

本文引用:谭涵宇,李建超,彭俊,文小娟,周亚莎,彭清华.蛭螭不同途径给药对干性年龄相关性黄斑变性模型 Caspase-3、FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(5):499-503.

蛭螭不同途径给药对干性年龄相关性黄斑变性模型 Caspase-3、FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达的影响

谭涵宇¹,李建超^{1,2*},彭俊¹,文小娟¹,周亚莎¹,彭清华^{1*}

(1.湖南中医药大学中医眼科学重点学科,湖南长沙 410208;2.陕西省西安市中医院眼科,陕西西安 710001)

[摘要] **目的** 研究蛭螭提取物口服和滴眼两种途径对年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)模型干预机制。**方法** 采用光损伤方法建立干性 AMD 活体模型,分别予以蛭螭提取物口服和滴眼,用药 4 周后,观察其对各细胞层半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine aspartic acid-specific protease 3,Caspase-3)、核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)、跨膜蛋白(Fas ligand,FasL)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)表达的影响。**结果** 与空白组比较,模型组视网膜组织中的 Caspase-3 表达明显下降,FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达均增强($P<0.05$),口服组和滴眼组组织中各项指标差异均无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,口服组和滴眼组中 Caspase-3 表达明显升高,FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达明显降低;与口服组比较,滴眼组所有指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 蛭螭提取物对感光细胞等细胞凋亡具有调节作用,表现为早期抑制,晚期促进。其调节作用可能是通过抑制或促进细胞凋亡关键因子 Caspase-3 表达实现的,同时通过抑制炎症相关因子 FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达对慢性炎症具有抑制作用。

[关键词] 蛭螭提取物;给药途径;年龄相关性黄斑变性;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3;肿瘤坏死因子 α ;跨膜蛋白;核转录因子 κ B

[中图分类号]R285.5;R774.1

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.05.003

Effect of Different Drug Administration Approaches of Grub on the Expression of Caspase-3, FasL, TNF- α and NF- κ B of Age-Related Macular Degeneration Models

TAN Hanyu¹, LI Jianchao^{1,2*}, PENG Jun¹, WEN Xiaojuan¹, ZHOU Yasha¹, PENG Qinghua^{1*}

(1. Key Discipline of Ophthalmology of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Department of Ophthalmology, Shaanxi Hospital of TCM, Xi'an, Shaanxi 710001, China)

[Abstract] **Objective** To study the interventional mechanism of oral administration and eye drops of the grub extract on the age-related macular degeneration (AMD) model. **Methods** A Dry AMD living model was established by light damage method. Models were given grubs extract oral administration and eye drops respectively. After 4 weeks, the expression of cysteine aspartic acid-specific protease 3 (Caspase-3), nuclear factor- κ B (NF- κ B), Fas ligand (FasL), tumor necrosis factor- α (TNF- α) was observed. **Results** Compared with the blank group, the expression of Caspase-3 in the retina tissue of model group decreased significantly, and the expression of FasL, TNF- α and NF- κ B increased ($P<0.05$). Compared with the blank group, all indexes of the oral and eye drops groups had no significant difference ($P>0.05$). Compared with

[收稿日期]2017-03-01

[基金项目]湖南省中医药科研重点项目(201438);中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);湖南省研究生创新课题(CX2014B352);长沙市科技计划项目(KC1704005);湖南省中医五官科学重点学科建设项目;中央财政支持地方高校资助项目。

[作者简介]谭涵宇,男,讲师,博士,研究方向:中西医结合治疗眼病。

[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;李建超,男,博士,主任医师,E-mail:27213623@qq.com。

the model group, the expression of Caspase-3 increased significantly in the oral group and the eye drops group, and the expression of FasL, TNF- α and NF- κ B decreased significantly. Compared with the oral group, there was no significant difference in all indicators in the eye drops group ($P>0.05$). **Conclusion** Grub extract has regulating action on photoreceptor cells apoptosis, such as performance for early suppression and lately acceleration. Its regulating effect is probably achieved by inhibiting or promoting the expression of Caspase-3. Grub extract shows inhibiting effect on chronic inflammation by inhibiting the expression of related inflammation factors, such as FasL, TNF- α , NF- κ B.

