

·方药研究·

本文引用:周亚莎,徐 剑,彭 俊,刘 悦,杨毅敬,覃良艳,彭清华.青光安Ⅱ号对慢性高血压模型大鼠视网膜 GSK-3 β 及 β -catenin mRNA 表达影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(10):1049-1051.

青光安Ⅱ号对慢性高血压模型大鼠视网膜 GSK-3 β 及 β -catenin mRNA 表达影响

周亚莎¹,徐 剑¹,彭 俊²,刘 悦²,杨毅敬¹,覃良艳¹,彭清华^{1,2*}

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 观察青光安Ⅱ号方对慢性高血压模型大鼠视网膜 GSK-3 β 及 β -catenin mRNA 表达影响。方法 将 40 只 (80 眼) 雄性 SD 大鼠随机分成 6 组,分别为:空白组(A)、模型组(B)、青光安Ⅱ号方低剂量组(C)、青光安Ⅱ号方中剂量组(D)、青光安Ⅱ号方高剂量组(E)、益脉康分散片组(F)。将 B、C、D、E、F 组大鼠采用烧灼巩膜表浅静脉法建立大鼠慢性高血压模型。模型大鼠维持高血压状态 2 月后开始干预,干预后 2 周、4 周分别用 qPCR 检测大鼠视网膜 GSK-3 β 及 β -catenin mRNA 的相对表达量。结果 2 周后,与 B 组比较,各组 GSK-3 β mRNA 表达降低而 β -catenin mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。4 周后,与 F 组比较,C、D、E 组 GSK-3 β mRNA 降低, β -catenin mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 E 组比较,C、D 组 GSK-3 β mRNA 降低而 β -catenin mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 青光安Ⅱ号方及益脉康分散片均能抑制 GSK-3 β mRNA 的表达,并增加 β -catenin mRNA 的相对表达量,对慢性高血压大鼠视网膜神经节细胞有一定的保护作用;初步观察表明复方中药青光安Ⅱ号方在对慢性高血压大鼠视神经的保护中,效果优于益脉康分散片,且以青光安Ⅱ号方高剂量最优。

[关键词] 青光安Ⅱ号;慢性高血压;GSK-3 β mRNA; β -catenin mRNA

[中图分类号]R285.5;R775 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.010.001

Effect of Qingguangan II Decoction on Expression of GSK-3 β mRNA and β -catenin mRNA of Retinal Ganglion Cells in Chronic High Intraocular Pressure Model Rats

ZHOU Yasha¹, XU Jian¹, PENG Jun², LIU Yue², YANG Yijing¹, QIN Genyan¹, PENG Qinghua^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Qingguangan II decoction on expression of GSK-3 β mRNA and β -catenin mRNA of retinal ganglion cells in chronic high intraocular pressure model rats. **Methods** 40 (80 eyes) male SD rats were randomly divided into 6 groups, that is: blank group (A), model group (B), Qingguangan II low dose group (C), Qingguangan II medium dose group (D), Qingguangan II high dose group (E), Yimaikang dispersible tablets group (F). The rats in group B, C, D, E, F were established the model of chronic high intraocular pressure by the method of cauterizing of superficial scleral vein. Tissues of eyes were obtained after intragastric administration for 2 weeks and 4weeks. The relative expression of GSK-3 β mRNA and β -catenin mRNA was investigated by qPCR. **Results** At the time-point of 2-week, GSK-3 β mRNA and β -catenin mRNA in group B were statistically expressed comparing with other groups ($P<0.05$). Moreover, at the time-point of 4-week, GSK-3 β mRNA and β -catenin mRNA in group C, D and E were statistically expressed comparing

[收稿日期]2017-02-09

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81273807);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目资助;湖南省研究生科研创新项目(CX2017B426、CX2017B434);湖南省教育厅项目(17C1221);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目;湖南省中医五官科学重点学科建设项目。

[作者简介]周亚莎,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治青光眼、眼底病。

[通讯作者]*彭清华,男,二级教授,主任医师,博士研究生导师,E-mail:pqh410007@126.com。

with group F ($P<0.05$). Besides, GSK-3 β mRNA and β -catenin mRNA in group C and D were statistically expressed comparing with group E ($P<0.05$). **Conclusion** Qingguangan II decoction and Yimaikang dispersion tablets can effectively inhibit the expression of GSK-3 β and increase the expression of β -catenin to protect the optic nerve of rats with chronic high intraocular pressure. The experiment preliminarily indicated that, in the protection of optic nerve of rats with chronic high intraocular pressure, the high dose of Qingguangan II was the better choice.

