

· 论 著 ·

雌激素替代治疗对去卵巢雌性大鼠萘性白内障晶状体上皮细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的影响*

康刚劲, 李平华

(重庆医科大学附属第一医院眼科 400016)

摘要:目的 观察雌二醇及雌二醇联合孕酮对去卵巢雌性大鼠萘性白内障晶状体上皮细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。方法 将 32 只健康成年雌性 SD 大鼠随机分为 4 组,即对照组、卵巢切除组、雌二醇组(卵巢切除加雌二醇替代治疗组)、雌二醇加孕酮组(卵巢切除加雌二醇和孕酮替代治疗组)。术后 2 周各组均用萘混悬液灌胃并行裂隙灯显微镜检查,观察各组大鼠晶状体变化;灌胃 6 周后处死大鼠,采用放射免疫法检测血清中雌二醇和孕酮浓度,免疫组化(S-P)法观察晶状体上皮细胞(LECs)中凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果 雌二醇组、雌二醇加孕酮组以及对照组晶状体浑浊程度较卵巢切除组轻,出现时间晚;雌二醇组和雌二醇加孕酮组血清雌二醇与孕酮水平接近对照组($P>0.05$);除卵巢切除组外,3 组间 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);卵巢切除组血清雌二醇与孕酮水平显著低于其余 3 组($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达阳性率较其余 3 组低, Bax 蛋白表达阳性率则较其余 3 组高($P<0.05$)。结论 抑制晶状体上皮细胞凋亡可能是雌二醇对萘处理去卵巢雌性大鼠晶状体保护作用的机制之一;雌二醇可能通过下调 Bax 蛋白表达和上调 Bcl-2 蛋白表达抑制 LECs 的凋亡而阻止晶状体混浊。

关键词:雌激素替代治疗;雌二醇;晶状体上皮细胞;凋亡;Bcl-2/Bax

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.007

中图分类号:R977.12;R365.776

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)19-2561-04

Effects of estrogen replacement therapy on expression of apoptosis related protein Bcl-2 and Bax in lens epithelial cells of naphthalene induced cataract in ovariectomized female rats*

KANG Gang-jing, LI Ping-hua

(Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of estradiol and estradiol combined progesterone on expression of apoptosis related protein Bcl-2 and Bax in lens epithelial cells of naphthalene induced cataract in ovariectomized female rats. **Methods** Thirty-two adult female Sprague-Dawley rats were divided into four groups randomly: Control, ovariectomy, estradiol (ovariectomy and estradiol replacement therapy), estradiol and progesterone (ovariectomy combined estradiol and progesterone replacement therapy). After 2 weeks of operation, each group received naphthalene for 6 weeks through a stomach tube. The changes of lenses were observed with slit-lamp microscope. After 6 weeks of naphthalene administration, all rats were killed and serum estradiol and progesterone levels were determined with radioimmunoassay in each rat. The rats lenses were taken out to observe the expression of apoptosis related protein Bcl-2 and Bax were observed with SP immunohistochemical technique. **Results** In control, estradiol, as well as estradiol and progesterone groups, opacity of lens were similar, and more slight and late than ovariectomy group. In addition, there was no significant difference in the expression of Bcl-2 and Bax protein among estradiol, estradiol and progesterone, also control group. On the contrary, in ovariectomy group, the expression of Bcl-2 protein decreased, Bax protein increased than other groups ($P<0.05$). The level of serum estradiol and progesterone in ovariectomy group decreased significantly as compared with control group ($P<0.01$); but estradiol, estradiol and progesterone groups expressed similarly to control group ($P<0.05$), and there was no significant difference among estradiol, estradiol and progesterone groups ($P>0.05$). **Conclusion** In naphthalene induced cataract in ovariectomized female rats, anti-apoptosis may be one of mechanism of estradiol protection on lens. Estradiol maybe can up-regulate expression of Bcl-2 protein and down-regulate expression of Bax protein to inhibit apoptosis of LECs, and prevent opacity of lens. Estradiol associate with progesterone replacement therapy does not influence this anti-apoptosis.

