

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.02.007

通窍明目 IV 号对青光眼模型大鼠视神经保护的机制研究 *

董霏雪^{1,2} 孙 河¹ 王丽媛¹ 赵 爽¹ 李 阳² 刘清娇² 刘 旭^{2Δ}

(1 黑龙江中医药大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150040; 2 黑龙江中医药大学 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的:观察不同浓度通窍明目 IV 号对青光眼模型大鼠凋亡相关蛋白表达的干预作用。**方法:**将 42 只 SD 大鼠随机分为空白组,模型组,通窍明目 4 号低、中、高剂量组和神经营养剂组,共计 6 组,每组 7 只。经眼球前房角膜缘注射卡波姆复制高眼压模型,成模 21 天后灌胃给药,给药期 4 周。采用 HE 染色观察视网膜形态及视神经节细胞、免疫组化法测定 BCL-2、Bax、P53 蛋白表达,用 Western Blot 法测定 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达。**结果:**与空白组对比,模型组视网膜 Bax 与 p53 阳性表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,神经营养剂组与通窍明目 IV 号高、中剂量组视网膜 Bax 与 p53 蛋白的阳性表达显著降低($P<0.01$)。与空白组比较,模型组视网膜 Bcl-2 阳性表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,神经营养剂组与通窍明目 IV 号各剂量组视网膜 Bcl-2 的阳性表达有不同程度的提高。模型组大鼠 caspase-3、caspase-9 的蛋白表达水平均高于空白组($P<0.01$);与模型组比较,神经营养剂组与通窍明目 IV 号各剂量组大鼠视网膜 Caspase3 及 caspase-9 表达水平明显降低($P<0.01$)。**结论:**通窍明目 IV 号可能通过下调 Bax、P53 表达,促进 Bcl-2 表达升高、抑制 Caspase-3、Caspase-9 激活凋亡途径,从而对青光眼视神经起到保护作用。

关键词:通窍明目 IV 号;青光眼;Bcl-2;P53;Caspase

中图分类号:R-33;R775;R243 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)02-237-07

Mechanism of TongQiaoMingMu IV on the Mechanism of Optic Nerve Protection in Rats of Glaucoma Model*

DONG Fei-xue^{1,2}, SUN He¹, WANG Li-yuan¹, ZHAO Shuang¹, LI Yang², LIU Qing-jiao², LIU Xu^{2Δ}

(1 The first affiliated hospital, Heilongjiang university of Chinese medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China;

2 Heilongjiang university of Chinese medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China)

ABSTRACT Objective: To observe the intervention effects of different concentrations of TongQiaoMingMu IV on the expression of apoptosis-related proteins in glaucoma model rats. **Methods:** 42 SD rats were randomly divided into control group (n=7), model group (n=7), TongQiaoMingMu IV low dose group (n=7), medium dose group (n=7), high dose group (n=7) and neurotrophic group (n=7). The model of high intraocular pressure was established by injecting carbomer through the limbal of the anterior chamber of the eyeball. 21 days later, the drug was intragastrically administered for 4 weeks. The morphology of retina and optic ganglion cells were observed by HE staining. The expression of BCL-2, Bax and p53 protein was detected by immunohistochemical method, and the expression of Caspase-3 and Caspase-9 protein was determined by WesternBlot method. **Results:** Compared with the blank group, the positive expression of Bax and p53 in the model group increased significantly, while the positive expression of Bax and p53 protein decreased significantly in the neurotrophic group and TongQiaoMingMu IV high and medium dose groups compared with the model group. Compared with the blank group, the positive expression of Bcl-2 in the model group decreased significantly, and compared with the model group, the positive expression of Bcl-2 in the neurotrophic group and TongQiaoMingMu IV group increased in different degrees. The protein expression levels of caspase-3 and caspase-9 in the model group were higher than those in the control group, and the expression levels of Caspase3 and caspase-9 in the retina of rats in the neurotrophic group and TongQiaoMingMu IV group were significantly lower than those in the model group ($P<0.01$). **Conclusions:** TongQiaoMingMu IV may protect the optic nerve of glaucoma by down-regulating the expression of Bax and p53, increasing the expression of Bcl-2 and inhibiting the activation of apoptosis pathway of Caspase-3 and Caspase-9.

Key words: TongQiaoMingMu IV; Glaucoma; Bcl-2; P53; Caspase

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R775; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)02-237-07

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81674029);黑龙江省自然科学基金项目(QC2018115);黑龙江省中医药科研项目(ZHY-031);黑龙江中医药大学科研基金项目(201510)

作者简介:董霏雪(1983-),女,硕士,主治医师,黑龙江省中医药管理局重点专科学术继承人,国家中医药管理局区域诊疗中心学术继承人,主要研究方向:中医药防治青光眼、缺血性视神经病变;中医药防治糖尿病视网膜病变,电话:17604512059, E-mail: 437968675@qq.com

Δ 通讯作者:刘旭(1984-),男,硕士,实验师,主要研究方向:中医药防治痛风、肿瘤和阿尔兹海默症等退行性老年病的研究工作,

E-mail: godsend1984@126.com

(收稿日期:2021-06-27 接受日期:2021-07-23)

