

·实验研究·

本文引用:吴凯,陈立浩,时健,刘倩宏,姚小磊. 青光安颗粒剂对 DBA/2J 小鼠视神经中自噬途径相关蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(4): 536-541.

青光安颗粒剂对 DBA/2J 小鼠视神经中自噬途径 相关蛋白表达的影响

吴凯^{1,2,3}, 陈立浩^{2,4}, 时健^{1,2,3}, 刘倩宏^{1,2,3}, 姚小磊^{1,3*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;
3.中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;4.河北省眼科医院,河北邢台 054000)

〔摘要〕目的 研究青光安颗粒剂(以下简称为青光安)对自发性青光眼模型 DBA/2J 小鼠视神经中自噬途径相关蛋白表达的影响。方法 将 10 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组;采用随机数字法将 30 只 DBA/2J 小鼠分为模型组、低剂量组、高剂量组,每组 10 只。喂养小鼠至 38 周龄,期间观测小鼠眼压,待 DBA/2J 小鼠自动成模后开始灌胃。模型组每日以生理盐水灌胃;低剂量组、高剂量组分别灌胃青光安 20.75、103.75 g/kg,每日 1 次。各组小鼠均以常规饲料喂养。灌胃 15 d 后取右眼视神经。各组采用 Western blot 法检测微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、溶酶体相关膜蛋白 1 (lysosome-associated membrane protein 1, LAMP1)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase-3)、细胞色素 C(cytochrome C, CytC)蛋白表达,采用 RT-PCR 法检测 E3 泛素连接酶(Parkin)、LAMP1、Caspase-3 mRNA 的表达。结果 小鼠喂养至 38 周龄后, DBA/2J 小鼠眼压上升,造模成功。与空白组相比,模型组 LAMP1、Caspase-3、CytC、LC3-II/LC3-I 蛋白表达升高, Parkin、LAMP1、Caspase-3 mRNA 表达升高($P<0.05$)。与模型组相比,低剂量组 LAMP1、CytC、LC3-II/LC3-I 蛋白表达降低($P<0.05$), LAMP1、Caspase-3 mRNA 表达降低($P<0.05$);高剂量组 LAMP1、Caspase-3、CytC、LC3-II/LC3-I 蛋白表达降低, Parkin、LAMP1、Caspase-3 mRNA 表达降低($P<0.05$)。与低剂量组相比,高剂量组 Parkin、Caspase-3、LAMP1 mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。结论 青光安可通过调控青光眼小鼠视神经中 Parkin、LAMP1、LC3、Caspase-3、CytC 的表达,使得线粒体自噬过程完整进行,对视神经具有保护作用。

〔关键词〕 青光安颗粒剂;青光眼;线粒体自噬;视神经;DBA/2J 小鼠

〔中图分类号〕R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.04.004

Effect of Qingguang'an Granule on the expression of mitophagy pathway related proteins in optic nerve of DBA/2J mice

WU Kai^{1,2,3}, CHEN Lihao^{2,4}, SHI Jian^{1,2,3}, LIU Qianhong^{1,2,3}, YAO Xiaolei^{1,3*}

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;
2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of
TCM Prevention and Treatment of Eye, Ear, Nose and Throat Diseases, Changsha, Hunan 410208, China; 4 Hebei Eye
Hospital, Xingtai, Hebei 054000, China)

〔Abstract〕 Objective To study the effect of Qingguang'an Granule on the expression of mitophagy pathway related proteins in the optic nerve of DBA/2J mice with spontaneous glaucoma. **Methods** Ten C57BL/6J mice were used as blank group. Thirty

〔收稿日期〕2021-05-01

〔基金项目〕国家自然科学基金地区基金项目(81860870);中国博士后科学基金面上资助项目(2018M640754);全国中医药创新骨干人才培养项目(湘中医药函[2019]67号);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目(湘卫函[2019]196号);中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室开放基金项目(2018YZD02)。

