

眼缺血综合征大鼠视网膜形态及 RhoA 和 ROCK-2 表达的变化

安 鑫, 刘兰静, 步建平

(首都医科大学大兴教学医院眼科, 北京 102600)

[摘要] 目的 通过建立眼缺血综合征(OIS)大鼠模型, 观察缺血后视网膜形态及 RhoA、ROCK-2 在大鼠视网膜中表达的差异。方法 Brown Norway 大鼠 20 只随机均分为 OIS 模型组及假手术组。OIS 模型组大鼠采用双侧颈总动脉完全结扎法(BCCAO)造模; 假手术组大鼠仅对其游离而不结扎。行苏木精-伊红(HE)染色观察建模3个月后2组大鼠视网膜神经节细胞数量及视网膜各层厚度; 采用免疫组织化学法和蛋白质印迹法分析2组大鼠 RhoA 和 ROCK-2 在视网膜中的表达水平。结果 模型组中9只大鼠造模成功。与假手术组相比, 模型组大鼠视网膜神经节细胞数量显著下降 ($P < 0.01$); 视网膜总厚度和内丛状层、内核层及外丛状层厚度均显著降低 (均 $P < 0.05$); 外核层厚度相对变薄, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与假手术组相比, 模型组大鼠视网膜中 RhoA 蛋白和 ROCK-2 蛋白表达水平均显著升高 (前者 $P < 0.01$, 后者 $P < 0.05$)。结论 OIS 模型组中 RhoA、ROCK-2 表达显著升高, 或可为该病的防治研究提供新的思路。

[关键词] 眼缺血综合征; 大鼠模型; RhoA; ROCK-2

[中图分类号] R73-3; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0397-06

眼缺血综合征(ocular ischemic syndrome, OIS)是一类累及眼部及脑部等器官的多学科的疾病, 患者通常可伴有颈动脉不同程度的狭窄及阻塞^[1]。由于该病起病隐匿, 早期诊断困难, 后期严重损害患者视力, 甚至致盲, 所以对 OIS 发病机制的研究尤为重要。目前研究已证实, 利用双侧颈总动脉完全结扎(BCCAO)法不仅可以制作慢性脑缺血的动物模型; 同时因为 BCCAO 可导致视网膜慢性缺血而被尝试作为 OIS 建模方法^[2]。Rho (Ras-related monomer guanosine triphosphate kinase) / Rho 激酶信号通路与钠/钾/钙离子信号通路一样, 体内分布广泛, 通过介导

细胞凋亡、细胞增殖和细胞收缩等参与机体多种生理及病理过程。研究表明 Rho/Rho 激酶通路对于视网膜缺血再灌注、急性视网膜缺血等发挥重要作用^[3-4], 但是在视网膜慢性缺血如 OIS 中的作用鲜有报道。有学者在 BCCAO 导致慢性脑缺血的动物模型中发现, 脑缺血后脑皮质及海马 RhoA、ROCK-2 (Rho-associated coiled coil forming protein kinase-2) 表达增加^[5]; 由于视网膜组织及血管与脑部构造高度相似, 推测在眼部慢性缺血, 尤其是 OIS 中可能也存在同样的改变。本实验将初步探索 OIS 模型与 RhoA、ROCK-2 表达的关系, 从而为临床诊治 OIS 提供新的思路。

[收稿日期] 2020-03-17

[作者简介] 安 鑫(1987—), 女, 硕士, 医师, 主要从事眼底病研究。E-mail: 1766514920@qq.com

[通信作者] 步建平(1979—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事眼底病研究。E-mail: bujianping-2004@sohu.com

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级近交系雄性 BN 大鼠 20 只, 2~3 月龄,

250~300 g, 购自北京维通利华公司[SCXK(京)2016-0006]。大鼠饲养于18~25℃室温环境, 相对湿度50%~70%[SYXK(京)2017-0019], 自由饮食。