前言

青光眼作为首位不可逆的致盲眼病备受关注,主要特点是视神经损伤及视野缺损,主要危险因素是病理性眼压增高。青光眼是全世界不可逆失明的主要原因。全球 40 至 80 岁人群的青光眼患病率估计为 3.5%, 预计到 2040 年将有 1.118 亿人患有青光眼,目前可用的治疗方法不能逆转青光眼对视觉系统的损害,然而,早期诊断和治疗可以防止疾病的发展,在大多数情况下,青光眼是一种慢性疾病,需要终身治疗^[1]。青光眼的发病机制有表观遗传调控、细胞凋亡机制、氧化应激损伤、 β 淀粉样蛋白的神经毒性作用等多种说法,但确切的发病机制还未阐述清晰完整^[2]。其中细胞凋亡是公认的青光眼发病机制。

视网膜神经节细胞可能比其他中枢神经系统神经元更依赖线粒体,因为它们大量存在于眼球髓鞘的 RGC 轴突中。视神经 RGC 轴突中的线粒体特别依赖于周围血管系统的氧气和营养。值得注意的是,RGC 线粒体在所有视神经疾病中都受到影响,要么是因为与线粒体 DNA 相关的遗传缺陷,要么是由于视神经及其相关血液供应的变化,就像青光眼的情况一样^[3]。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 42 只 SD 大鼠(由黑龙江中医药大学实验动物中心提供),雌雄兼半,实验动物质量合格证号:SYXK(黑)2016-004,实验前检查大鼠双眼眼前节、眼底、眼压均正常。

1.1.2 实验仪器 手术显微镜、裂隙灯显微镜、笔式眼压计(Tono-pen)、组织切片机、酶标仪等。

1.1.3 实验试剂 水合氯醛、托吡卡胺滴眼液滴、卡波姆、地塞米松磷酸钠注射液、左氧氟沙星(可乐必妥)滴眼液等、Bcl-2、Bax 等免疫组化试剂盒。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 42 只 SD 大鼠随机分为:空白组,模型组,通窍明目 IV 号低、中、高剂量组,神经营养剂组,共计 6 组,每组 7 只。

1.2.2 模型制备 将 SD 大鼠固定于实验台面,0.5%丁卡因滴眼 2 或 3 次,每只眼抽取房水 10 μ L,随后由角膜缘注射等量含 0.3%卡波姆和 0.025%地塞米松的复方卡波姆-940 溶液,注射后棉签压迫注射孔 1 分钟,抗生素眼膏涂入结膜囊^[4,5]。高眼压标准为:基线眼压为 24 mmHg。

1.2.3 给药方法 实验证实,本模型视神经萎缩通常出现于模型复制成功后第 20 天,故选取模型复制后的第 21 天开始灌胃给药,给药期 28 天。通窍明目 IV 号高剂量组(11.25 g/Kg·d)灌胃;通窍明目 IV 号中剂量组(22.5 g/Kg·d)灌胃;通窍明目 IV 号低剂量组(45 g/Kg·d)灌胃;模型组给予等量生理盐水灌胃(100 mL/kg·d);神经营养剂组将 VitB1、VitB12 和胞磷胆碱钠片,根据体表面积算法,折算成人等效治疗量,研磨成粉,生理盐水稀释,灌胃给药。

1.2.4 取材方法 给药第 28 天禁食,次日实验动物麻醉,迅速摘出双眼眼球,保留球后视神经约 2-4 cm。去除晶体,玻璃体。部分眼球放于多聚甲醛中固定,用于 HE 染色及免疫组化指标测定;其余眼球放入液氮中保存,用于 Western Blot 检测。

1.2.5 检测指标 (1)常规检查:测量眼压(IOP):购入实验 SD 大鼠时测定 IOP 值,用于筛选合格实验动物(眼压在 10-21 mmHg 范围内为合格);模型复制前 1 天进行 IOP 测定保证各组实验动物 IOP 值统计学无差异。给药前一天和给药结束分别进行 IOP 测定。(2)病理形态学观察 HE 染色:固定好的网膜组织,经脱水,透明,包埋,切片完后置于二甲苯溶液中浸洗 2 次,每次 10 min,逐个浸泡梯度乙醇,每个浓度 1 min,苏木素染液染色 10 min,盐酸乙醇分色 10 s,0.2%氨水 30 s 返蓝。伊红染色 15 min,依次浸泡于梯度乙醇中,每个浓度 1 min,二甲苯浸泡 2 次,每次 10 分钟。封片后镜下观察视网膜各层形态,并对 RGCs 进行计数。(3)免疫组织化学法测定 Bax、Bcl-2 和 P53 蛋白表达:切片经二甲苯脱蜡,用梯度乙醇脱去二甲苯,之后蒸馏水浸泡 1 min,PBS 冲洗 3 min,将切片浸入柠檬酸缓冲溶液中,放入微波炉内加热,暴露抗原。滴加内源性过氧化物酶阻断剂孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。滴加山羊血清孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。滴加一抗,37 度孵育 90 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。滴加二抗,37 度孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加 DAB 溶液显色,孵育 5 min,镜下观察染色情况。弃去显色液,自来水冲洗终止反应。(4)Western Blot 法检测 caspase-3、caspase-9 蛋白表达:剪取眼球视网膜组织,匀浆,离心,取上清液,提取蛋白,制胶、灌胶,沸水浴煮沸 5 min。电泳,转膜,起胶,切胶,转印,转印后 TBST 摇床洗涤 2 次,PVDF 膜浸入封闭液,一抗孵育,TBST 洗涤,二抗孵育,TBST 洗涤,曝光。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计软件进行数据分析,采用方差分析或秩和检验;计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,($P < 0.05$ 为差异有统计学意义)。