〔第一作者〕吴凯,男,硕士研究生,研究方向:中医眼科学。

〔通信作者〕*姚小磊,男,副教授,博士研究生导师,E-mail:yxslsh@126.com。

DBA/2J mice were randomly divided into model group, low-dose group and high-dose group, with 10 mice in each group by random number method. Mice were fed to 38 weeks of age, and intraocular pressure was observed during this period. After automatic modeling of DBA/2J mice, the mice were given intragastric administration. The model group was given normal saline intragastric administration every day. Qingguang'an Granule were gavaged at 20.75 g/kg and 103.75 g/kg in the low-dose group and high-dose group, once a day, respectively. Mice in each group were fed with conventional diet. The optic nerve of the right eye was removed 15 days after gavage. The protein expression levels of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1), cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase-3) and cytochrome C (CytC) in each group were detected by Western blot, and the expression levels of E3 ubiquitin ligase (Parkin), LAMP1 and Caspase-3 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** After the mice were fed to 38 weeks of age, the intraocular pressure of DBA/2J mice increased, and the modeling was successful. Compared with blank group, protein expression levels of LAMP1, Caspase-3, CytC, LC3-II/LC3-I and expression levels of Parkin, LAMP1 and Caspase-3 mRNA were increased in model group ($P<0.05$). Compared with model group, the protein expression levels of LAMP1, CytC and LC3-II/LC3-I were decreased in low-dose group ($P<0.05$), and the expression levels of LAMP1 and Caspase-3 mRNA were decreased in low-dose group ($P<0.05$). The protein expression levels of LAMP1, Caspase-3, CytC, LC3-II/LC3-I and Parkin, LAMP1 and Caspase-3 mRNA were decreased in the high-dose group ($P<0.05$). Compared with the low-dose group, the expression levels of Parkin, Caspase-3 and LAMP1 mRNA in the high-dose group were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** By regulating the expression of Parkin, LAMP1, LC3, Caspase-3 and CytC in the optic nerve of glaucoma mice, Qingguang'an Granule can make the mitochondrial autophagy process complete and has protective effect on the optic nerve.

[**Keywords**] Qingguang'an Granule; glaucoma; mitophagy; optic nerve; DBA/2J mice

青光眼是一种以眼压增高、典型的视野改变为临床表现,以视神经不可逆损害、视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)丢失为主要病理改变的一类遗传异质性疾病,致盲率位居不可逆致盲性眼病之首^[1],是一直以来眼科研究的重点疾病。RGCs的凋亡是青光眼致盲的主要原因^[2],视神经与RGCs的保护是青光眼的最终治疗目标。由于RGCs是高度分化完全的细胞,再生十分困难,目前主要有神经生长因子注射和干细胞移植两种方法。然而神经生长因子注射费用高且疗效有限,干细胞移植还处于初级探索阶段,所以视神经与RGCs的保护方法十分局限。中医学有巨大的药物资源,寻找能够保护视神经与RGCs的中药是当下亟待解决的问题。青光眼的主要病机为血瘀水停^[3],治以益气活血利水,据此,青光安颗粒剂(以下简称青光安)应运而生,由黄芪、茯苓、白术、赤芍、生地、地龙、红花、车前子组成,黄芪、白术益气利水,生地、地龙、红花、赤芍活血化瘀,茯苓、车前子利水明目,全方补泻兼施,共奏益气补血、活血利水之功。前期研究发现,青光安能够保护青光眼模型RGCs的形态,减少RGCs的凋亡^[4],其疗效在临床上也得到有效验证^[5]。RGCs的凋亡与线粒体自噬异常的关系十分密切,当线粒体自噬过程不能完整执行,造成自噬小体的堆积时,可导致线粒体中的细胞色素C(cytochrome

C, CytC)释放,激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase-3),诱导RGCs的凋亡^[6],因此,线粒体自噬有利也有弊^[7],线粒体自噬保护RGCs的关键在于是否形成完整的线粒体自噬。在中医药领域,很少见中药复方通过调控线粒体自噬治疗青光眼的相关报道,应大量展开关于药物成分、单味中药、中药复方调节线粒体自噬治疗青光眼的研究,为中医药治疗青光眼提供依据。本实验通过检测E3泛素连接酶(Parkin)、微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、溶酶体相关膜蛋白1(lysosome-associated membrane protein 1, LAMP1)、Caspase-3、CytC的表达,研究青光安保护视神经是否通过调控线粒体自噬途径而介导,阐明青光安治疗青光眼的机制,为中医药治疗青光眼提供理论依据及技术借鉴。