[**Keywords**] Qingguangan II decoction; chronic high intraocular pressure; GSK-3 β mRNA; β -catenin mRNA

青光眼(glaucoma)是以视网膜神经节细胞及其轴突渐进性进而导致视盘的独特表现并伴随视力损失为特征的一组视神经病变疾病,是伴有特征性的视神经结构性损害和视野缺损的视神经病变^[1]。本病都具有视神经损害这一病理结局,其原因是各种病理因素导致了视网膜神经节细胞(retina ganglion cell, RGC)的损伤、变性、凋亡。持续高眼压状态是引起该视神经病变的主要危险因素。导师所在课题组在多年基础和临床研究发现,“血瘀水停”为青光眼早中期病机之一,故在古方补阳还五汤的基础上加减研制了治疗青光眼的纯中药制剂——青光安颗粒剂,并根据青光眼视神经损伤的中医病理机制,对青光安颗粒剂的组方进行优化,研发了青光安 II 号方。有研究表明,经典 Wnt 信号通路(Wnt/ β -catenin 信号通路)的改变会影响神经元的增殖、分化或对神经元产生毒性作用,导致神经元功能损伤^[2]。糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、 β 连环蛋白(β -catenin)是该信号通路上的重要蛋白。本实验观察青光安 II 号方对 SD 大鼠慢性高眼压模型中视网膜 GSK-3 β mRNA 及 β -catenin mRNA 表达水平的影响。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 40 只(质量合格证:43004700016136),2~3 月龄,由湖南中医药大学动物实验中心提供,体质量 180~200 g。

1.1.2 药品与试剂 复方中药青光安 II 号:由枸杞子、灯盏细辛等补肾活血中药组成,制成浸膏。益脉康分散片:湖南湘雅制药有限公司,批号:1506115。妥布霉素地塞米松滴眼液:齐鲁制药有限公司,批号:5040321PG。妥布霉素地塞米松眼膏:s.a. ALCON-COUREUR n.v. 批号:14129C。逆转录试剂盒(北京康为世纪),EDTA 及 Tris(Sigma 公司),Trizol(Invitrogen 公司),引物(南京金斯瑞公司),Taq 酶(Genstar 公司),DL2000 DNA Marker(Genstar 公司),dNTP(Genstar 公司),SYBGREEN PCR Mix(Invitrogen 公司)。

1.1.3 主要仪器 AVIA Tono-Pen(美国 Reichert 公司),Motic 6.0 数码医学图像分析系统(深圳市深沅恒科技有限公司),PIKO REAL 96 荧光定量

RCP 仪(Thermo 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 慢性高眼压动物模型的建立及分组干预 参照汪建涛等^[3]烧灼表浅巩膜静脉方法造模,术后眼压持续在 25 mmHg 以上 2 月视为造模成功。将大鼠随机分为:空白组(A 组)、模型组(B 组)、青光安 II 号低剂量组(C 组)、青光安 II 号中剂量组(D 组)、青光安 II 号高剂量组(E 组)、益脉康分散片组(F 组)。A、B 组以生理盐水 12 mL/kg 灌胃;C、D、E 组灌胃量分别为 6.75 g/(kg·d)、13.5 g/(kg·d)、27 g/(kg·d)(按“人-动物体表面积等效剂量比值表”折算,分别相当于成人等效剂量 1 倍、2 倍、4 倍);F 组每只灌胃 0.22 g/(kg·d)。每组均灌胃 2 周,1 次/d。