2 结果

2.1 眼压

各组大鼠在实验前检测眼压,各组眼压均在 21 mmHg 以下,各级组间眼压无差异。模型复制后检测各组眼压,其中模型组 1 只大鼠角膜穿孔脱落;高剂量组及神经营养剂组各 1 只大鼠模型复制后眼压未达 24 mmHg;其余动物模型,眼压均 > 24 mmHg,且模型组、神经营养剂组、通窍明目高、中、低剂量各组大鼠眼压值无明显差异。

2.2 各组大鼠视网膜 HE 染色结果

空白组大鼠视网膜层次分明,各层细胞排列整齐、结构清晰完整,神经节细胞数量较多,胞核边界清晰呈椭圆形。模型组大鼠视网膜各层界限模糊,细胞排列疏松;神经节细胞数量稀少,神经元颗粒层,胞体分布不均;通窍明目 IV 号各剂量组视网膜层次分明,神经营养剂组和通窍明目 IV 号高剂量组视网膜结构清晰完整,神经节细胞数量较多。

2.3 通窍明目 IV 号对青光眼大鼠视网膜 Bax、Bcl-2 及 P53 的影响

与空白组对比,模型组视网膜 Bax 与 p53 阳性表达显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,神经营养剂组与通窍明目 IV 号中、高剂量组视网膜 Bax 与 p53 蛋白的阳性表达显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

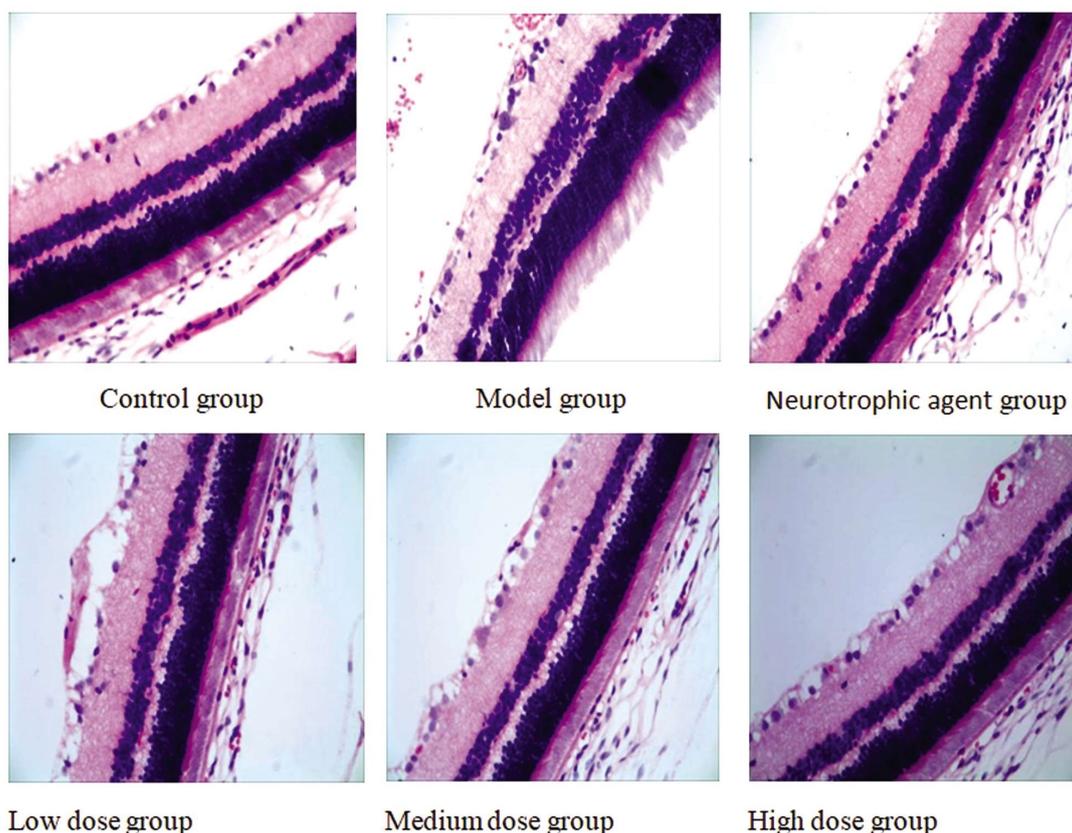


图 1 光学显微镜下各组大鼠视网膜病理结构变化情况(HE 染色, × 40)

Fig.1 The pathological changes of retina were observed under light microscope(HE staining, × 40)

与空白组比较,模型组视网膜 Bcl-2 阳性表达降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,神经营养剂组与通窍明目 IV 号低、中、高剂量组视网膜 Bcl-2 的蛋白表达均有不同程度的提高。(见 Table 1、Fig.2-4)。

表 1 各组视网膜 Bax、Bcl-2 与 P53 表达水平($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Each retina Bax, Bcl-2 and P53 expression level($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Bax	Bcl2	p53
control	6	0.24 ± 0.02**	0.27 ± 0.01**	0.13 ± 0.01**
Model	6	0.32 ± 0.02 [△]	0.15 ± 0.01 [△]	0.29 ± 0.01 [△]
Neurotrophic agent	6	0.25 ± 0.01**	0.22 ± 0.01 [△] **	0.18 ± 0.01 [△] **
High dose	6	0.26 ± 0.01 [△] **	0.23 ± 0.01 [△] **	0.18 ± 0.01 [△] **
Medium dose	6	0.28 ± 0.01 [△] **	0.19 ± 0.01 [△] **	0.24 ± 0.02 [△] **
Low dose	6	0.32 ± 0.02 [△]	0.17 ± 0.01 [△]	0.28 ± 0.01 [△]