[Keywords] grub extract; administration route; age-related macular degeneration; cysteine aspartic acid-specific protease-3; tumor necrosis factor- α ; fas ligand; nuclear factor- κ B

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD),是一种与年龄有关的黄斑区视网膜组织退行性病变,本课题组前期研究证实:蛭螭提取物对大鼠视网膜的光损伤具有保护作用,可以促进 HSP79 的高表达,使视网膜视神经细胞得到有效保护,可减轻组织损伤^[1-2];能增强视网膜组织中碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)的表达、抑制神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)的表达,促进光凝后的视网膜修复^[3];能促进实验性有色兔脉络膜新生血管(choroidal neovascularization,CNV)中血管生成素 1(angiotensin-1,AngI)的高表达,减少色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived Factor,PEDF)的表达,也可以抑制有色家兔 CNV 中的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和 bFGF,从而抑制 CNV 的形成^[4-5]。蛭螭可通过活化 NF- κ B 信号通路,有效地减轻光损伤诱发的光感受器细胞的凋亡,从而发挥防护作用^[6]。蛭螭还能够改善视网膜局部微循环,减轻缺血缺氧对血管内皮细胞的损害^[7]。本实验拟通过对蛭螭提取物口服、滴眼两种给药途径干预治疗干性 AMD 模型大鼠眼。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

成年 SD 大鼠 40 只,SPF 级,体质量 180~220 g,实验前排除全身性及眼部疾患,动物由湖南斯莱克景达动物实验有限公司提供,许可证号:SYXK(湘)2013-0004,在湖南中医药大学实验动物中心清洁级条件下饲养。

1.2 主要药品及试剂

蛭螭提取物:由湖南中医药大学药学院提供,分别按药物制剂工艺制成口服、滴眼剂^[8]。

NF- κ B 一抗兔源性抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:Bs-0465R),TNF- α 一抗兔源性抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA0131),FasL

一抗兔源性抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA0049),Caspase-3 一抗兔源性抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA2142),SP-9000 通用型免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:WP132713)DAB 浓缩型显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:K142415E)。

1.3 主要仪器

裂隙灯显微镜(日本托普康公司),YD-A 型生物组织摊片机(上海金迪生物技术工程有限公司),Motic BA410 研究型显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司),Motic 6.0 数码医学图像分析系统(麦克奥迪实业集团有限公司),Leica 石蜡切片机(德国 Leica 公司),H7700 透射电子显微镜(日本日立公司),Eppendorf centrifuge 58108 高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

1.4 分组及干预

选用 8 周龄 SD 大鼠 40 只随机分成 A、B、C、D 4 组,分别为:空白组(A 组)、模型组(B 组)、口服组(C 组)、滴眼组(D 组)。C 组予以蛭螭提取物口服剂灌胃,1 次/d,5.6 g/(kg·d),D 组予以蛭螭提取物局部滴眼,4 次/d,A、B、D 组每日以生理盐水 2 mL 灌胃,A、B、C 各组同时予以玻璃酸钠滴眼液滴眼,4 次/d,1 滴/次。在造模起分别开始给药,连续 4 周。

1.5 视网膜光损伤模型的建立

采用自制光化学损伤装置^[9]:在光照架的 6 个面分别放置 1 根 40 W 的白色荧光灯管。调节光照强度,并用 ZDS-10 型数字式照度计测定大鼠活动水平多点照度,平均为(2 000 \pm 200)lx。动物房的室温控制在 21~24 $^{\circ}$ C,光照箱内的平均温度为 22~25 $^{\circ}$ C。所有实验动物在 12 h 明(30~50 lx)及 12 h 暗环境下循环光环境适应 7 d,自由摄食水。7 d 后光照前先暗适应 24 h,然后光照 12 h(晚上 8:00~次日早上 8:00),再进行暗适应 12 h,连续 3 个循环,光照时间总计为 36 h。大鼠不散瞳,可在光照箱内