Key words: estrogen replacement therapy; estradiol; lens epithelial cells; apoptosis; Bcl-2/Bax

越来越多的研究显示,雌激素除了具有促进女性生殖系统发育、维持女性性征等作用外,还具有促进细胞增殖、分化,保护细胞,抑制细胞凋亡,或促进某些细胞凋亡的作用。人体内自然存在的 3 种雌激素中,雌二醇(estradiol, E2)活性最强,临床上常单独或联合孕激素用于各种原因所致的雌激素缺乏症,

如原发性卵巢发育异常、卵巢切除术后及绝经后等的替代治疗,以及女性骨质疏松、心血管疾病等的辅助治疗。

世界各地不同时期流行病学及大样本病例调查发现,绝经后接受激素替代治疗的女性白内障患病率低于未使用者及同龄男性,对多种类型白内障有保护作用^[1-2]。此后的实验研究

* 基金项目:泸州医学院科研基金资助项目(04113)。

结果也提供了进一步的依据,表明雌激素对晶状体具有保护作用,可维持晶状体透明性,防止晶状体混浊,抑制多种类型白内障的发生^[3-4]。以往对雌激素晶状体保护作用的研究主要集中在其抗氧化方面,而雌激素与晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)凋亡关系的研究才刚刚开始起步,对于雌激素是否具有抗凋亡作用及抗凋亡作用途径和作用机制尚不明确。本研究根据临床上雌激素替代治疗(estrogen replacement therapy, ERT)的两种常用治疗方案,观察 E2 及其联合孕酮对去卵巢雌性大鼠先天性白内障 LECs 中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响,从凋亡角度探寻雌激素对晶状体的保护作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雌性 SD 大鼠 32 只由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心提供,体质量 0.20~0.25 kg,随机分为对照组、卵巢切除组、E2 组以及 E2 加孕酮组。

1.2 试剂与器材

1.2.1 试剂

苯甲酸 E2 注射液(上海通用药业股份有限公司),黄体酮注射液(浙江仙琚制药股份有限公司),萘(上海远航试剂厂),E2 放免试剂盒、孕酮放免试剂盒(天津德普生物技术和医学产品有限公司),一抗为兔抗鼠 Bcl-2 和兔抗鼠 Bax(武汉博士德生物工程有限公司),即用型羊抗兔 SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)等。

1.2.2 器材

超薄切片机(LKB-V,德国)和数码裂隙灯显微镜(SLM-3,重庆康华科技有限公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠卵巢切除方法

速眠新麻醉后,卵巢切除组、E2 组、E2 加孕酮组分别作经双侧脊柱旁纵形腹部皮肤切口行双侧卵巢切除术,对照组采用相同切口仅行双侧腹膜切开及少量脂肪切除。

1.3.2 给药方法

术后 2 周起,4 组大鼠均用浓度为 300 g/L 萘混悬液 1.66 mL/kg 灌胃,2 次/周;E2 组隔日 1 次肌注苯甲酸 E2 注射液,每次 0.025 mg/kg, E2 加孕酮组隔日 1 次肌注苯甲酸 E2 注射液 0.025 mg/kg 和黄体酮注射液 0.005 mg/kg;对照组及卵巢切除组隔日 1 次肌注灭菌注射用水 0.1 mL/kg。各组大鼠均给药 6 周。

1.3.3 裂隙灯显微镜观察

每周 1 次托吡卡胺散瞳检查各组大鼠晶状体混浊情况并照相记录。

1.3.4 免疫组化方法

给药 6 周后以颈椎脱臼法处死大鼠,迅速取出眼球固定,常规石蜡包埋,组织切片;每例标本取切片 6 张,分为 2 组,每组 3 张,2 周内检测。染色:石蜡切片常规脱蜡至水, H₂O₂ 孵育;高温高压修复;滴加正常山羊血清封闭液;滴加一抗工作液(1:50)4℃ 过夜;加生物素标记二抗;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃ 孵育 15 min;DAB 显色;苏木素轻度复染,盐酸乙醇分色,自来水冲洗,烘干,透明,封片;显微镜下观察并照相。阴性对照以 PBS 液代替一抗孵育切片,其余操作同上;阳性对照为已知阳性片。结果判定: Bcl-2、Bax 阳性着色细胞为胞浆呈棕黄色,随机选取 5 个高倍视野,计数 50 个细胞,计阳性细胞数,计算其百分率。