Note: compared with control group [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; compared with model group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 通窍明目 IV 号对大鼠视网膜 caspase-3 及 caspase-9 蛋白水平的影响

由 Table 2 得知,通窍明目 IV 号给药干预组青光眼模型大鼠 caspase-3、caspase-9 的蛋白表达水平均高于空白组($P < 0.01$);与模型组比较,神经营养剂组与通窍明目 IV 号低、中、高剂量组大鼠视网膜 Caspase3 及 caspase-9 表达水平明显下降($P < 0.01$);与低剂量组比较,通窍明目 IV 号中、高剂量组 Caspase3 及 caspase-9 表达量相对更低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$);而通窍明目 IV 号高剂量组 Caspase3 及 caspase-9 蛋白表达量均低于低、中剂量组,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);神经营养剂组 Caspase3 及 caspase-9 表达水平与 IV

号高剂量组无显著性差异($P > 0.05$)(见表 2, Fig.5)。

3 讨论

高眼压是青光眼的主要危险因素,可直接损害视网膜神经节细胞,但相当一部分患者其眼压水平正常,但视神经仍然受损,然而文献也有报道,超过 90% 的日本青光眼患者的眼压水平是正常的^[6]。所以,青光眼的治疗不能仅仅是单一的控制眼压,还要在此基础上进行视神经的保护治疗,近年来中药对视神经的保护作用越发突显优势。

3.1 方药选择依据

青光眼归属于中医眼科“五风内障”范畴,其中以“青风

内障""绿风内障"多见。《内经》"肝开窍于目"中医认为只有肝气的冲和条达,眼才能辨色视物。青光眼患者多因七情所犯,导致肝气郁结,气血瘀滞,脉道阻塞,孙河教授^[7]认为青光眼的发生、发展与肝郁证密切相关,因此宜采用疏肝通窍明目之法。

通窍明目 IV 号以该法立方,主要组成药物有柴胡、当归、牡丹皮、葛根、郁金等。通窍明目 IV 号君臣佐使配伍合宜,全方共奏疏肝解郁,通窍明目之功。

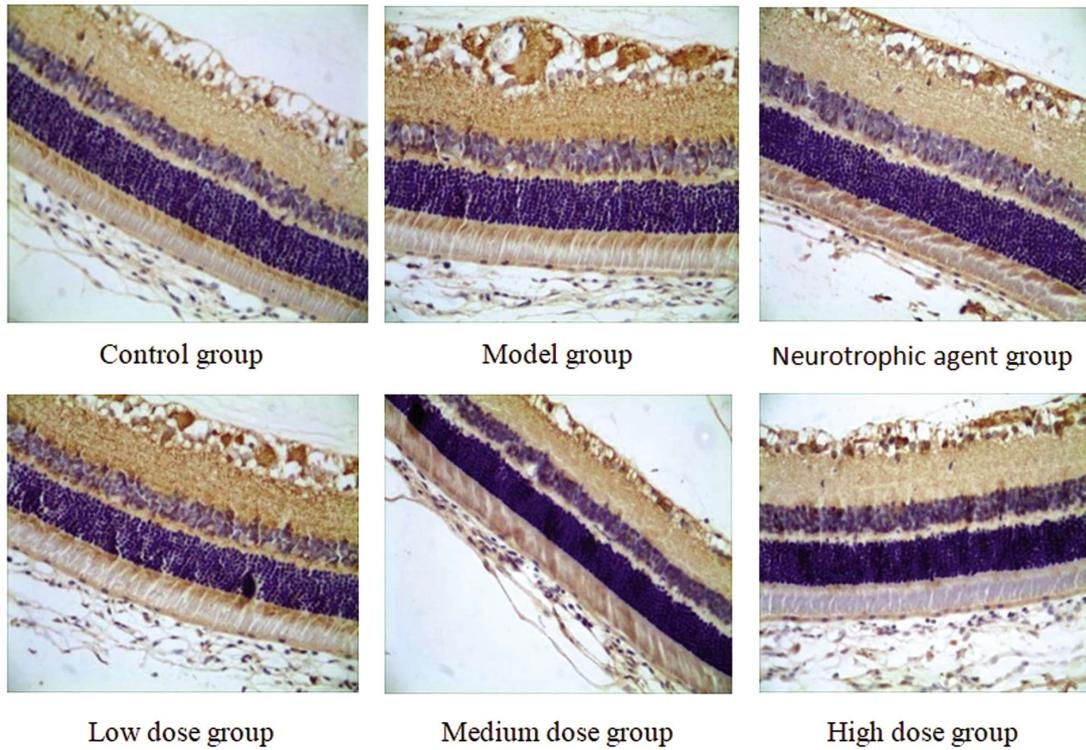


图 2 各组大鼠视网膜 Bax 免疫组化检测结果(× 40)

Fig.2 Results of retinal Bax immunohistochemistry in each group(× 40)