自由活动,光照后送回暗环境中饲养。空白组不施行光照试验。

1.6 取材及指标检测

给药结束后,2%戊巴比妥钠过量(>0.2 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,固定大鼠,摘除眼球,眼球标记定位。各组眼球经多聚甲醛固定,免疫组化检测(参照试剂盒说明书操作步骤)核转录因子 κ B(NF- κ B)、膜表面分子(FasL)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3);采用Motic 6.0数码医学图像分析系统定量测量,视网膜各组织细胞层 Caspase-3、FasL、TNF- α 、NF- κ B 等指标的阳性积分光密度。

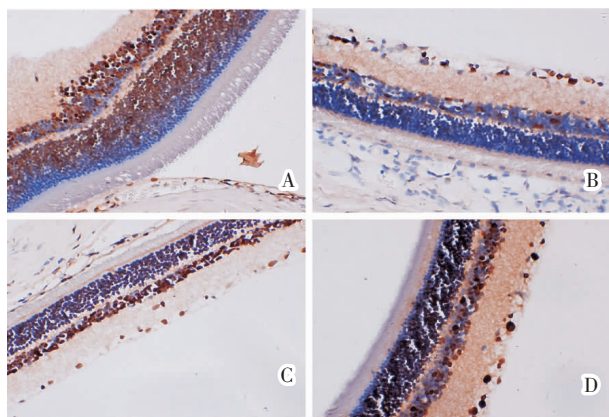
1.7 统计方法

所有实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,用SPSS 19.0进行统计学处理。各组间光密度值采用单因素方差分析ANOVA,并进行方差齐性检验,组间两两比较用采用LSD(L)检验,Dunnett(E)双侧控制。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P<0.01$ 表示差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 蛭螭提取物对视网膜组织 Caspase-3 表达的影响

空白组视网膜内界膜及内核层细胞浆细胞核中 Caspase-3 阳性物质表达较少,呈棕黄色,视网膜各层组织细胞结构清晰,排列整齐。模型组视网膜内界膜、内核层、外核层细胞浆细胞核中 Caspase-3 阳性物质表达明显,呈棕褐色,视网膜各层组织细胞结构出现紊乱。口服组和滴眼组视网膜内界膜、内核层细胞核及细胞浆中 Caspase-3 阳性物质表达程度明显较模型组减少,呈棕黄色,滴眼组减少更为明显,视网膜各层组织细胞结构清晰,排列整齐。见图1。

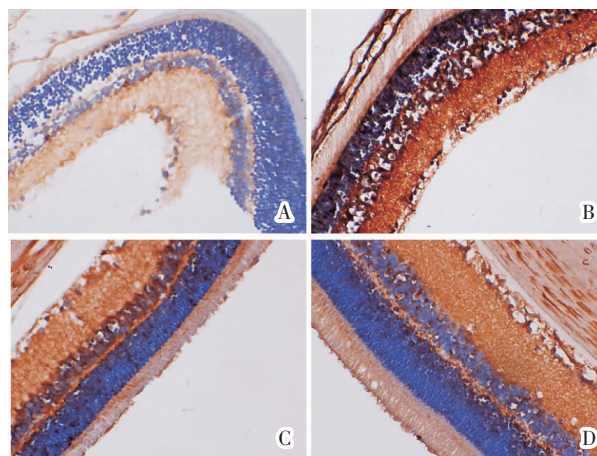


注:A.空白组;B.模型组;C.口服组;D.滴眼组。

图1.视网膜组织表达 Caspase-3 的免疫组化结果($\times 400$)

2.2 蛭螭提取物对视网膜组织 FasL 表达的影响

空白组视网膜各层细胞浆细胞核中 FasL 阳性物质表达较少,呈棕黄色,视网膜各层组织细胞结构清晰,排列整齐。模型组各层细胞浆细胞核中 FasL 阳性物质表达明显,呈棕褐色,视网膜各层组织细胞结构出现紊乱。口服组和滴眼组各层细胞浆细胞核中 FasL 阳性物质表达程度明显较模型组减少,呈棕黄色,视网膜各层组织细胞结构清晰,排列整齐。见图2。

