箭头);CUR 组视网膜神经节细胞 和内核层细胞凋亡明显减少。见表1、图7~9。

表1 3组大鼠视网膜组织 AI 的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	AI(%)
C 组	1. 57 ± 0.19
I/R 组	14. 38 ± 4. 54 *
CUR 组	7. 55 ± 2. 72 [△]

注:与C组比较,*P<0.05;与L/R组比较,[△]P<0.05



图 7 光镜下 C 组大鼠视网膜组织细胞凋亡情况 (TUNEL 染色,×400)



图 8 光镜 I/R 组大鼠视网膜组织细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, ×400)



图 9 光镜下 CUR 组大鼠视网膜组织细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, ×400)

2.4 3 组大鼠视网膜组织 CHOP、ATF4 和 XBP1 mRNA 表达比较 与 C 组比较, I/R 组大鼠视网膜 组织 CHOP、ATF4 和 XBP1 mRNA 表达均上调,差异 有统计学意义(*P* < 0.05)。与 *I*/R 组比较, CUR 组 大鼠视网膜组织 CHOP、ATF4 和 XBP1 mRNA 表达

明显下调,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 2、 图 10。

表 2 3 组大鼠视网膜组织 CHOP、ATF4 和

XBP1 mRNA 表达比较(x±s,n=8)

组别	СНОР	ATF4	XBP1
C 组	0.223 ± 0.016	0.194 ± 0.017	0.206 ± 0.015
I/R 组	0.738 ± 0.034 *	0.685 ±0.024 *	0.659 ± 0.029 *
CUR 组	0. 542 \pm 0. 023 $^{\triangle}$	0. 438 \pm 0. 020 $^{\triangle}$	0. 470 ± 0. 018 $^{\triangle}$





图 10 3 组大鼠视网膜组织 CHOP、ATF4 和 XBP1 mRNA 表达的变化(RT-PCR)

2.5 3 组大鼠视网膜组织 CHOP、Bax、Bcl-2 及 caspase-3 蛋白表达比较 与 C 组比较, L/R 组视网 膜组织 Bax、caspase-3 和 CHO 蛋白 P 的表达上调, Bcl-2 蛋白表达下调, Bcl-2/Bax 比值下降(*P* < 0.05)。与 L/R 组比较, CUR 组视网膜组织 Bax、caspase-3 和 CHOP 蛋白的表达下调, Bcl-2 蛋白表达 上调, Bcl-2/Bax 比值升高(*P* < 0.05)。见表 3、图 11。



•					
组别	caspase-3	Bax	Bel-2	Bcl-2/Bax 比值	СНОР
C 组	1. 13 ± 0. 15	1.33 ±0.24	1.87 ±0.26	1.42 ± 0.23	1. 24 ± 0. 24
I/R 组	2. 33 ± 0. 24 *	2.56 ± 0.41 *	0. 96 ± 0. 16 *	0. 37 \pm 0. 34 *	2. 44 ± 0. 35 *
CUR 组	1. 45 \pm 0. 18 ^{\triangle}	1. 17 \pm 0. 33 $^{\triangle}$	1.65 ± 0.23 $^{\triangle}$	1. 44 ± 0. 26 $^{\triangle}$	1. 56 ± 0. 27 $^{\triangle}$

表3 3 组大鼠视网膜组织 caspase-3、Bax、Bel-2、CHOP 蛋白表达和 Bel-2/Bax 比值比较(x±s,n=8)

注:与C组比较,*P<0.05;与L/R组比较,[△]P<0.05

3 讨论

本实验采用前房灌注升高眼内压的方法建立大 鼠视网膜 RIRI 模型,通过调节连有针头的灌注容器 高度来控制眼内压,造成视网膜的不同程度缺血损 伤。有研究表明,通过前房灌注升高眼压至 110 mmHg 而导致视网膜缺血;当缺血时间 60 min 便可 引起视网膜细胞凋亡,视网膜形态和功能均发生不 可逆改变^[4]。本实验参考相关资料并结合预实验 结果,将缺血时间设定为 60 min,眼压升高设定为 110 mmHg。本研究结果表明,光镜下,I/R 组大鼠 视网膜结构紊乱,内核层到神经节细胞层出现水肿, 神经节细胞层细胞开始减少,可见细胞空泡化现象, 炎性反应细胞增多。提示大鼠 RIRI 模型复制成功。

本研究参考相关文献^[5]报道并结合预实验结 果,选定分别于缺血前60 min 时大鼠腹腔注射姜黄 素100 mg/kg。本研究结果表明,光镜下,CUR 组大 鼠视网膜结构相对完整,水肿明显减轻,炎性反应细 胞较少,神经节细胞层空泡变性细胞数量减少。提 示姜黄素可减轻大鼠 RIRI。