1 材料

1.1 动物

C57BL/6J小鼠10只,雌性,体质量18~22 g,2月龄,SPF级,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物质量合格证号:1107271911002463;DBA/2J小鼠30只,雌性,体质量18~22 g,56~76日龄,SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物质量合格证号:1100111911055898。动

物实验伦理合格证号:LL2019100802,实验地:中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室。

1.2 药物

青光安组成(均为颗粒):黄芪 30 g、茯苓 20 g、白术 10 g、赤芍 10 g、生地黄 10 g、地龙 10 g、红花 5 g、车前子 20 g(均购自湖南中医药大学第一附属医院),根据小鼠每天的用药剂量分袋密封包装,室温条件下储存在阴凉干燥处,灌胃前加入适量水溶解并加热。

1.3 主要试剂与仪器

RIPA 细胞裂解液(北京普利莱基因技术有限公司,批号:C1053);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(批号:CW0014S)、超纯 RNA 提取试剂盒(批号:CW0581M)均购自康为世纪生物科技股份有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(北京索莱宝科技有限公司,批号:A8020);兔抗 LC3B 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号:ab51520];兔抗 CytC 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:10993-1-ap);兔抗 Caspase-3 抗体(美国 Immunoway 公司,批号:YT0656);兔抗 LAMP1 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:df7033);二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZB-2301)。低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:5424R);全自动酶标仪(型号:WD-2102B)、蛋白垂直电泳仪(型号:DYY-6C)均购自北京市六一仪器厂;恒温摇床(上海领成生物科技有限公司,型号:TC-100B);荧光 PCR 仪(型号:CFX Connect™)、超高灵敏度化学发光成像系统(型号:ChemiDoc™ XRS+)均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司,型号:Tiss-12);笔式眼压计(美国 Reichert 公司,型号:Tono-pen AVIA)。

2 方法

2.1 动物模型的建立

本实验青光眼动物模型的建立采用转基因小鼠^[8],DBA/2J 小鼠 8~9 月龄出现 RGCs 凋亡和视神经变性,18 月龄出现 90%以上视神经变性,视功能几乎全部丧失,为近年来基于转基因技术应用最为广泛的年龄相关性、进展性自发性高眼压实验动物模型。

本实验喂养 DBA/2J 小鼠至 38 周龄自动成模。在此期间动态观察小鼠眼压变化,将小鼠眼球表面麻醉后,使用 Tono-pen 笔式眼压计轻触小鼠眼球,连续轻触 10 次读取眼压值,从第 10 周开始,每 4 周测 1 次,待 DBA/2J 小鼠眼压升高以及趋于稳定后停测。

2.2 分组

将 10 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组。采用随机数字法将 30 只 DBA/2J 小鼠分为 3 组,其中一组为模型组,另外两组根据“人-动物体表面积等效剂量比值表”计算灌胃剂量,分为低剂量组、高剂量组,每组 10 只。

2.3 给药方法

模型组每日以生理盐水 0.9 mL 灌胃,每日 1 次;低剂量组将 115 g 青光安溶于 250 mL 生理盐水中灌胃,每日 1 次,每次 0.9 mL;高剂量组将 115 g 青光安溶于 50 mL 生理盐水中灌胃,每日 1 次,每次 0.9 mL,计算出低剂量组、高剂量组的灌胃剂量分别为 20.75、103.75 g/kg,各组小鼠均以常规饲料喂养,共 15 d。