1.3.5 E2、孕酮浓度检测

取出大鼠眼球标本后立即经伤口处收集静脉血,1 周内用放射免疫试剂盒检测 E2、孕酮浓度。

1.4 统计学方法

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用

SPSS11.5 统计软件进行分析,采用方差分析、SNK 法(*q* 检验)进行组间均数两两比较,用 Pearson 卡方进行组间阳性率比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜检查

各组在不同时期有不同数量大鼠出现单眼或双眼晶状体变化。卵巢切除组在用药 4~5 周时 4 只大鼠(6 眼)相继出现晶状体前囊细点状混浊,赤道前浅皮质密集空泡和水裂,以后病变稳定,至实验结束前未见明显变化;其他各组在用药第 6 周时发现晶状体改变,其中对照组 1 只(2 眼)、E2 组 2 只(3 眼)、E2 加孕酮组 1 只(1 眼),表现为少量浅皮质空泡或水裂,未见有晶状体前囊细点状混浊,除卵巢切除组外,3 组间晶状体混浊程度无明显差异。

2.2 Bcl-2、Bax 蛋白在各组大鼠 LECs 的表达

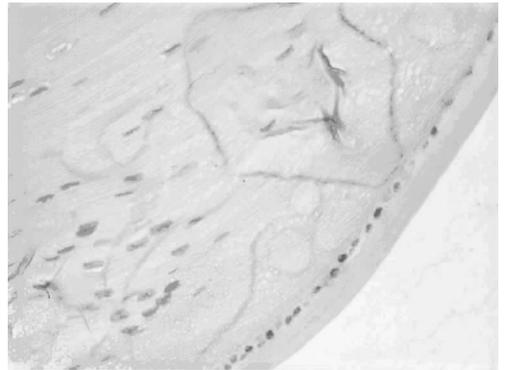


图 1 对照组大鼠 LECs 中 Bcl-2 蛋白的表达(10×40)

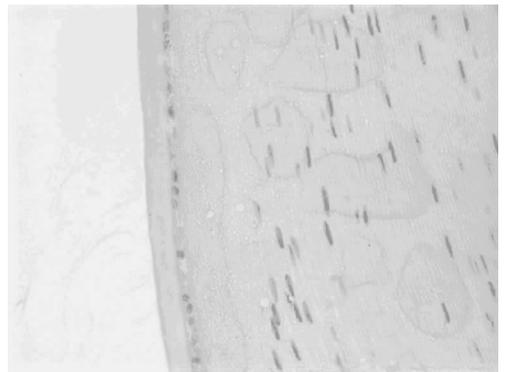


图 2 E2 组大鼠 LECs 中 Bcl-2 蛋白的表达(10×40)



图 3 E2 加孕酮组大鼠 LECs 中 Bcl-2 蛋白的表达(10×40)

2.2.1 Bcl-2 蛋白的表达

E2 组、E2 加孕酮组及对照组之间表达阳性率比较差异无统计学意义,卵巢切除组 Bcl-2 表达阳

性率较其他 3 组下降($P < 0.05$),见表 1、图 1~ 4。

2.2.2 Bax 的表达 卵巢切除组 Bax 表达阳性率较其他 3 组高($P < 0.05$),见表 1、图 5~8。E2 组、E2 加孕酮组及对照组之间表达阳性率比较差异无统计学意义。

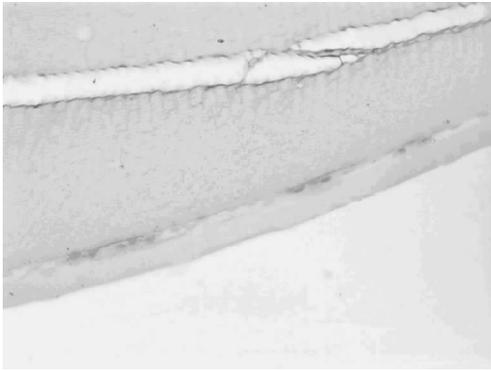


图 4 卵巢切除组大鼠 LECs 中 Bcl-2 蛋白的表达(10×40)