视网膜属于神经组织,其血供来自于视网膜中 央动脉,该动脉属于终动脉,故视网膜在缺血环境中 极易受到损伤^[6]。RIRI 的机制比较复杂,是多种因 素综合反应的结果,主要包括氧自由基的损伤、细胞 内钙超载、凋亡及凋亡基因的调控、炎性反应损伤、 细胞凋亡和坏死等多种病理生理过程^[7-8]。其中,细 胞凋亡在 RIRI 中具有重要作用,且已成为研究热点 之一。目前,细胞凋亡的途径有两条^[9],一条为外 源性或死亡受体途径引起的细胞凋亡途径,这一途 径是细胞通过激活的死亡受体招募接头蛋白 Fas 相 关死亡结构域蛋白,进而招募并激活 caspase-8 从而 启动细胞凋亡;另一条为内源性或线粒体途径引起 的细胞凋亡^[10]。caspase 是一组天冬氨酸特异性的 半胱氨酸蛋白酶,在凋亡信号作用下,线粒体膜上的 通道开放,内部 Cytc 和 caspase 的前体蛋白释放出 来,激活 caspase 核酸酶,或抑制胞内的抗凋亡蛋白, 使细胞发生凋亡^[11]。Cytc 是线粒体呼吸链的重要 组成部分,既可通过对细胞能量代谢的调节来调控 细胞死亡,又能通过对凋亡信号的传导和放大直接 介导细胞凋亡^[12]。目前较为明确的是,Cytc 释放到 胞质中可导致 caspase-9 激活,最终导致 caspase-3 的激活,诱发细胞凋亡^[13]。研究表明,抑凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的比值与细胞凋亡坏死有 关^[14-15]。研究表明,大鼠 RIRI 后导致视网膜神经节 细胞坏死凋亡,引起促凋亡蛋白 Bax 的表达升高,而 抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达下降^[16]。

RIRI 后的缺血、缺氧导致视网膜细胞 ATP 与营 养物质快速消耗后不能及时补充,出现能量代谢障 碍诱发 ERS。重新恢复血供后视网膜出现血液再灌 注,再灌注后产生大量氧自由基、Ca²⁺超负荷等因素 能够加重 ERS^[17]。当发生轻度 ERS 时,未折叠蛋 白反应通过下调翻译和上调内质网伴侣分子等维持 内质网稳态,从而保护细胞,但当发生持续或过强的 ERS 时则会诱导细胞凋亡。且 ERS 诱导的细胞凋 亡途径主要为 CHOP 诱导的细胞凋亡途径^[18]。正 常情况下, CHOP 表达量极低, 在 ERS 时, CHOP 明 显升高,过度表达的 CHOP 则可促进细胞周期停滞 或凋亡。ERS 时, 蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 被激活, 真核翻译起始因子 2 的 α 亚基 (elF2α)发生磷酸化,导致转录因子 ATF4 和 XBP1 发生表达,并结合 ERS 反应元件(ERSE)序列,诱导 CHOP 的表达^[18]。而 CHOP 通过下调 Bcl-2 表达, 耗竭谷胱甘肽,促进反应性氧族(ROS)的产生,活化 caspase-3,进而导致细胞凋亡^[19]。由于 ERS 诱导的 细胞凋亡主要是通过对 Bcl-2 家族的调控而实现 的^[20],故可将 ERS 诱导的细胞凋亡视为内源性或 线粒体途径引起细胞凋亡的补充。

姜黄素为一种中药单体,具有诸多功效如抗氧 化应激、抑制炎性反应性细胞因子释放以及抗细胞 凋亡等^[1-3]。动物实验研究表明,姜黄素在多种动物 模型上对各种局部器官组织的缺血/再灌注损伤,包 括肾脏、肝脏、肺及脑的 I/R 损伤均表现出一定的保 护作用,且可减轻大鼠 RIRI^[2-3]。但姜黄素减轻 RI-RI 的作用机制目前缺乏足够证据。有研究表明,调 控凋亡相关基因 p53 蛋白的表达可能是姜黄素的作 用机制之一^[5]。但姜黄素通过何种通路来抑制细 胞凋亡仍未明确。因此,本研究从 ERS 介导的细胞 凋亡入手,以探讨姜黄素对 RIRI 的深层机制。本研 究结果表明, I/R 组大鼠视网膜组织可见细胞水肿 现象,神经节细胞层细胞可见细胞空泡化现象,视网 膜内炎性反应细胞增多,视网膜结构出现紊乱。这 提示,缺血/再灌注可引起大鼠视网膜发生损伤。而 CUR 组大鼠视网膜水肿现象明显减轻,内核层结构 比较完整,视网膜内炎性反应细胞较少,视网膜结构 相对比较完整。这提示,姜黄素可减轻大鼠 RIRI, 对缺血/再灌注大鼠的视网膜有一定的保护作用。 同时,本研究结果表明,IR 组大鼠视网膜组织凋亡 相关蛋白 caspase-3 表达升高,促调亡蛋白 Bax 及 CHOP 表达亦升高, 而抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降。 而 CUR 组大鼠视网膜组织凋亡相关蛋白 caspase-3 表达下降,促凋亡蛋白 Bax 及 CHOP 表达亦下降,而 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达升高。提示,姜黄素可能通 过减弱 RIRI 后视网膜细胞内的促凋亡蛋白 Bax、 caspase-3 和 CHOP 的表达,提高抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达而减轻机体组织内细胞凋亡,从而对大鼠缺血/ 再灌注损伤时视网膜起到一定的保护作用。