2.4 取材

灌胃 15 d 后,将各组小鼠行颈椎脱臼处死,处死后迅速取出右眼球至于干冰上,自视乳头后 1 mm 向后取 3 mm 视神经,保存并标记组别。

2.5 Western blot 法检测 Caspase-3、CytC、LAMP1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平

首先提取视神经组织蛋白。用液氮对研磨器具降温后用镊子将组织样品取出,剪取 50 mg 样品置于离心管内,加入 1 mL 的裂解液,采用研磨仪充分研磨。随后用 12 000 r/min 高速离心机离心 10 min,离心半径 20 cm,离心后取上清液,移至新的 EP 管,弃沉淀,加入缓冲液,沸水煮 5 min 后置于 -20 °C 保存。稀释 BSA 标准品,配置 BCA 工作液,取稀释好的 A-G BSA 标准品和待测蛋白样品各 5 μL 分别加到做好标记的试管中,用全自动酶标仪测定 BSA 标准品及每个样品的吸光值,蛋白电泳至曝光,显影,测定各目标蛋白灰度值。

2.6 RT-PCR 法检测 Parkin、Caspase-3、LAMP1 mRNA 表达水平

将组织样品取出,剪取 50 mg 样品置于离心管内,加入 1 mL 的 TRlzon 试剂。采用研磨仪研磨充分后保存于 -20 °C 冰箱,防止被降解。向以上溶液中

加入氯仿震荡,冰盒上放置 5 min 后离心,离心后样品分成 3 层:红色有机相层、中间层、无色水相层,把水相层转移到一个新的预冷 1.5 mL RNase-Free 离心管中。随后在得到的水相溶液中加入等体积预冷的 70%乙醇,颠倒混匀。将上述溶液加入到已装入收集管的吸附柱 RM 中,离心、弃流出液。然后在冰盒上晾干 5 min。将吸附柱装入到一个新的预冷 1.5 mL RNase-Free 离心管中,加入 35 μ L 无RNase的水,充分溶解 RNA,静置 3 min 后离心。把流出液再加入到吸附柱里面,静置 3 min 后再离心。得到的 RNA 保存在 -80°C ,防止降解,利用紫外分光光度仪计算 RNA 浓度、纯度。然后配制逆转录反应体系,将 RNA 逆转录成 cDNA,最后进行 RT-PCR 反应,检测过程中用到的引物见表 1。

表 1 各基因引物信息表

引物名称	引物序列	产物长度/bp
Parkin	正向 CTTCATGTGCATACATCTCCATT	194
	反向 CATACCATGAAGGGGAGTCCG	
LAMP1	正向 ACGATCTGAGAACCATTCCGA	103
	反向 CAGCACTCTTTGAGGTGAAAAAC	
Caspase-3	正向 AGCATGGACACAATACACGG	211
	反向 CAGCACCTGGTTACTATTCTCT	
β -actin	正向 CATACCCAAGAAGGAAGGCT	192
	反向 AGGGAAATCGTCCTGAC	

注:引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成

2.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 进行统计分析。符合正态分布且方差齐者用 *one-way ANOVA* 分析,否则采用秩和检验,多重比较采用 *LSD* 法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 眼压检测结果

10 只 C57BL/6J 小鼠(20 眼)在第 10 周至第 38 周眼压波动于 10~16 mmHg 之间。30 只 DBA/2J 小鼠(60 眼)眼压在第 10 周到第 38 周之间逐渐上升。C57BL/6J 小鼠在第 10 周至第 38 周眼压差异无统计学意义($P > 0.05$);DBA/2J 小鼠在第 10 周至第 38 周眼压上升。相同时间两种小鼠眼压比较,从第 10 周到第 38 周,DBA/2J 小鼠眼压均高于 C57BL/6J 小鼠眼压($P < 0.05$)。见表 2。

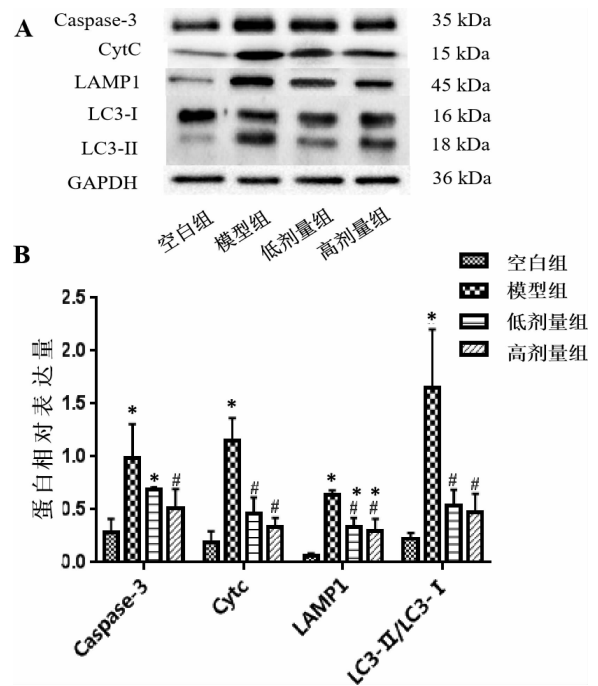
表 2 C57BL/6J 小鼠与 DBA/2J 小鼠第 10 周至第 38 周不同时相点眼压比较($\bar{x} \pm s$, mmHg, $n=20$)