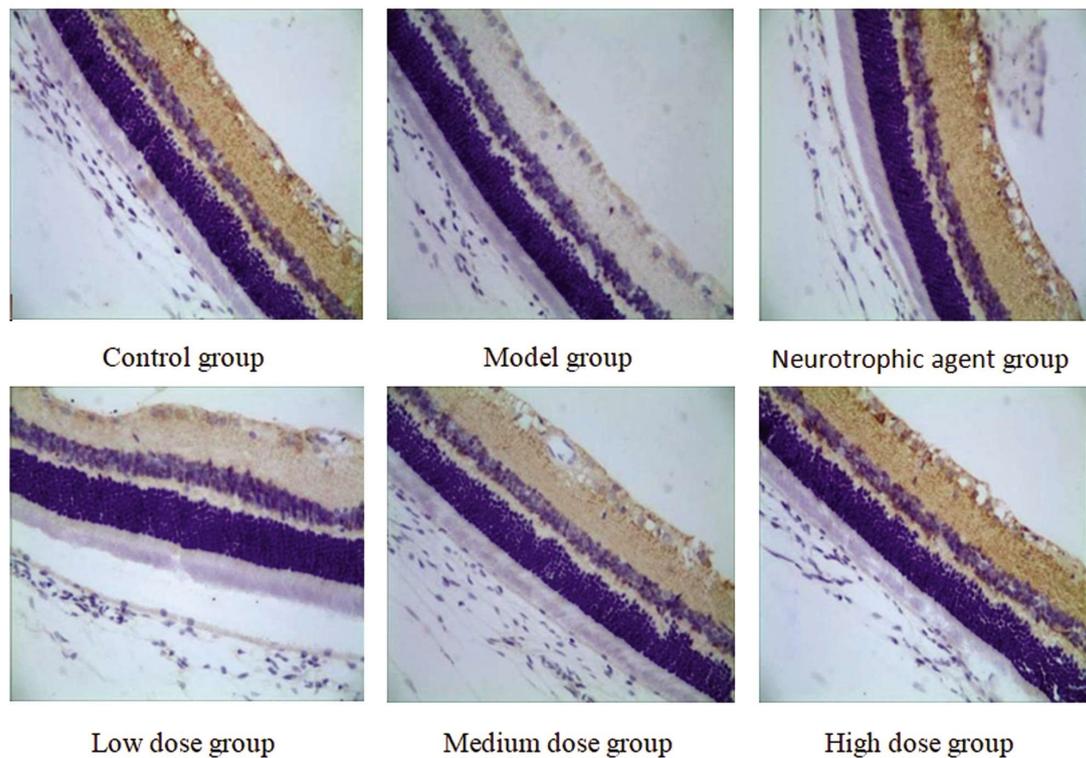


图 3 各组大鼠视网膜 Bcl-2 免疫组化检测结果(× 40)

Fig.3 Results of retinal Bcl-2 immunohistochemistry in each group(× 40)

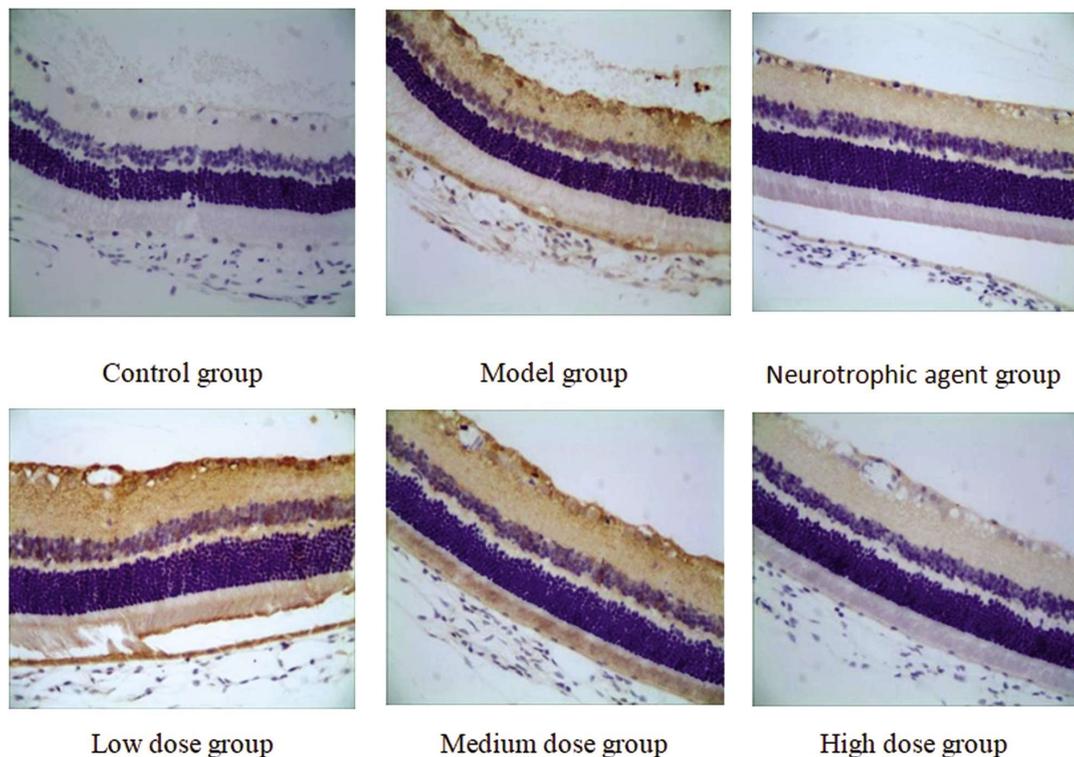


图4 各组大鼠视网膜 p53 免疫组化检测结果(× 40)

Fig.4 Results of retinal p53 immunohistochemistry in each group(× 40)

表2 各组大鼠视网膜凋亡蛋白 Caspase3、9 的表达水平

Table 2 Each rat retinal apoptosis protein Caspase3, 9 expression level

Group	Caspase3/ β -Tubulin	Caspase9/ β -Tubulin
Control	0.316 \pm 0.065 [△]	0.294 \pm 0.050 [△]
Model	1.364 \pm 0.105**	1.490 \pm 0.043**
Neurotrophic agent	0.450 \pm 0.035* [△]	0.470 \pm 0.024** [△]
High dose	0.485 \pm 0.018** [△]	0.483 \pm 0.013** [△]
Medium dose	0.541 \pm 0.039** [△]	0.541 \pm 0.016** [△]
Low dose	0.643 \pm 0.049** [△]	0.567 \pm 0.043** [△]

Note:compared with control group [△] P<0.05, ^{△△} P<0.01; compared with model group *P<0.05, **P<0.01.