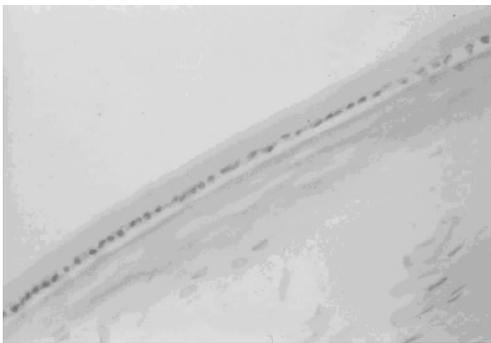


图 5 对照组大鼠 LECs 中 Bax 蛋白的表达(10×40)

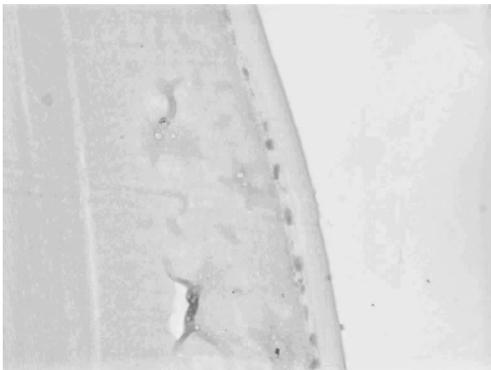


图 6 E2 组大鼠 LECs 中 Bax 蛋白的表达(10×40)

表 1 各组大鼠 LECs 中 Bcl-2、Bax 蛋白的表达(%, $\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | Bcl-2 蛋白 | Bax 蛋白 |
|---------|------------------------------|------------------------------|
| 对照组 | 26.66±7.87 | 14.67±8.91 |
| E2 组 | 23.33±7.66 | 19.67±6.74 |
| E2 加孕酮组 | 25.00±6.78 | 18.33±8.04 |
| 卵巢切除组 | 16.33±11.06* ^Δ ** | 29.00±12.89* ^Δ ** |

与对照组比较,*: $P < 0.05$;与 E2 组比较,#: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$;与 E2 加孕酮组比较,Δ: $P < 0.01$,*: $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠血清 E2 和孕酮水平比较 卵巢切除组血清 E2 与孕酮水平显著低于对照组($P < 0.01$),补充 E2 与孕酮后的 E2 组及 E2 加孕酮组血清 E2 水平接近于对照组,E2 组及 E2

加孕酮组血清 E2 水平差异无统计学意义,见表 2。

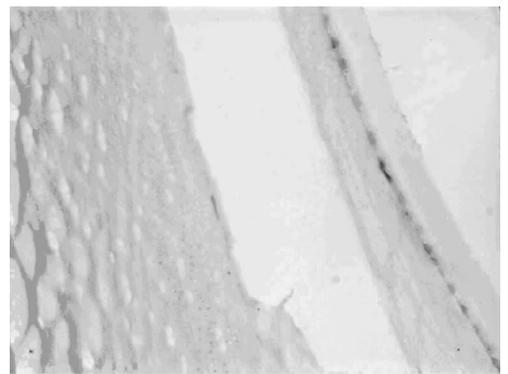


图 7 E2 加孕酮组大鼠 LECs 中 Bax 蛋白的表达(10×40)

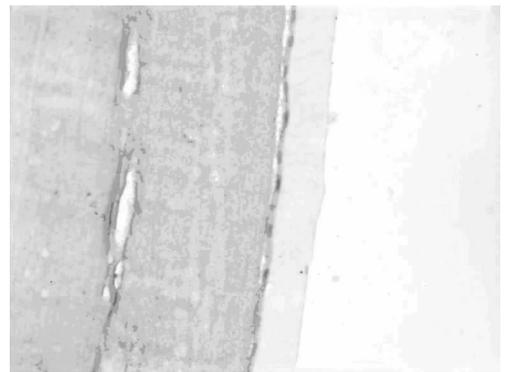


图 8 卵巢切除组大鼠 LECs 中 Bax 蛋白的表达(10×40)