时相点	眼压	
	C57BL/6J 小鼠	DBA/2J 小鼠
第 10 周	13.20 \pm 0.89	14.30 \pm 1.26*
第 14 周	13.60 \pm 1.14	14.90 \pm 0.85*
第 18 周	13.00 \pm 1.17	15.65 \pm 0.75*
第 22 周	12.80 \pm 0.89	16.60 \pm 1.23*
第 26 周	12.70 \pm 1.26	18.70 \pm 1.30*
第 30 周	13.10 \pm 1.17	20.65 \pm 1.76*
第 34 周	13.15 \pm 1.27	22.40 \pm 2.11*
第 38 周	13.40 \pm 1.19	24.15 \pm 2.39*
χ^2 值	6.496	134.908
P 值	0.483	0.000

注:与 C57BL/6J 小鼠比较,* $P < 0.05$

3.2 各组 Caspase-3、CytC、LAMP1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平比较

与空白组相比,模型组 Caspase-3、CytC、LAMP1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平均升高($P < 0.05$)。与模型组相比,低剂量组 LAMP1、CytC、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),高剂量组 LAMP1、Caspase-3、CytC、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。与低剂量组相比,高剂量组 Caspase-3、CytC、LAMP1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

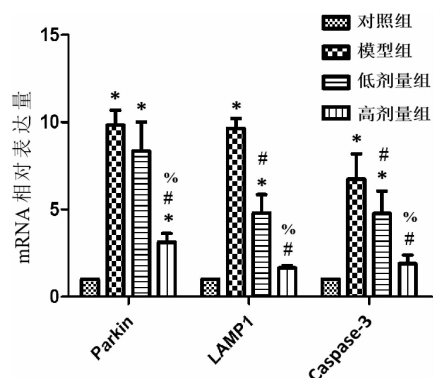


注:A.蛋白电泳图;B.蛋白表达量。与空白组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$

图 1 青光安对 Caspase-3、CytC、LAMP1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达的影响

3.3 各组 Parkin、Caspase-3、LAMP1 mRNA 表达水平比较

与空白组相比,模型组 Parkin、Caspase-3、LAMP1 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与模型组相比,低剂量组 LAMP1、Caspase-3 mRNA 表达水平降低($P<0.05$),高剂量组 Parkin、Caspase-3、LAMP1 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。与低剂量组相比,高剂量组 Parkin、Caspase-3、LAMP1 mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。见图 2。



注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与低剂量组相比,% $P<0.05$

图 2 青光安对 Parkin、Caspase-3、LAMP1 mRNA 表达的影响

4 讨论

青光眼属于中医学“五风内障”范畴,病因虚、实皆有。脾气阳虚,不能运化水谷精微,聚而生湿生痰,痰湿流窜于目中脉络,阻滞目中玄府,神水运行不畅而滞留于目;肝肾亏虚,目窍失养,神水阻滞^[9]。血阻脉络,不能上荣于目,目不能视,或阻滞气机,气机不能推动神水运行,终发为本病。《外台秘要·眼疾品类不同候》认为“内肝管缺,眼孔不通”可致本病。《证治准绳·杂病·七窍门》认为本病乃“痰湿所致,火郁、忧思、忿怒之过”。故青光眼病机可归纳为“血瘀水停”,治宜益气活血利水。自噬是细胞在不利环境下的自我调控行为,通过自噬,细胞可对废弃的细胞器或蛋白质进行清理,以维持细胞稳态平衡,类似于中医理论中“精化气”和“去瘀生新”的过程。脏腑功能失调、气化失司可使痰浊瘀血内生,“痰浊”“瘀血”是异常积累的蛋白,这与自噬水平的下降导致蛋白无法降解有关,印证了自噬的不足与“血瘀水停”密切相关^[10]。

PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬与 RGCs 的凋亡密切相关,完整的线粒体自噬途径能够及时清理

受损的线粒体,维持 RGCs 稳态。LC3- I 是自噬体的标志分子,随着自噬体膜的增加而增加,自噬形成时,LC3- I 转变为脂质形式的 LC3- II,可协助自噬体的形成,自噬体与溶酶体融合后的降解为线粒体自噬必不可少的过程,因此 LC3- II/LC3- I 可反映线粒体自噬过程是否完整^[11-12]。Parkin 是线粒体自噬过程中的重要蛋白,平时在细胞溶质中保持非活化状态。当线粒体自噬发生时,PINK1 将募集胞质中的 Parkin 至线粒体外膜以扩大线粒体自噬的信号^[13],因此,Parkin 的表达可反映线粒体自噬的数量。LAMP1 主要分布在溶酶体膜及内吞体膜,是溶酶体的标志物,常用于检测自噬溶酶体的形成^[14]。Caspase-3 是线粒体介导的凋亡信号通路的特异标记物,可反映细胞凋亡程度^[15]。当线粒体功能障碍时,PINK1 磷酸化并附着在线粒体外膜蛋白质上的泛素 Ser65 位点,向细胞传递线粒体功能障碍的信息,靶向募集 Parkin 至线粒体外膜使线粒体外膜蛋白泛素化^[13]。泛素化蛋白被受体蛋白 optineurin 识别^[16],同时 LC3 与受体蛋白 optineurin 结合,LC3- I 转变为 LC3- II,LC3- II 与自噬体外膜内膜相关联^[17],使线粒体被自噬小泡包裹成自噬体,自噬体与溶酶体结合并在溶酶体中降解,完成完整的 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬过程。当自噬体降解受阻而累积时,将对细胞产生毒性作用^[18]。除此之外,线粒体自噬本身会使累积的自噬体去极化,膜通透性增加,致使线粒体中 CytC 释放^[6],进而激活 Caspase-3,导致 RGCs 凋亡^[19]。

在本实验中,与空白组相比,模型组 LAMP1、LC3- II/LC3- I、Caspase-3、CytC 的蛋白表达水平均升高, Parkin、LAMP1、Caspase-3 的 mRNA 表达水平均升高,表明青光眼能诱导线粒体自噬增加^[20],导致自噬体随着线粒体自噬的增加而增加,与此同时,溶酶体也呈上升趋势,但增加的溶酶体降解能力并不能代偿自噬体的堆积速度,过剩的自噬体没有得到有效的清除而积累在视神经,线粒体自噬不能完成全部过程,使得大量 CytC 从线粒体中释放,激活 Caspase-3,导致视神经不可逆损害。与模型组相比,低剂量组、高剂量组 LAMP1、CytC、Caspase-3、LC3- II/LC3- I 蛋白表达水平均降低,提示青光安能降低青光眼小鼠视神经中过剩的线粒体自噬,从而减少自噬体的堆积,减少 RGCs 的凋亡。与低剂量组相比,高剂量组 Parkin、LAMP1、Caspase-3 mRNA 表达水平均

降低,Caspase-3、LC3-II/LC3-I、LAMP1、CytC 蛋白表达水平差异无统计学意义,提示高剂量组线粒体自噬完整程度与低剂量组相似。虽然以上指标 mRNA 表达和蛋白表达结果并不完全一致,但是整体并未出现相反的趋势,可能是由于检测时的误差引起或者部分小鼠在检测之前本身就有多余的蛋白储备,但未行使功能。有研究表明过表达的 Parkin 蛋白可促进 LC3-I 转变为 LC3-II、LAMP1 上调,促进完整的 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬泛素化途径,有利于抑制 RGCs 凋亡,对 RGCs 具有显著的保护作用^[21-22],在本研究中,虽然低剂量组 Parkin mRNA 表达多于高剂量组,但 Parkin 蛋白未能过表达,所以其保护效益不够显著。高剂量组细胞凋亡相关蛋白的表达与低剂量组也几乎无差异,因此,低剂量和高剂量青光安对细胞的保护作用近似。