1.2 动物模型的建立

20只大鼠采用抽签随机法分为2组, 每组10只。OIS模型组大鼠采用BCCAO法造模^[6]; 假手术组中只游离大鼠双侧颈总动脉, 其余处理同模型组。两组大鼠术后自由饮食, 常规消毒颈部伤口, 未使用镇痛药及抗生素。

1.3 组织学观察

术后3个月将大鼠脱颈椎处死, 取大鼠双侧眼球置于质量分数4%的多聚甲醛溶液中固定24h, 依次经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明和组织浸蜡, 将眼球包埋成石蜡包块。按照平行于视盘至角膜的矢状位平面纵向切片(厚度为7μm), HE染色后在光学显微镜下观察并拍照。选择100倍视野下观察2组大鼠眼球视网膜神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)5个不同区域中神经节细胞数, 应用Image-Pro Plus 5.0软件观察距视盘边缘200μm处的视网膜厚度, 分别测量视网膜总厚度(total retina thickness, TRT)以及外核层(outer nuclear layers, ONL)、外丛状层(outer plexiform layer, OPL)、内核层(inner nuclear layer, INL)和内丛状层(inner plexiform layer, IPL)厚度(μm), 每个样本测量5次, 取其平均值。

1.4 免疫组织化学法测定RhoA和ROCK-2蛋白在视网膜中的表达

石蜡切片脱蜡脱水。按照常规组织化学方法及试剂盒说明分别进行RhoA和ROCK-2免疫组织化学检测, 用PBS代替一抗作阴性对照, 显色剂显色, 自来水充分冲洗, 对比染核及封固。在高倍镜下随机选取5个视野观察阳性细胞, 即细胞质中有棕黄色颗粒者。采用Image-Pro Plus 5.0软件测量平均吸光度。

1.5 蛋白质印迹法检测RhoA和ROCK-2蛋白表达量

摘取麻醉大鼠双眼眼球并提取视网膜组织, 将其放入-80℃冰箱中保存。取视网膜组织加入裂解液, 离心并提取视网膜组织蛋白, 用Lowry

法测定蛋白浓度。取总蛋白20μL, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 进行蛋白质转膜, 加入抗体显色, 采用UVP凝胶数字成像系统将β-actin表达量作为内参进行结果分析, 用Image-Pro Plus 5.0软件测定灰度值, 目的蛋白的表达水平按照目的蛋白条带和内参条带的比值计算。

1.6 统计学处理

统计学分析采用SPSS 18.0软件进行, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用两独立样本的 t 检验进行计量资料分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模术后情况