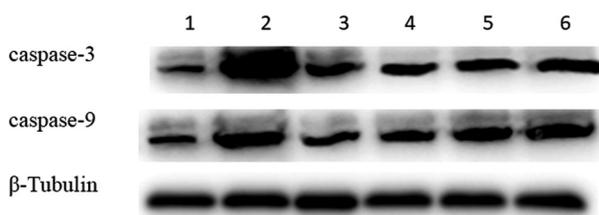


图5 各组大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-9 蛋白水平条带图

Fig.5 Banding map of Caspase-3 and caspase-9 protein levels in retina of rats in each group

孙河教授课题组于 2002 年开始系统的对通窍明目 IV 号做多方向的研究,已有临床观察证实通窍明目 4 号对青光眼患者的视野、视觉电活动、RNFL 平均厚度、全身不适中医症状等有改善,取得了满意的临床疗效^[8-13]。动物实验结果^[14]表明通窍明目 IV 号能减轻视网膜、视神经超微结构损伤。同时,后续实验研究^[15]还证明了通窍明目 IV 号对可通过上调青光眼大鼠视

网膜 MMP-9 的表达来发挥保护作用。为完善通窍明目 IV 号对青光眼视神经保护的作用机制,本文从细胞凋亡机制进行印证。

3.2 探讨通窍明目 IV 号对视网膜神经节细胞保护作用

前房注射复方卡波姆溶液可引起眼压长时间中度、稳步升高^[16],本研究采用此法成功制备了青光眼大鼠模型。此方法简便,容易操作,在模型成功复制 4 周后,模型组大鼠依然保持较高眼压,模型成功率较高。

青光眼的独立危险因素 - 病理性高血压所诱发的视神经损伤,通常伴随视网膜神经节细胞的死亡^[17],故 RGCs 凋亡被认为是青光眼的重要病理标志。对实验小鼠视网膜节细胞的研究有助于确定青光眼中轴突受损的位置,阐明视网膜继发性变性和神经炎症的机制等^[18]。

Bcl-2 家族蛋白主要有三大类:抑凋亡蛋白亚家族,主要包括 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 等;促凋亡蛋白亚家族,包括 Bax、Bak 和 Bok 等,以上两类蛋白含有 BH1、BH2、BH3、BH4 四个功能域;另一类促凋亡蛋白主要包括 Bid、Bim、Bad、Noxa 和

Puma 等,这一类蛋白因其只含有 BH3 结构域,也称为 BH3-only 亚家族^[19]。

Bax/bcl-2 诱导的调控途径则处于青光眼视网膜神经节细胞凋亡的核心位置,其中上调 Bcl-2 的表达能有效提高神经节细胞的存活率发挥抗凋亡的作用^[20]。本研究结果显示:模型组视网膜 Bcl-2 阳性表达低于空白组,两组间有显著性差异($P<0.01$),说明高眼压情况下,视网膜中 Bcl-2 表达受到明显抑制;与模型组比较,神经营养剂组与通窍明目 IV 号各剂量组,视网膜 Bcl-2 阳性表达升高;神经营养剂组和通窍明目 IV 号高、中剂量组与模型组比较,有显著性差异($P<0.01$),说明通过神经营养剂组或通窍明目 IV 号干预,可以显著提高视网膜中 Bcl-2 阳性表达。Bcl-2 具有抑制凋亡的作用,通过抑制细胞色素 C 释放、下调细胞内 Ca^{2+} 水平,抑制星形胶质细胞活化等方式发挥作用,Bcl-2 高表达时,Bax/Bcl-2 二聚体解离形成更稳定的 Bcl-2/Bcl-2 异二聚体,可抵消其诱导凋亡作用^[21]。不仅如此,Bcl-2 还能通过抑制的线粒体 pH 酸化引起 caspase-3、caspase-9 活性的激活,说明抗凋亡蛋白 Bcl-2 可通过 Caspase-9 和 Caspase-3 依赖性途径调节细胞凋亡^[22,23]。因此推测通窍明目 IV 号能够通过提高 Bcl-2 阳性表达,从而发挥抗凋亡作用。

正常环境下,视网膜中 Bcl-2 和 Bax 两种蛋白处于相对稳定的表达数量,从而能够维持神经节细胞的稳定,当某些诱因出现,如眼压升高,Bax 蛋白破坏了神经节细胞内的稳态,出现胞内高表达^[24]。本研究结果显示:与空白对照组对比,模型组大鼠视网膜 Bax 阳性表达显著升高,组间比较,有显著性差异($P<0.01$),验证了高眼压情况下,青光眼大鼠视网膜中 Bax 表达明显升高;与模型组比较,神经营养剂组和通窍明目 IV 号高、中剂量组视网膜 Bax 蛋白的表达显著下降,组间比较,有显著性差异($P<0.01$)。说明通过神经营养剂组或通窍明目 IV 号干预,可以显著抑制视网膜中 Bax 阳性表达。Bax 能促进细胞色素 c 的释放,如释放到细胞质,细胞色素 c 能够结合细胞凋亡诱导因子-1(Apaf-1)和 procaspase-9,形成凋亡体。凋亡体促进 procaspase-9 的剪切,以激活 caspase-9,随后激活 caspases-3,引发一系列的 caspase 激活^[24]。因此推测通窍明目 IV 号能够通过抑制 Bax 阳性表达,抑制凋亡体的形成,从而发挥抗凋亡作用。