本实验采用大鼠 RIRI 模型,并给予姜黄素进行 干预,初步证实了姜黄素可通过抑制 ERS 介导的细 胞凋亡而减轻大鼠 RIRI。这为探讨姜黄素减轻 RI-RI 的作用机制提供了又一有力的证据。本研究采 用的大鼠 RIRI 模型易于复制,可靠性较高,这为本 实验结果的科学性和严谨性提供了有力的保障。然 而,关于姜黄素减轻 RIRI 的作用机制可能有多方 面,而本实验仅从 ERS 介导的细胞凋亡这一方面入 手,未能从更多方面去探讨姜黄素的可能机制。今 后本实验的进一步工作便是从其他方面去探讨姜黄 素减轻 RIRI 的作用机制。

综上所述,姜黄素可减轻大鼠 RIRI,其机制可 能与抑制 ERS 介导的细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] Fan Z, Yao J, Li Y, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion by inhibiting the pathway of NF-Kb[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(4): 3451-3459.
- [2]Zhang HJ, Xing YQ, Jin W, et al. Effects of curcumin on interleukin-23 and interleukin-17 expression in rat retina after retinal ischemiareperfusion injury[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015,8(8):9223-9231.
- [3] Wang S, Ye Q, Tu J, et al. Curcumin protects against hypertension aggravated retinal ischemia/reperfusion in a rat strokemodel [J]. Clin Exp Hypertens, 2017, 39(8):711-717.
- [4] Chen YJ, Huang YS, Chen JT, et al. Protective effects of glucosamine on oxidative-stress and ischemia/reperfusion-induced retinal injury [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(3):1506-1516.

- [5]王赛斌,姬斌,黄晓燕,等.姜黄素对自发性高血压大鼠缺血再灌 注后视网膜细胞凋亡及 p53 表达的影响[J].浙江中医药大学学 报,2012,36(7):798-802.
- [6] Hu T, You Q, Chen D, et al. Inhibiting Matrix Metalloproteinase 3 Ameliorates Neuronal Loss in the Ganglion Cell Layer of Rats in Retinal Ischemia/Reperfusion[J]. Neurochem Res, 2016, 41(5):1107-1118.
- [7] Xu YP, Han F, Tan J. Edaravone protects the retina against ischemia/ reperfusioninduced oxidative injury through the PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6):9210-9216.
- [8] Seong H, Ryu J, Yoo WS, et al. Resveratrol Ameliorates Retinal Ischemia/Reperfusion Injury in C57BL/6J Mice viaDownregulation of Caspase-3[J]. Curr Eye Res, 2017, 42(12):1650-1658.
- [9] Bomsztyk K, Mar D, An D, et al. Experimental acute lung injury induces multi-organ epigenetic modifications in key angiogenic genes implicated in sepsis-associated endothelial dysfunction [J]. Crit Care, 2015,19(1):225.
- [10] Yin J, Tu C, Zhao J, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against global cerebral ischemia/reperfusion injury via its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in rats [J]. Brain Res, 2013, 1491:188-196.
- [11] Cheng P, Wang F, Chen K, et al. Hydrogen sulfide ameliorates ischemia/reperfusion-induced hepatitis by inhibiting apoptosis and autophagy pathways[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014:935251.
- [12] Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, et al. Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304(10): 1646-1656.
- [13] Meng G, Wang J, Xiao Y, et al. GYY4137 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by attenuating oxidative stress and apoptosis in rats[J]. J Biomed Res, 2015, 29(3):203-213.
- [14] Pe[3] a-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. FEBS J, 2018, 285 (3):416-431.
- [15] Karch J, Molkentin JD. Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak[J]. Circ Res, 2015, 116(11):1800-1809.
- [16] Migita H, Yoshitake S, Tange Y, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy Suppresses Apoptosis and Promotes Renal Tubular Regeneration After Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats[J]. Nephrourol Mon, 2016,8(1):e34421.
- [17] Nashine S, Liu Y, Kim BJ, et al. Role of C/EBP homologous protein in retinal ganglion cell death after ischemia/reperfusion injury [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2014,56(1):221-231.
- [18] Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, et al. The Role of the PERK/ eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress [J]. Curr Mol Med, 2016, 16(6): 533-544.
- [19] Dilshara MG, RGPT J, IMN M, et al. Silibinin sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by upregulating DR5 through ROS-induced endoplasmic reticulum stress-Ca²⁺-CaMKII-Sp1 pathway [J]. Oncotarget,2018,9(12):10324-10342.
- [20] Carpio MA, Michaud M, Zhou W, et al. BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(23):7201-7206.

(2017-09-24 收稿 责任编辑:杨觉雄)