造模当日OIS模型组中1只大鼠死亡, 可能与手术中出血较多、代偿能力差有关。其余大鼠正常存活, 饮食、饮水及活动正常。

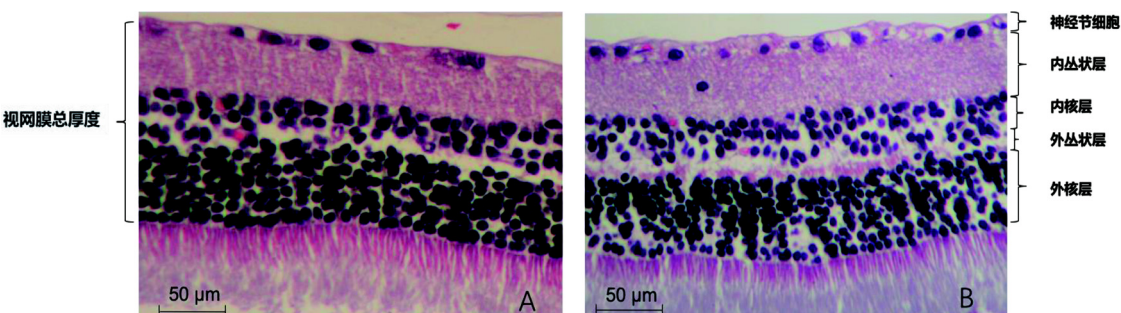
2.2 大鼠视网膜组织学观察

由视网膜HE染色切片观察, OIS模型组大鼠视网膜神经节细胞数量(图1A)较假手术组(图1B)明显减少; 分别计算两组神经节细胞单位面积密度, 结果与所观察一致, 与假手术组神经节细胞数量(819.9 ± 311.0)相比, OIS模型组(280.2 ± 78.0)显著降低($P < 0.01$)。两组大鼠视网膜厚度测量结果显示, 与假手术组相比, OIS模型组TRT明显减小($P < 0.05$), OIS模型组INL、IPL及OPL厚度与TRT变化一致, 均明显变薄(均 $P \leq 0.01$), ONL相对变薄, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

2.3 视网膜中RhoA和ROCK-2的分布及表达

免疫组织化学法检测发现, RhoA和ROCK-2蛋白主要集中表达在神经节细胞层胞质、IPL、INL和OPL中(图2); 假手术组大鼠视网膜可观察到少量RhoA和ROCK-2表达; 与假手术组相比, OIS模型组视网膜中RhoA蛋白表达水平升高($P < 0.05$), ROCK-2蛋白表达水平增高($P < 0.05$)(表2)。

蛋白质印迹法检测结果显示, 在2组大鼠视网膜组织蛋白样本量及内参照β-actin条带灰度基本相同的前提下, 与假手术组RhoA蛋白(1.27 ± 0.23)相比, OIS模型组RhoA蛋白表达水平



A 为 OIS 模型组，B 为假手术组。

图 1 各组大鼠视网膜组织学观察 (HE 染色)

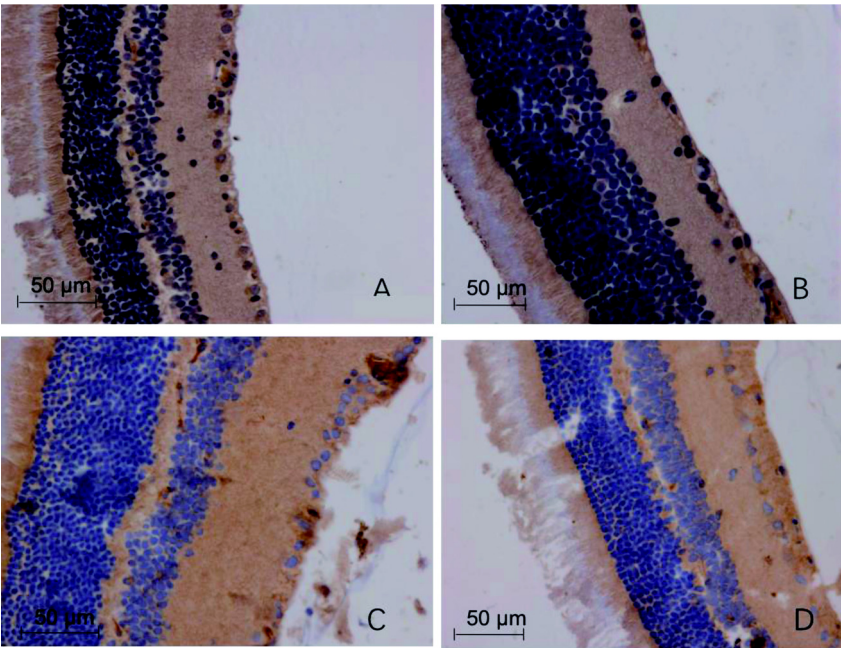
Figure 1 Histological observation on retina of rats in OIS model group and the sham group (HE staining)