此外,由多种因素介导激活的 p53 蛋白在缺氧介导的线粒体凋亡通路激活中也起着重要作用。在低氧应激 1 小时内,大约 2%的激活 p53 定位于线粒体并诱导细胞凋亡。这种 p53 反应引发了线粒体膜电位变化、细胞色素 c 释放和 procaspase-3 的激活^[25]。本研究结果显示:p53 与 Bax 的表达呈正相关,与 Bcl-2 表达呈负相关,当高眼压使视神经受损时,通过上调 p53 蛋白表达,诱导细胞发生凋亡,通过神经营养剂组或通窍明目 IV 号干预后,显著抑制视网膜 p53 的蛋白表达,从而减轻 Bax 与 caspase9 的激活,保护 RGCs 的存活率。

Caspase 家族成员与青光眼视网膜神经节细胞的凋亡联系紧密,其诱导的细胞凋亡均参与了视神经退行性病变、青光眼的发生发展^[26]。Caspase 家族主要有三种亚型(I 型、II 型、III 型),三者功能分别是细胞凋亡始动者、执行者、以及炎症介质反应的调节者,其中 caspase9 属于上述第一种,而 caspase3 属于上述第二种^[27]。本研究结果显示:与空白组比较,模型组大鼠

caspase-3、caspase-9 的阳性表达水平增高,组间比较,有显著性差异($P<0.01$);说明高眼压情况下,视网膜中 caspase-3、caspase-9 的蛋白表达水平明显升高;与模型组比较,神经营养剂组与通窍明目 IV 号各剂量组大鼠视网膜 Caspase3 及 caspase-9 表达水平明显下降,组间比较,有显著性差异($P<0.01$)。说明通过神经营养剂组或通窍明目 IV 号干预,可以显著降低视网膜中 caspase-3、caspase-9 阳性表达。因此推测,神经营养剂组或通窍明目 IV 号可通过抑制凋亡蛋白 caspase-3、caspase-9 延缓视神经细胞损失,保护青光眼导致的视损伤。

青光眼病理损伤中凋亡机制的研究,一直是眼科界的热点方向,多项研究表明中药有效成分或单味中药提取物通过对 Bax、Bcl-2、Caspase-3 等的调控参与了青光眼视神经保护,如李银鑫等^[28]将喂养 38 周龄自动成模的 DBA/2J 小鼠作为研究对象,应用青光安 II 号有效成分低、中、高剂量组作为干预收到,研究发现三组均可降低模型小鼠的 Caspase-3 蛋白的表达,抑制其活性,其中高剂量组效果最明显。杜红彦等^[29]研究认为高眼压模型组中 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达量均显著增加,而 Bcl-2 蛋白表达量显著降低,差异均有统计学意义,给予高眼压大鼠腹腔注射川芎嗪后发现,单味中药有效成分川芎嗪能抑制模型大鼠视网膜神经节细胞的 Bax、Caspase-3 蛋白表达。

本研究应用了以疏肝通窍立法的通窍明目 IV 号作为研究药物,该方为复方制剂,具有中药复方的多靶点特点,本研究的创新性的证实了该药对细胞凋亡的内部(即以线粒体作为核心成分去激活细胞凋亡)途径的部分影响机制,对线粒体凋亡上游及下游指标进行了较为全面的检测,包括线粒体上游的 P53、BCL-2、Bax,以及线粒体细胞下游凋亡启动者 Caspase-9、凋亡执行者 Caspase-3。

综上所述,推测通窍明目 IV 号,可能通过下调视网膜神经节细胞促凋亡因子 Bax、p53 的含量表达,促进抗凋亡因子 Bcl-2 的表达水平升高,继而抑制 caspase-9 和 caspase-3 的表达,从而抑制视神经节细胞凋亡的发生,有效改善青光眼大鼠的视神经损伤程度,从而对视神经起到保护作用。此外,研究证实:通窍明目 IV 号高、中、低剂量组视网膜 Bax、Bcl-2、P53、Caspase-3、Caspase-9 阳性表达均呈现明显组间差异,说明不同剂量通窍明目 IV 号对视神经凋亡相关蛋白表达影响存在一定程度的量效关系。但本研究仍存在不足,如通窍明目 IV 号通过何种途径抑制 Caspase-9 的表达、细胞线粒体内部发生怎样的改变,这些问题需在以后的实验中进行探讨研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Kang JM, Tanna A P. Glaucoma [J]. Medical Clinics of North America, 2021, 105(3): 493-510
- [2] 刘宇航,毛小雪,牛焜,等. 青光眼发病机制相关分子途径研究进展 [J]. 眼科新进展, 2021, 41(03): 290-295
- [3] Osborne N N, Núñez-álvarez C, Joglar B, et al. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection [J]. European Journal of Pharmacology, 2016, 787: 127-133
- [4] 庞国龙,于菲菲,孙河. 复方卡波姆构建高血压模型的视网膜形态学改变 [J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(02): 231-234
- [5] 庞国龙,孙河. 不同麻醉方式对大鼠高血压模型眼压值的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2017, 27(01): 8-10