1.2.2 取材及指标检测 分别于干预后的第 2 周、第 4 周将大鼠麻醉,摘除双眼球。在解剖显微镜下去除眼前节及玻璃体,用显微镊子剥离出视网膜组织,保存于-80℃冰箱中,供 qPCR 检测 GSK-3 β mRNA 及 β -catenin mRNA。

Trizol 提取总 RNA,30 μ L 反应体系进行 RNA 反转录,在 NCBI 上搜索目的基因的序列,运用 primer 5 软件设计引物,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成引物。GSK-3 β -F:5'-CACATTCCTCGCACT-TACC-3',GSK-3 β -R:5'-AGCAGCCCATATCCACAT-3',产物长度:259 bp。 β -catenin-F:5'-AGGGCAATCCTGAGGAAGAAGA-3', β -catenin-R:5'-TGCCTGAAGGACTGGGAAA-3',产物长度:82 bp。30 μ L 体系行实时定量 PCR,定量 PCR 扩增程序 50℃ 2 min,95℃ 10 min;95℃ 5 s,60℃ 30 s 循环 40 次。2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件对实验结果进行分析,先进行正态性分布及方差齐性检验,若满足正态性和方差齐性,多组比较采用方差分析;不满足正态性和方差齐性时,则用非参数多重比较。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

干预 2 周后,与 B 组相比,其余各组视网膜上 GSK-3 β mRNA 表达和 β -catenin mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

干预 4 周后,与 B 组相比,其余各组视网膜上 GSK-3 β mRNA 表达降低而 β -catenin mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 F 组相比,C、D、E 组视网膜上 GSK-3 β mRNA 表达降低而 β -catenin mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 E 组相比,C、D 组 GSK-3 β mRNA 表达升高, β -catenin mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。说明青光安 II 号方可以抑制 GSK-3 β mRNA 及促进 β -catenin mRNA 的表达。

表 1 各组 GSK-3 β mRNA 及 β -catenin mRNA 相对

表达量 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	GSK-3 β mRNA		β -catenin mRNA	
	2 周	4 周	2 周	4 周
A 组	0.96 \pm 0.36	1.03 \pm 0.42	2.35 \pm 0.65	2.55 \pm 0.67
B 组	3.59 \pm 1.56	6.05 \pm 1.61	0.48 \pm 0.22	0.31 \pm 0.32
C 组	2.40 \pm 0.57*	2.23 \pm 0.73 $\Delta^{\#}$	0.96 \pm 0.57*	1.29 \pm 0.53 $\Delta^{\#}$
D 组	2.07 \pm 0.63*	2.11 \pm 0.84 $\Delta^{\#}$	0.99 \pm 0.65*	1.31 \pm 0.45 $\Delta^{\#}$
E 组	2.13 \pm 0.82*	1.53 \pm 0.36 $\Delta^{\#}$	1.16 \pm 0.83*	1.89 \pm 0.85 $\Delta^{\#}$
F 组	2.27 \pm 0.60*	2.78 \pm 0.53 $\Delta^{\#}$	0.81 \pm 0.20*	0.82 \pm 0.55 $\Delta^{\#}$
F 值	11.77	51.89	15.25	21.66

注:灌胃后第 2 周,与 B 组比较,* $P < 0.05$ 。灌胃后第 4 周,与 B 组比较, Δ $P < 0.05$ 。与 F 组比较, $\#P < 0.05$ 。与 E 组比较, Δ $P < 0.05$ 。

3 讨论

青光眼的治疗目前主要是通过药物或者手术将眼压降至靶眼压。随着传统的降低眼内压模式得到突破和发展,这些治疗方式虽可有效控制眼压,却不能改善由高眼压造成的视网膜神经节细胞凋亡、视力丧失、视野缺损。因此,在青光眼的治疗上,不仅要强调控制眼压,更应重视视神经的保护^[4]。因此,探讨针对高眼压状态下视神经损伤规范、有效、可行的治疗方案已经成为研究青光眼的主要方向。