综上所述,青光安可通过调控青光眼小鼠视神经中 Parkin、LAMP1、LC3、Caspase-3、CytC 的表达,减少自噬体的堆积,使得线粒体自噬过程完整进行,对视神经具有保护作用。

参考文献

- [1] DANESH-MEYER H V, LEVIN L A. Glaucoma as a neurodegenerative disease[J]. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 2015, 35(Supplement 1): S22-S28.
- [2] 孔祥攀,周利红.青光眼视网膜节细胞病变中的自噬异常[J].*解剖学杂志*,2017,40(3):337-341.
- [3] 彭清华.眼科活水利水法的基础研究[J].*湖南中医药大学学报*,2009,29(5):14-18.
- [4] 彭 振,彭清华,李建超,等.青光安颗粒剂含药血清对体外培养大鼠视网膜神经节细胞凋亡的实验研究[J].*医药世界*,2006,7(7):84-85.
- [5] 蒋鹏飞,沈志华,周亚莎,等.活血化瘀中药在青光眼中的应用进展[J].*江西中医药*,2019,50(2):68-71.
- [6] LIN W J, KUANG H Y. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells[J]. *Autophagy*, 2014, 10(10): 1692-1701.
- [7] 吴 凯,俞赟丰,时 健,等.线粒体自噬:青光眼的双刃剑[J].*生命的化学*,2021,41(9):1944-1949.
- [8] 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.
- [9] 彭清华.中医眼科学[M].4 版.北京:中国中医药出版社,2016:148-155.
- [10] 王蓓蕾,阮越勇,于 洋,等.从中医“气化”角度探讨自噬现象[J].*中华中医药杂志*,2020,35(11):5452-5454.
- [11] 朱 琪,林 芳.自噬的分子标志物[J].*药科学报*,2016,51(1):33-38.
- [12] COUGHLIN L, MORRISON R S, HORNER P J, et al. Mitochondrial morphology differences and mitophagy deficit in murine glaucomatous optic nerve[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2015, 56(3): 1437-1446.
- [13] 李瑞萌,赵 进,刘 岩.PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬[J].*中国生物化学与分子生物学报*,2019,35(10):1072-1079.
- [14] 何昕雅,张 强,段静诗,等.溶酶体相关膜蛋白 LAMP1 与肿瘤相关性的研究进展[J].*生命科学*,2020,32(10):1074-1080.
- [15] 左 玮,梅 丹.高血糖通过抑制线粒体自噬加重大鼠脑缺血/再灌注损伤[J].*中国药理学通报*,2016,32(6):846-853.
- [16] 刘倩宏,陈立浩,时 健,等.青光安颗粒剂含药血清对 RGC5 细胞损伤模型线粒体自噬及相关蛋白的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(10):1517-1522.
- [17] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in mammalian autophagy research[J]. *Cell*, 2010, 140(3): 313-326.
- [18] BUTTON R W, ROBERTS S L, WILLIS T L, et al. Accumulation of autophagosomes confers cytotoxicity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(33): 13599-13614.
- [19] PERIER C, TIEU K, GUÉGAN C, et al. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(52): 19126-19131.
- [20] ROSIGNOL I, VILLAREJO-ZORI B, TERESAK P, et al. The mito-QC reporter for quantitative mitophagy assessment in primary retinal ganglion cells and experimental glaucoma models[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5): E1882.
- [21] DAI Y, HU X, SUN X. Overexpression of parkin protects retinal ganglion cells in experimental glaucoma[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 59(9): 88.
- [22] HU X X, DAI Y, SUN X H. Parkin overexpression protects retinal ganglion cells against glutamate excitotoxicity[J]. *Molecular Vision*, 2017, 23: 447-456.

(本文编辑 周 旦)