表 2 各组大鼠血清 E2 和孕酮水平 (ng/mL, $\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | E2 | 孕酮 |
|---------|-------------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 1 015.67±79.12 | 21.25±7.54 |
| E2 组 | 970.63±104.41 | 7.98±4.18* ^Δ * |
| E2 加孕酮组 | 925.35±112.54 | 18.24±5.6 |
| 卵巢切除组 | 210.82±86.63* ^Δ ** | 6.23±2.79* ^Δ * |

与对照组比较,*: $P < 0.01$;与 E2 组比较,#: $P < 0.01$;与 E2 加孕酮组比较,*: $P < 0.05$ 。

3 讨论

在雌激素对晶状体的保护作用研究中,抗氧化作用已被多项研究证实^[5-6],但除抗氧化外是否还存在其他作用机制?近年来较多研究已初步显示雌激素还具有抑制包括眼部组织在内的多种细胞凋亡的作用。但对于雌激素与 LECs 凋亡之间关系的研究甚少,并在雌激素是否影响 LECs 凋亡、雌激素抗凋亡途径及机制等方面尚存在争议^[7]。

LECs 凋亡与白内障的形成密切相关。Li 等^[8]最早提出,氧化损伤所致 LECs 凋亡是白内障形成的早期事件,是人类和所有脊椎动物非先天性白内障形成的共同的细胞学基础。氧化损伤与 LECs 凋亡关系密切,是诱发晶状体上皮细胞凋亡的一个重要因素,线粒体对氧化损伤尤其敏感,其结构和功能障碍是晶状体上皮细胞凋亡的中心事件。在氧化应激作用下,线粒体内膜的相对不通透性消失,膜电位瓦解,细胞色素 C 释放,促使 Caspase-9 的激活,进而激活下游的 Caspase,引起细胞凋亡。茶性白内障模型建立的生化机制之一为茶对动物氧

化应力的影响, 萘经消化道吸收进入动物体内后, 在眼内生成 1,2-二萘, 该化合物自动氧化为 1,2-萘醌后与晶状体中多种成分如 VitC、辅酶、巯基化物、氨基酸及蛋白质等发生氧化还原反应, 反应中消耗房水中 VitC, 降低房水中氧的浓度, 并生成大量的 H_2O_2 , 使实验动物细胞内活性氧升高, 氧化损伤晶状体细胞膜脂质造成实验性的白内障模型^[9-10]。

LECs 的凋亡属线粒体水平上的细胞死亡, 起始是通过 Bcl-2 家族的成员所调节的。Bcl-2 家族是目前已知与细胞凋亡有关的基因中与氧化关系最密切的基因, 在凋亡的线粒体途径中发挥着重要作用。Bcl-2 编码的基因蛋白是跨膜蛋白, 位于线粒体膜、核膜及胞浆内质网膜上。Bcl-2 家族蛋白的主要功能是参与线粒体凋亡通路的调节, 在过氧化氢诱导的 LECs 凋亡过程中扮演了重要的角色^[11]。而各家族成员对凋亡过程发挥着不同的作用: Bcl-2 和 bcl-X 抑制细胞凋亡, 而 Bax 与 Bad 则促进细胞凋亡。Bcl-2 与 Bax 形成异源二聚体而发挥作用, 二者之间的比例可调节细胞凋亡的发生。它们能改变线粒体巯基的氧化还原状态来控制其膜电位从而控制细胞凋亡; 还能直接控制线粒体膜的通透性, 从而调节线粒体释放促凋亡因子(凋亡蛋白前体)^[12-13]。此外, Bcl-2 可能是线粒体 PT 孔道的组成成分, 它在较高 pH 条件下能形成离子通道, 而 Bax 则能在较广泛的 pH 范围内形成孔道, 允许一些离子和小分子如细胞色素 C 等穿过线粒体膜, 进入胞质, 从而引起细胞凋亡, 而 Bcl-2 能封闭 Bax 形成孔道的活性, 使一些小分子不能自由通透, 从而保护细胞免于凋亡; Bcl-2 还能将凋亡蛋白前体等定位至线粒体膜上, 使其不能发挥致凋亡作用^[14]。