表 1 各组大鼠各层视网膜厚度比较

Table 1 Retinal thickness of rats in OIS model group and the sham group

(厚度/μm, $\bar{x} \pm s$)						
组别	n	IPL	INL	OPL	ONL	TRT
OIS 模型组	9	24.76 ± 1.56	15.23 ± 3.12	6.88 ± 1.67	37.88 ± 9.72	96.28 ± 13.89
假手术组	9	41.05 ± 9.68	24.77 ± 5.78	10.66 ± 1.90	50.73 ± 10.59	139.43 ± 28.59
t 值		3.715	3.339	3.341	2.000	3.036
P 值		0.006	0.010	0.010	0.081	0.016

注：IPL，内丛状层；INL，内核层；OPL，外丛状层；ONL，外核层；TRT，视网膜总厚度。



A 示 OIS 模型组视网膜中 RhoA 的表达，B 示假手术组视网膜中 RhoA 的表达，C 示 OIS 模型组视网膜中 ROCK-2 的表达，D 示假手术组视网膜中的 ROCK-2 的表达。

图 2 免疫组织化学法观察各组大鼠视网膜 RhoA、ROCK-2 的表达

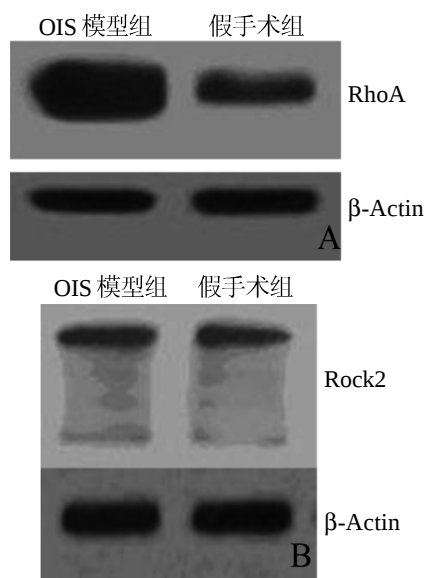
Figure 2 Immunohistochemical assay of RhoA and ROCK-2 in retinal tissues of rats in the OIS model group and the sham group

(2.41 ± 0.38) 显著升高 ($P < 0.01$); 同时 OIS 模型组 ROCK-2 蛋白表达水平 (0.40 ± 0.08) 高于假手术组 (0.25 ± 0.05) ($P < 0.05$) (图 3)。

表 2 免疫组织化学法检测大鼠视网膜中 RhoA 和 ROCK2 蛋白表达

Table 2 Expressions of RhoA and ROCK-2 proteins in rat retina detected by immunohistochemical assay

组别	n	RhoA	ROCK2
OIS 模型组	9	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.02
假手术组	9	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.01
t 值		2.750	2.330
P 值		0.016	0.031



A 示 RhoA 蛋白在两组视网膜的表达, B 示 ROCK-2 蛋白在两组视网膜的表达。n=5。

图 3 蛋白质印迹法检测各组大鼠视网膜中 RhoA 和 ROCK-2 表达

Figure 3 Expressions of RhoA and ROCK-2 proteins in retina of rats detected by Western blotting

3 讨论

采用 BCCAO 法研究眼部缺血性病变, 尤其是 OIS, 已得到越来越多的认可^[7]。双侧颈总动脉被结扎后, 眼动脉进一步缺血, 但可以通过椎动脉等代偿性供血, 从而导致眼部局部缺血, 所以 BCCAO 法导致的眼部组织及功能损伤过程与 OIS 极为相似^[8]。颈总动脉结扎后, 眼球局部缺血加速神经节细胞及光感受器变性, 从而进一步