- [6] Shinozaki Y, Koizumi S. Potential roles of astrocytes and Muller cells in the pathogenesis of glaucoma [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 145(3): 262-267
- [7] 孙河, 樊晓瑞, 董霏雪, 等. 原发性青光眼与中医肝郁体质关系的研究[J]. *中国中医眼科杂志*, 2019, 29(1): 42-46
- [8] 马歆瑜. 通窍明目IV号对肝气郁结型闭角型青光眼RNFLT的影响[D]. 黑龙江中医药大学, 2016
- [9] 邵霖霖. 通窍明目IV号联合苦碟子离子导入对青光眼视神经保护作用的临床研究[D]. 黑龙江中医药大学, 2017
- [10] 王山山, 董霏雪, 孙河, 等. 孙河从肝郁论治视神经萎缩经验[J]. *中国中医眼科杂志*, 2018, 28(04): 239-241
- [11] 张国坛. 疏肝通窍法对原发性闭角型青光眼视功能与肝郁体质改善的相关性研究[D]. 黑龙江中医药大学, 2019
- [12] 刘叶. 通窍明目IV号对肝郁型原发性青光眼视神经保护的疗效观察[D]. 黑龙江中医药大学, 2020
- [13] 付晋, 吕婧, 孙河, 等. 孙河应用疏肝通窍法治疗青光眼视神经萎缩经验总结[J]. *中国中医眼科杂志*, 2021, 31(01): 30-33
- [14] 樊晓瑞, 孙河, 庞国龙. 疏肝通窍法对青光眼视神经损害大鼠视网膜神经节细胞凋亡及视网膜、视神经超微结构的影响[J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2018, 20(08): 461-468
- [15] 蔡萧君. 基于疏肝通窍法对实验性青光眼基质金属蛋白酶及水通道蛋白表达的影响[D]. 黑龙江中医药大学, 2017
- [16] 孙河, 庞国龙, 尹丽颖. 复方卡波姆前房注射构建大鼠慢性高眼压模型的实验研究[J]. *中国中医眼科杂志*, 2014, 24(03): 157-162
- [17] Ueno S, Yoneshige A, Koriyama Y, et al. Early Gene Expression Profile in Retinal Ganglion Cell Layer After Optic Nerve Crush in Mice [J]. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2018, 59 (1): 370-380
- [18] Maes M E, Schlamp C L, Nickells R W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells [J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2017, 57: 1-25
- [19] 冯健愉, 朱玉山, 陈俭, 等. Bcl-2 家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(08): 1477-1489
- [20] Ye D, Shi Y, Xu Y, et al. PACAP Attenuates Optic Nerve Crush-Induced Retinal Ganglion Cell Apoptosis Via Activation of the CREB-Bcl-2 Pathway [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2019, 68(3): 475-484
- [21] 王雪维, 李燕. Bcl-2、Bax 在青光眼神经节细胞凋亡中的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(22): 4077-4079
- [22] Takahashi A, Masuda A, Sun M, et al. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm)[J]. *Brain Research Bulletin*, 2004, 62(6): 497-504
- [23] Cao R, Li K, Xing W, et al. Disabled-1 is down-regulated in clinical breast cancer and regulates cell apoptosis through NF- κ B/Bcl-2/caspase-9 [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(2): 1622-1627
- [24] 崔艳慧, 丁伟, 尚蕾, 等. 青光眼视网膜神经节细胞凋亡机制研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(29): 5754-5757
- [25] Vuong L, Conley S M, Al-Ubaidi M R. Expression and role of p53 in the retina [J]. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2012, 53 (3): 1362-1371
- [26] Lin C, Wu F, Zheng T, et al. Kaempferol attenuates retinal ganglion cell death by suppressing NLRP1/NLRP3 inflammasomes and caspase-8 via JNK and NF- κ B pathways in acute glaucoma [J]. *Eye*, 2019, 33(5): 777-784
- [27] 杨涛, 费振海, 钟兴明. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展[J]. *浙江医学*, 2018, 40(18): 2083-2091
- [28] 李银鑫, 蒋鹏飞, 曾志成, 等. 青光安 II 号方有效组分对青光眼模型 DBA/2J 小鼠视网膜中 RhoA、ROCK 及 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(6): 673-678
- [29] 杜红彦, 王蓉, 李建良, 等. 川芎嗪注射液对高眼压大鼠视网膜神经节细胞凋亡的作用机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37 (04): 389-392

(上接第 281 页)

- [25] 曲明卫, 王立敏, 朱兰, 等. 血清 NSE、MMP-10、s100 β 与急性脑梗死患者神经功能缺损程度的关系研究 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2020, 15(7): 408-409
- [26] Zhou S, Zhu W, Zhang Y, et al. S100B promotes microglia M1 polarization and migration to aggravate cerebral ischemia[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(11-12): 937-949
- [27] Garzelli L, Jacquens A, Amouyal C, et al. Secondary S100B Protein Increase Following Brain Arteriovenous Malformation Rupture is Associated with Cerebral Infarction[J]. *Molecules*, 2020, 25(21): 5177
- [28] 张石凯, 曹永兵. 赤芍的药理作用研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 2021, 39(2): 97-101
- [29] 苑婕, 贺虹, 张维金. 基于随机森林算法的赤芍成分-靶点-心脑血管疾病网络药理作用研究 [J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(11): 1391-1396
- [30] 刘钊, 钟菊迎, 高尔宁, 等. 栀子苷、川芎嗪和葛根素配伍对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中成药*, 2020, 42(7): 1754-1759