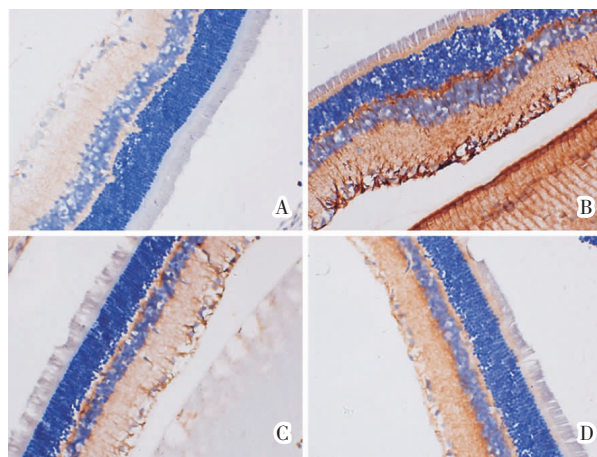


注:A.空白组;B.模型组;C.口服组;D.滴眼组。

图2.视网膜组织表达 FasL 的免疫组化结果($\times 400$)

2.3 蛭螭提取物对视网膜组织 TNF- α 表达的影响

空白组视网膜各层细胞浆中 TNF- α 阳性物质表达较少,呈浅黄色,视网膜各层组织细胞结构清晰,排列整齐。模型组内界膜、神经纤维层、内外丛状层、内颗粒层以及光感受器内节细胞浆中 TNF- α 阳性物质表达明显增多,呈棕褐色,视网膜内外颗粒层组织细胞结构出现紊乱。口服组和滴眼组各层细胞浆中 TNF- α 阳性物质表达程度明显较模型组减少,呈棕黄色,视网膜各层组织细胞结构清晰,排列整齐。见图3。

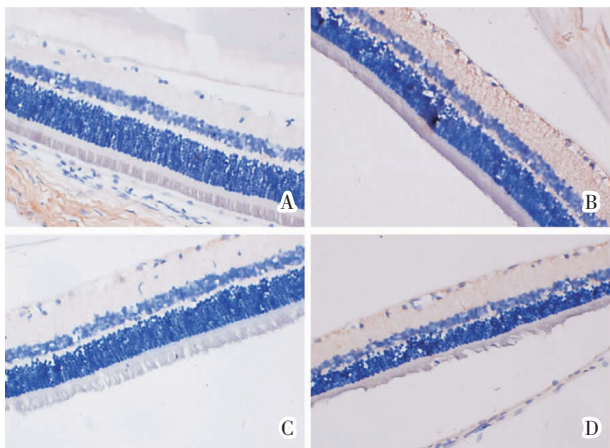


注:A.空白组;B.模型组;C.口服组;D.滴眼组。

图3.视网膜组织表达 TNF- α 的免疫组化结果($\times 400$)

2.4 蛭螭提取物对视网膜组织 NF- κ B 表达的影响

空白组视网膜内界膜、感光细胞外节 NF- κ B 阳性物质少量表达,呈浅黄色,视网膜各层组织细胞结构清晰,排列整齐。模型组内界膜、神经纤维层、内外丛状层以及光感受器外节中 NF- κ B 阳性物质表达较多,呈棕黄色。口服组和滴眼组内界膜、感光细胞外节 NF- κ B 阳性物质少量表达,呈浅黄色,视网膜各层组织细胞结构清晰,排列整齐。见图 4。



注:A.空白组;B.模型组;C.口服组;D.滴眼组。

图 4 视网膜组织表达 NF- κ B 的免疫组化结果($\times 400$)

2.5 各组视网膜 Caspase-3、FasL、TNF- α 、NF- κ B 的光密度值检测结果

给药 4 周后检测,视网膜组织中 FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达均增强,经蛭螭提取物口服或滴眼后,在一定程度上抑制了其高表达。与空白组比较,模型组视网膜组织中的 Caspase-3 表达明显下降,FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达均增强($P < 0.05$),口服组和滴眼组组织中各项指标均无显著性差异($P > 0.05$);与模型组比较,口服组和滴眼组中 Caspase-3 表达明显升高,FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达明显降低($P < 0.05$);与口服组比较,滴眼组中 Caspase-3、FasL、TNF- α 、NF- κ B 的光密度值均无显著性差异($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 视网膜各细胞层 Caspase-3、FasL、TNF- α 、NF- κ B 的光密度值比较 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