引起感觉传入神经阻滞和视神经束变性, 最终导致瞳孔反射消失^[6,9]。

本研究发现, BCCAO 术后神经节细胞明显减少, 同时内层视网膜即内丛状层厚度变薄显著。Yamamoto 等^[10]发现, 术后 1 周神经节细胞减少 40%~60%。眼部缺血后内层视网膜最为敏感, 其主要原因为 BCCAO 术后眼部血供减少, 为内层网膜供血的视网膜中央动脉进一步缺血缺氧, 加之其为终末动脉且无侧枝循环, 最终加速视网膜神经节细胞数量减少及各种其他细胞的凋亡, 视网膜萎缩变薄。本研究结果显示, BCCAO 术后 90 d 除 ONL 外各层网膜变薄。Yamamoto 等^[10]研究也发现 BCCAO 术后 2 周即可观察到 INL 退行性改变, 与本实验结果相符。但 Daniel 等^[8]在术后 1 个月只观察到 IPL 损伤, 其他层改变无统计学意义, 延迟损害的原因可能是由于大鼠血管的先天性异常及麻醉药物的不同。本实验中发现 ONL 相对变薄, 但差异无统计学意义, 可能原因为外层视网膜的血供主要来源于脉络膜, 脉络膜的血供主要来源于睫状后短动脉, 且侧枝循环丰富, 彼此交通, 故外层视网膜往往损伤较小。但是 Davidson 等^[11]和 Stevens 等^[12]研究结果与本研究结果相反, 大鼠 BCCAO 术后视网膜 ONL 厚度明显减少, 可能原因是术后脉络膜急性缺血, 从而导致外层视网膜急性缺血。

Rho/Rho 激酶信号通路包括 Rho、Rho 激酶 (ROCK) 和肌球蛋白磷酸酶 (myosin phosphatase, MP)。其中 RhoA 是目前研究最多的 Rho 蛋白^[13]。ROCK 分为 ROCK-1 和 ROCK-2, 是 Rho 的下游靶效应分子中最主要的效应分子; 前者主要分布于非神经组织中, 如骨骼肌等; 后者主要分布于心脏和中枢神经系统^[14]。被激活的 ROCK 作用于 MP, 使肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 增加或减少磷酸化水平, 从而诱导细胞的收缩和舒张, 产生相应的生物学行为^[15]。近年来研究发现, RhoA/ROCK 通路在心、脑、肺等多个器官的慢性缺血性疾病中发挥作用^[16-18]。本研究中 OIS 模型组 RhoA 和 ROCK-2 表达显著增高, 提示 BCCAO 导致的慢性视网膜缺血状态进一步激活了 Rho/ROCK 信号通路, 从而使 RhoA 及 ROCK-2 表达增加。Du 等^[19]研究发现, BCCAO

术后3个月视网膜中RhoA表达显著增高,与本研究结果一致。RhoA及ROCK-2表达增加可能是由于视网膜慢性缺血缺氧后,炎症因子释放以及血-视网膜屏障破坏,同时促进细胞凋亡,但是RhoA/ROCK-2信号通路导致OIS的具体机制仍需进一步研究。