本研究建立去卵巢雌性大鼠萘性白内障模型, 观察了 E2 及 E2 联合孕酮对不同雌激素水平大鼠晶状体浑浊程度及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响。血清 E2 与孕酮水平接近的 E2 组、E2 加孕酮组及对照组 3 组间晶状体浑浊程度相似, 混浊出现晚, 混浊程度较轻, Bcl-2、Bax 表达无明显差异; 而在血清 E2 与孕酮显著低下的卵巢切除组中, 晶状体浑浊出现早, 程度较重, Bcl-2 表达阳性率较其他 3 组低, Bax 表达阳性率则较其他 3 组高。此结果显示, E2 可影响雌性去卵巢萘性白内障大鼠 LECs 凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达; 雌激素水平下降时, 补充外源性的雌激素可以提高凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达阳性率, 降低凋亡促进蛋白 Bax 的表达阳性率, 从而抑制 LECs 的凋亡。作者推测, E2 可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达、下调 Bax 蛋白表达、使 Bcl-2/Bax 比值升高、阻止 PT 孔的开放等途径, 从而抑制细胞色素 C 释放到胞浆中, 阻止 Caspase-9 及下游 Caspase 的激活, 抑制 LECs 凋亡, 发挥对晶状体的保护作用。本研究中发现, E2 联合适量的孕激素对 LECs 中 Bcl-2、Bax 表达没有明显影响, 推测临床上常用的雌孕激素联合替代治疗方案不影响雌激素的抗凋亡作用。

本研究显示, 抑制 LECs 凋亡可能是 E2 对萘处理去卵巢雌性大鼠晶状体保护作用的机制之一; E2 可能通过下调 Bax 蛋白表达和上调 Bcl-2 蛋白表达抑制 LECs 的凋亡阻止晶状体混浊。但雌激素抑制 LECs 凋亡的机制是复杂的, 雌激素通过怎样的信号传导方式和途径调控凋亡相关蛋白, 凋亡相关蛋白之间怎样相互作用, 雌激素对 LECs 抗凋亡作用与抗氧化作用之间的关系以及长期使用雌激素替代治疗的有关风险评价等均有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Aina FO, Smeeth L, Hubbard R, et al. Hormone replacement therapy and cataract: a population-based case-control study[J]. *Eye*, 2006, 20: 417.
- [2] Younan C, Mitchell P, Cumming RG, et al. Hormone replacement therapy, reproductive factors and the incidence of cataract and cataract surgery: The Blue Mountains Eye Study[J]. *Am J Epidemiol*, 2002, 155: 997.
- [3] Bisby RM, Cardenas H, Caperell-Grant A, et al. Protective effects of estrogen in a rat model of age related cataracts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 9328.
- [4] Dynlacht JR, Valluri S, Lopez J, et al. Estrogen protects against radiation-induced cataractogenesis[J]. *Radiat Res*, 2008, 170(6): 758.
- [5] Ediger TR, Kraus-WL, Weinman EJ, et al. Estrogen receptor regulation of the Na^+/H^+ exchange regulatory factor[J]. *Endocrinology*, 1999, 140: 2976.
- [6] Wang X, Simpking JW, Dykens JA, et al. Oxidative damage to human lens epithelial cells in culture: estrogen protection of mitochondrial potential, ATP, and cell viability [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 5: 2067.
- [7] Chen JQ, Cammarata PR, Baines CP, et al. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(10): 1540.
- [8] Li WC, Kuszak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals[J]. *J Cell Biol*, 1995, 130(1): 169.
- [9] 李凤鸣. 眼科全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1572.
- [10] van Heyningen R, Pirie A. The metabolism of naphthalene and its toxic effect on the eye[J]. *Biochem J*, 1967, 102: 842.
- [11] Yao K, Ye P, Zhang L, et al. Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells[J]. *Mol Vis*, 2008, 14: 217.
- [12] Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(1): 67.
- [13] Zamzami N, Larochette N, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1478.
- [14] Behrens TW, Mueller DL. Bcl-x and the regulation of survival in the immune system[J]. *Immunol Res*, 1997, 16(2): 149.