分组	Caspase-3	FasL	TNF- α	NF- κ B
空白组	0.81 \pm 0.17	0.60 \pm 0.12	0.44 \pm 0.10	0.28 \pm 0.12
模型组	0.69 \pm 0.14**	0.74 \pm 0.16*	0.56 \pm 0.11**	0.39 \pm 0.11*
口服组	0.84 \pm 0.16 $\Delta\Delta$	0.62 \pm 0.15 Δ	0.45 \pm 0.09 Δ	0.29 \pm 0.09 Δ
滴眼组	0.79 \pm 0.17 $\Delta\Delta$	0.56 \pm 0.16 $\Delta\Delta$	0.46 \pm 0.13 Δ	0.30 \pm 0.11 Δ
F 值	3.28	5.25	5.12	4.39

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

蛭螭为金龟子幼虫。味咸,微温,有小毒,归肝经。具有破血、行瘀、散结、通乳的作用,可治疗折损瘀痛、痛风、破伤风、喉痹、目翳、丹毒、痈疽、痔漏。含有丰富的氨基酸、多肽或蛋白质、脂肪、外细胞糖酶、蔗糖酶等多种酶;Cu、Mn 含量非常丰富,Ca、Mg、Cr、Fe、Zn 含量其次,K/Na 的比值也很高;B 族维生素的含量较高,维生素 A 和维生素 E 的含量也较丰富^[9]。其药理作用主要有收缩血管、利尿、抗肿瘤、抗菌、保肝等作用。

大量的实验研究发现视网膜感光细胞、神经节细胞、色素上皮细胞均存在细胞凋亡,视网膜的发育过程中神经细胞的凋亡对神经细胞的增生、迁移与死亡发挥着重要的作用,一旦生长与死亡之间的平衡遭到破坏,将导致视网膜的发育异常^[10-13]。目前认识的细胞凋亡的通路主要有两条:膜受体通路、细胞色素 C 释放和 Caspases 激活的生物化学途径。不管那条途径,Caspase 即半胱天冬蛋白酶在凋亡过程中是起着必不可少的作用,细胞凋亡的过程实际上是 Caspase 不可逆有限水解底物的级联放大反应过程。本实验结果表明:在光损伤 4 周后,光损伤活体干性 AMD 动物模型眼 Caspase-3 的表达降低,而经蛭螭提取液干预治疗后,其表达又有所恢复,维持到正常水平。而前期研究显示:造模 1 周后,模型组 Caspase-3 表达升高,蛭螭提取液可以降低视网膜组织中 Caspase-3,两者结果似乎存在矛盾。Caspase-3 作为细胞凋亡的效应凋亡蛋白酶,对细胞的凋亡起到承上启下的作用,因此 Caspase-3 的表达与视网膜感光细胞等细胞凋亡关系密切,其表达程度在一定程度上反应了细胞凋亡程度。本实验结合前期实验证实:在动物眼光损伤初期,存在 Caspase-3 高表达,光损伤导致感光细胞等细胞凋亡的发生,而在 4 周后 Caspase-3 表达受到抑制。这与 Lee 等^[11]研究:特定波长和强度的绿色光源对鼠视网膜的损伤,发现持续光照 24 h,感光细胞丧失 25%~50%,随光照时间延长,感光细胞丧失,速度明显减慢,直至 2~4 周后,感光细胞处于稳定状态。几乎一致,即在光损伤早期即出现感光细胞凋亡,到后期感光细胞凋亡维持稳态甚至有所减少。蛭螭提取液在光损伤早期(1 周),可以降低 Caspase-3 的高表达,而在晚期(4 周)可以使低的 Caspase-3 的有所升高,维持正常水平,从而证实蛭螭提取液对感光细胞的凋亡早期有抑制作用,而晚期对细胞凋亡有促进作用,其对视网