综上所述,BCCAO术后可进一步激活视网膜中RhoA/ROCK-2通路,研究RhoA/ROCK-2通路在OIS中的作用及机制,将为OIS的防治提供新的思路。本实验组大鼠视网膜中RhoA及ROCK-2在不同时间点的表达及具体下游靶点仍待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王艳玲. 建立多学科综合诊疗模式, 提高眼缺血综合征诊治水平[J]. 中华眼底病杂志, 2013, 29(3):233-236.
- [2] Qin YL, Ji MQ, Deng TT, et al. Functional and morphologic study of retinal hypoperfusion injury induced by bilateral common carotid artery occlusion in rats[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):80.
- [3] 王晓玲, 陈长征. Ras同源蛋白/ras同源蛋白激酶通路及其抑制剂在视神经疾病中的作用研究现状[J]. 中华眼底病杂志, 2017, 33(5):548-550.
- [4] 王超. Rho激酶抑制剂对青光眼的神经保护作用及研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(4):381-384.
- [5] 王志. Rho/Rho激酶信号通路的激活与小鼠脑缺血损伤关系的研究[D]. 泰安: 泰山医学院, 2008.
- [6] 谢国立, 傅强, 赵露, 等. 大鼠眼缺血综合征动物模型的制备[J]. 临床和实验医学杂志, 2015(22):1841-1843.
- [7] 安鑫. 眼缺血综合征实验动物模型的制备[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(3):285-288.
- [8] Daniel L, Nice SA, Matilde A, et al. Chronic bilateral common carotid artery occlusion: a model for ocular ischemic syndrome in the rat[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2006, 244(2):199-204.
- [9] 王佳琳, 侯金彤, 李茜, 等. 眼缺血综合征大鼠视网膜Bcl-2和Bax的表达[J]. 中华眼科杂志, 2015, 51(12):912-917.
- [10] Yamamoto H, Schmidt-Kastner R, Hamasaki DI, et al. Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion in Wistar rats[J]. Exp Eye Res, 2006, 82: 767-779.
- [11] Davidson CM, Pappas BA, Stevens WD, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: Loss of pupillary reflex, visual impairment and retinal neurodegeneration[J]. Brain Res, 2000, 859(1):96-103.
- [12] Stevens WD, Fortin T, Pappas BA. Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: Time course and role of light exposure[J]. Stroke, 2002, 33(4):1107-1112.
- [13] Tsai NP, Wei LN. RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granule formation and apoptosis[J]. Cell Signal, 2010, 2(4): 668-675.
- [14] Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(6):446-456.
- [15] Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The function of Rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. Front Pharmacol, 2015, 6: 276.
- [16] 程载兴, 王明亮, 万黎, 等. Rho激酶抑制剂在大鼠肺缺血再灌注损伤中的保护作用的研究[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(3):447-450.
- [17] Lin YH, Fang LH, Du GH. Research advances on regulatory effect of RhoA on myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Chin Pharmacol Bull, 2015, 31(10):1336-1339.
- [18] Kuroda S, Tashiro H, Kimura Y, et al. Rho-kinase inhibitor targeting the liver prevents ischemia/reperfusion injury in the steatotic liver without major systemic adversity in rats[J]. Liver Transpl, 2015, 21(1):123-131.
- [19] Du R, Wang JL, Wang YL. Role of RhoA/MERK1/ERK1/2/iNOS signaling in ocular ischemic syndrome[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2016, 254(11):2217-2226.

Changes of Retinal Morphology and Expressions of RhoA and ROCK-2 in Ocular Ischemic Syndrome Rats

AN Xin, LIU Lanjing, BU Jianping

(Department of Ophthalmology, Daxing Teaching Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 102600, China)

Correspondence to: BU Jianping, bujianping-2004@sohu.com

[Abstract] Objective To set up an ideal rat model for ocular ischemic syndrome (OIS), and to investigate the differences in the retinal morphology and the expressions of Ras-related monomer guanosine triphosphate kinase A (RhoA) and Rho-associated coiled coil forming protein kinase-2 (ROCK-2) in rat retina. **Methods** Twenty BN rats were randomly divided into two groups: the sham group and OIS model group (by bilateral carotid artery occlusion, BCCAO). Overall retinal thickness and retinal cell density were evaluated by histological analysis three months after modeling, respectively. The protein expressions of RhoA and ROCK-2 were also examined by immunohistochemical staining and Western blotting. **Results** Compared with the sham group, the number of retinal ganglion cells (RGC) was diminished in the model group ($P < 0.01$). The significant decrease of thickness was found in the total retina, inner plexiform layer (IPL), inner nuclear layer (INL) and outer plexiform layer (OPL) ($P < 0.05$); however, no change was evident in the outer nuclear layers (ONL) ($P > 0.05$). The expressions of RhoA and ROCK-2 in the model group were significantly increased as compared with the sham group by immunohistochemical staining and Western blotting analysis (the former $P < 0.01$, the latter $P < 0.05$). **Conclusion** RhoA and ROCK-2 are significantly expressed in the OIS model group, which maybe provide new ideas for the treatment of this disease.

[Key words] Ocular ischemic syndrome; Rat models; RhoA; ROCK-2