

·实验研究·

本文引用:曾志成,李银鑫,秦惠钰,蒋鹏飞,彭俊,彭清华. 青光安Ⅱ号方有效组分对慢性高血压 DBA/2J 小鼠视网膜神经节细胞的保护作用及机制[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(12):1973-1981.

青光安Ⅱ号方有效组分对慢性高血压 DBA/2J 小鼠视网膜神经节细胞的保护作用及机制

曾志成^{1,2},李银鑫^{1,3},秦惠钰^{1,3},蒋鹏飞^{1,3},彭俊^{1,3*},彭清华^{1,3*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南桂阳县第一人民医院,湖南郴州 424400;

3.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号方及其低、中、高浓度有效组分对青光眼模型小鼠视网膜神经节细胞的保护作用机制。方法 将8只雌性 C57BL/6 小鼠设为正常对照组(A组)并灌胃蒸馏水,48只38周龄雌性 DBA/2J 小鼠随机分成6组:模型组(B组)、益脉康分散片组(C组)、青光安Ⅱ号汤剂组(D组)、青光安Ⅱ号有效组分低浓度组(E组)、青光安Ⅱ号有效组分中浓度组(F组)、青光安Ⅱ号有效组分高浓度组(G组),分别灌胃蒸馏水、益脉康分散片混悬液、青光安Ⅱ号方汤剂、青光安Ⅱ号方有效组分低/中/高浓度汤剂。干预4周后,HE染色观察小鼠视网膜组织结构,TUNEL染色观察视网膜神经节细胞凋亡,免疫组化染色观察视网膜组织神经节细胞层糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、 β -连环蛋白(β -Catenin)及同源盒基因-6(paired box gene-6, Pax6)表达情况,Western blot法测定视网膜组织 GSK-3 β 、 β -Catenin 及 Pax6 蛋白相对表达量。结果 眼压测量发现,DBA/2J 小鼠眼压在26周及以后明显上升,从第14周开始 DBA/2J 小鼠眼压明显高于 C57BL/6J 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);A组小鼠视网膜各层组织结构清晰、完整、染色均匀、清晰可见3个核层,神经节细胞呈单层排列,比较连续无间断,细胞呈圆形或椭圆形;B组小鼠视网膜以神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)损伤最为明显,神经节细胞明显减少,连续性中断,胞内空泡样变性,核固缩;C组、D组、E组、F组、G组神经节细胞数目增多,胞内空泡样变性改变均有所改善。与A组比较,B组凋亡指数明显升高($P<0.01$);与B组比较,C组、D组、E组、F组、G组凋亡指数均明显降低($P<0.01$);与C组、D组比较,E组凋亡指数升高($P<0.05$)。与A组比较,B组视网膜 GSK-3 β 表达量明显升高($P<0.01$), β -Catenin 和 Pax6 表达量明显降低($P<0.01$);与B组比较,C组、D组、E组、F组、G组 GSK-3 β 表达量均明显降低($P<0.01$),C组、D组、G组 β -Catenin 表达量均有升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),C组、D组、F组、G组 Pax6 表达量均有升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与C组和D组比较,G组 GSK-3 β 表达量降低($P<0.05$), β -Catenin 和 Pax6 表达量升高($P<0.01$)。Western blot 检测发现 B 组视网膜 GSK-3 β 蛋白表达量明显升高($P<0.01$), β -Catenin 和 Pax6 蛋白表达量明显降低($P<0.01$);与B组比较,C组、D组、E组、F组、G组 GSK-3 β 蛋白表达量均明显降低($P<0.01$),C组、D组、G组 β -Catenin 和 Pax6 蛋白表达量均有升高($P<0.05$);与C组、D组比较,G组 GSK-3 β 表达量降低($P<0.05$), β -Catenin 和 Pax6 表达量升高($P<0.01$)。结论 高浓度青光安Ⅱ号方有效组分能明显改善青光眼视网膜结构,抑制 RGCs 凋亡,抑制 GSK-3 β 蛋白和促进 β -Catenin、Pax6 蛋白在视网膜中的表达,其作用可能与激活 Wnt/ β -Catenin/Pax6 信号通路有关。

〔关键词〕 青光安Ⅱ号方;青光眼;DBA/2J 小鼠;Wnt/ β -Catenin/Pax6 信号通路;细胞凋亡

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.12.004

〔收稿日期〕 2022-08-12

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81874492,81904260);湖南省自然科学基金项目(2018JJ3389,2020JJ5436);湖南省研究生科研创新项目(CX2018B470,CX20190584);中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室(2017TP1018);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科资助项目;中央财政支持地方高校重点学科和中医眼科创新团队建设项目;国家中医药管理局重点学科中医眼科学建设项目;湖南省重点学科中医五官科学建设项目;湖南省中医药防治眼耳鼻喉疾病与视功能保护工程技术研究中心。

〔第一作者〕 曾志成,男,博士,副主任医师,研究方向:中医防治青光眼。

〔通信作者〕 *彭清华,男,二级教授,博士研究生导师,E-mail:pqh410007@126.com;彭俊,男,助理研究员,E-mail:154451101@qq.com。

Protective effects and mechanism of active components of Qingguang An II Formula on retinal ganglion cells in DBA/2J mice with chronic intraocular hypertension