传统中医学理论对于青光眼症状的描述,最早见于《太平圣惠方》卷三十二,并有绿风、乌风、青风、黄风、黑风等病名。慢性高血压导致视神经损伤主要的病因病机是肝肾亏损,神水淤积,气血失和,脉络不通,目中玄府闭塞。本研究使用的青光安 II 号方由枸杞子、灯盏细辛等补肾活血中药组成。该方补通兼施,使目窍通畅,气血调和,则诸症俱解。

Wnt/ β -catenin 信号通路是广泛存在于多细胞真核生物中的高度保守的信号通路,主要由细胞外因子 Wnt、跨膜受体卷曲蛋白(Frizzled)、GSK-3 β 、 β -catenin、轴蛋白(Axin)及 T 细胞因子/淋巴样增强因子(T cell factor/lymphoid enhancing factor,TCF/LEF)等组成,其调节多种基因的转录,参与调控生物体的生长、发育以及细胞的增殖、分化和凋亡等重要的生

理病理过程。Wnt/ β -catenin 信号传导通路是一个蛋白网络,通过将信号从细胞表面传达到细胞核中 DNA 的方式来调控基因表达,在胚胎和成年期的细胞通讯过程中具有关键性作用。同时,该信号通路参与神经干细胞增殖、分化过程,对神经干细胞发育成神经元和胶质细胞及神经前体细胞的自我更新和增殖具有至关重要的作用^[5-6]。有研究表明,通过抑制 GSK-3 β ,可激活 β -catenin 活性,在体外发挥减少神经元凋亡的作用^[7], β -catenin 的激活进而促进了神经细胞在异常状态下存活^[8]。

本次研究中,课题组采用烧灼表浅巩膜静脉的方法使 SD 大鼠处于慢性高血压状态,观察青光安 II 号方低、中、高剂量组及益脉康分散片组对慢性高血压 SD 大鼠视神经损伤后视网膜 GSK-3 β mRNA、 β -catenin mRNA 的表达影响。研究表明,青光安 II 号方低、中、高剂量组对 GSK-3 β mRNA 的抑制作用及对 β -catenin mRNA 表达的促进作用优于益脉康分散片组,以青光安 II 号方高剂量灌胃后 4 周效果最优。本动物实验研究初步阐明青光安 II 号方可对慢性高血压大鼠视神经损伤有保护作用,推测其作用机制之一为抑制 GSK-3 β mRNA 的表达,进而促进 β -catenin mRNA 表达,从而在一定程度上激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进神经细胞的增殖和存活能力,提高神经干细胞的分化能力,并且减少神经元的凋亡而保护高眼压状态下视网膜及视神经。

参考文献:

- [1] 刘家琦,李凤鸣.实用眼科学[M].第 3 版.北京:人民卫生出版社,2014:341.
- [2] 张彩霞,管英俊,陈燕春,等.经典 Wnt 信号通路神经退行性疾病关系的研究进展[J].解剖科学进展,2013,19(1):96-99.
- [3] 汪建涛,许迅,Alfredo A. Sadun,等.大鼠慢性高血压诱导视神经损伤的研究[J].上海交通大学学报(医学版),2008,28(6):622-625.
- [4] Pacale A, Drago F, Govoni S. Protecting the retinal neurous from glaucoma:lowering ocular pressure is not enough[J]. Pharmacol Res, 2012, 66(1):19-32.
- [5] Brault V. Inactivation of the β -catenin gene by Wnt1-Cremediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development[J]. Development,2001,12(1):1253-1264.
- [6] Chen A, Walsh CA. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors[J]. Science, 2002,297(5580):365-369.
- [7] 卢志有,林斌.信号通路脊髓损伤后神经细胞修复研究进展[J].中国脊柱脊髓杂志,2011,21(7):610-614.
- [8] Gao K, Wang YS, Yuan YJ, et al. Neuroprotective effect of rapamycin on spinal cord injury via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Neural Regen Res, 2015,10(6):951-957.

(本文编辑 杨 瑛)