膜组织的细胞凋亡具有调节维持稳态的作用。也正是这种调节作用使脱落的感光细胞外节及衰老丧失功能的细胞及残杂得以有效清除,维持了视网膜组织原有的新陈代谢、有助于重新恢复细胞死亡与增殖的平衡。

造模4周后,视网膜组织中的 FasL、TNF- α 、NF- κ B 表达均明显升高,进一步表明大鼠经视网膜光损伤4周后,FasL、TNF- α 、NF- κ B 并不是通过调控细胞凋亡途径发挥作用,而是共同参与了 AMD 的慢性炎症过程,FasL、TNF- α 、NF- κ B 作为炎症相关因子的共同升高,也反证了 AMD 光损伤模型眼存在长期的慢性炎症过程。经蛭螭治疗后,FasL、TNF- α 、NF- κ B 高表达得到了抑制,表明蛭螭提取液对光损伤 AMD 模型眼慢性炎症过程具有抑制作用,减少了慢性炎症反应对感光细胞及神经细胞的损害。其作用机制可能是通过对膜受体蛋白 FasL 的影响,进而抑制 NF- κ B 信号通路的活化,减少了巨噬细胞等对 TNF- α 等炎性因子的释放来实现的。

观察蛭螭提取物口服和滴眼对光损伤诱导活体干性 AMD 模型眼的影响,对 Caspase-3、FasL、TNF- α 、NF- κ B 等表达的影响效应一致。证实蛭螭提取物滴眼亦能在光损伤早期减轻感光细胞的凋亡,光损伤后期促进细胞凋亡,减轻炎症反应,从而对干性 AMD 同样具有良好的治疗作用。

参考文献:

[1] 张波涛,彭清华,叶群如,等.蛭螭对兔视网膜静脉阻塞模型 iNOS

表达的干预研究[J].湖南中医药大学学报,2008,28(1):25-28.

- [2] 叶群如,彭清华,张波涛.蛭螭对实验性视网膜静脉阻塞兔 HSP70 表达的影响及意义[J].中国中医眼科杂志,2008,18(5):261-263.
- [3] 江运长,杨霞,彭清华,等.益气活血法干预兔视网膜激光损伤修复的组织形态学观察[J].中国中医眼科杂志,2011,21(2):63-65.
- [4] 邱晓星,彭清华,陈梅,等.蛭螭提取物对兔脉络膜新生血管中 Ang1 和 PEDF 表达的影响[J].国际眼科杂志,2012,12(11):2053-2058.
- [5] 陈梅,邱晓星,彭清华,等.蛭螭提取物对兔脉络膜新生血管 VEGF 和 bFGF 表达的影响[J].国际眼科杂志,2008,8(12):2443-2448.
- [6] 吴大力,谭涵宇,彭清华.蛭螭提取物对大鼠光损伤视网膜变性 NF- κ B 表达及核转位的影响[J].湖南中医药大学学报,2012,32(5):35-38.
- [7] 张波涛,彭清华,叶群如,等.蛭螭提取物对兔视网膜静脉阻塞模型视网膜组织 ET-1 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2012,32(9):8-11.
- [8] 阳长明,侯世祥,罗杰英,等.蛭螭滴眼液的工艺研究[J].中成药,2001,23(4):235-237.
- [9] 张庆镐,朴奎善,李基俊,等.蛭螭矿物元素和维生素含量分析[J].微量元素与健康研究,2002,19(1):30-31.
- [10] 游庆朋,史为博,刘洁,等.大鼠视网膜发育过程中细胞增殖与凋亡的形态学[J].解剖学杂志,2015,38(3):272-274.
- [11] LEE FL, GURNE D, LIU D, et al. Effect of different schedules of intermittent light exposures on the rat retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, 30(suppl):461.
- [12] SHAHINFAR S, EDWARD D P, TSO MOM. A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury[J]. Curr Eye Res, 1991, 10(1):47-59.
- [13] 周咏东,严密.可见光照对培养的人视网膜色素上皮细胞凋亡的影响[J].中华眼底病杂志,2002,18(3):227-230.

(本文编辑 杨 瑛)