ZENG Zhicheng^{1,2}, LI Yinxin^{1,3}, QIN Huiyu^{1,3}, JIANG Pengfei^{1,3}, PENG Jun^{1,3*}, PENG Qinghua^{1,3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First People's Hospital of Guiyang County, Chenzhou, Hunan 424400, China; 3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the protective mechanism of Qingguang An II Formula and its active components with low, medium and high concentration on retinal ganglion cells in glaucoma model mice. **Methods** Eight female C57BL/6 mice were set as normal control group (group A) with intragastric gavage of distilled water. Forty-eight 38-week-old female DBA/2J mice were randomly divided into 6 groups: Model group (group B), Yimai Kang Dispersing Tablet group (group C), decoction group of Qingguang An II Formula (group D), low concentration group of active component in Qingguang An II Formula (group E), medium concentration group of active component in Qingguang An II Formula (group F), and high concentration group of active component in Qingguang An II Formula (group G), and the distilled water, suspension of Yimai Kang Dispersible Tablet, decoction of Qingguang An II Formula and low/medium/high concentration decoction of effective component in Qingguang An II Formula were administered by intragastric gavage respectively. After 4 weeks of intervention, HE staining was used to observe the structure of retinal tissue and TUNEL staining was applied to observe the apoptosis of retinal ganglion cells. In addition, immunohistochemical staining was used to observe the expressions of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), β -Catenin and paired box gene-6 (Pax6) in the ganglion cell layer of retinal tissue. The relative expressions of GSK-3 β , β -Catenin and Pax6 in retinal tissue were measured by Western blot. **Results** The intraocular pressure (IOP) of DBA/2J mice increased significantly after 26 weeks, and the IOP of DBA/2J mice was significantly higher than that of C57BL/6J group from week 14 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In group A, the tissue structure of each layer of the retina of mice was clear, complete, uniformly stained, and three nuclear layers were clearly visible. Ganglion cells were arranged in a single layer, which was continuous without interruption, and the cells were round or oval. In group B, ganglion cell layer (GCL) was the most obvious layer of retinal damage. Ganglion cells were significantly reduced with interrupted continuity, and the intracellular vacuole-like degeneration and nuclear pyknosis were observed. In group C, D, E, F and G, the number of ganglion cells increased, and the intracellular vacuolate-like degeneration was improved. Compared with group A, the apoptosis index of group B significantly increased ($P < 0.01$). Compared with group B, the apoptosis index of groups C, D, E, F and G significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with groups C and D, the apoptosis index of group E significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group A, the expression of GSK-3 β significantly increased in group B ($P < 0.01$), and the expression of β -Catenin and Pax6 were significantly lower in group B ($P < 0.01$). Compared with group B, there was significantly lower expression of GSK-3 β in groups C, D, E, F and G ($P < 0.01$), higher expression of β -Catenin in groups C, D and G ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and higher expression of Pax6 in groups C, D, F and G ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with groups C and D, the expression of GSK-3 β in group G was reduced ($P < 0.05$), and the expression of β -Catenin and Pax6 in group G increased ($P < 0.01$). Western blot analysis showed that the protein expression of GSK-3 β significantly increased in group B ($P < 0.01$), while the protein expression of β -Catenin and Pax6 significantly decreased in group B ($P < 0.01$). Compared with group B, the protein expression of GSK-3 β in groups C, D, E, F and G was significantly reduced ($P < 0.01$), and the protein expression of β -Catenin and Pax6 in groups C, D and G increased ($P < 0.05$). Compared with groups C and D, the expression of GSK-3 β in group G decreased ($P < 0.05$), and the expression of β -Catenin and Pax6 in group G increased ($P < 0.01$). **Conclusion** High concentration of active components in Qingguang An II Formula can significantly improve the retinal structure of glaucoma, inhibit the apoptosis of RGCs, inhibit GSK-3 β protein and promote the expression of β -Catenin and Pax6 protein in the retina, which may be related to the activation of Wnt/ β -Catenin/Pax6 signaling pathway.

[Keywords] Qingguang An II Formula; glaucoma; DBA/2J mice; Wnt/ β -Catenin/Pax6 signaling pathway; apoptosis

青光眼是一组以视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 进行性凋亡及视神经纤维的丢失为特征的神经退行性疾病^[1]。目前,对于青光眼

的治疗以降低眼压为主,但即使控制眼压仍不能完全阻止青光眼患者视神经的持续性损伤和退行性改变^[2]。本团队前期研究发现,青光安 II 号方对眼压已控

制的青光眼患者的视神经能起到一定的保护作用^[3],并通过高通量筛选体系多模式(水提醇提-溶剂分配分离-大孔树脂)提取分离手段得到了青光安Ⅱ号方的有效组分^[4]。为明确青光安Ⅱ号方有效组分对青光眼视神经的保护作用及机制,本研究将青光安Ⅱ号方有效组分配制成低、中、高3种梯度剂量作用于青光眼模型 DBA/2J 小鼠,以验证其是否具有抑制 RGCs 凋亡、保护视神经的作用,同时对其保护视神经的机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 60只10周龄 SPF 级 DBA/2J 小鼠,雌性,体质量 18~22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0006,质量合格证号:No.1100111911055898;20只10周龄 SPF 级野生型 C57BL/6J 小鼠,雌性,体质量 18~22 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002,质量合格证号:1107271911002463。动物饲养于湖南中医药大学科技创新中心实验动物中心屏障环境实验室,实验动物使用许可证号:SCXK(湘):2019-0009,饲养过程维持相同实验条件,光/暗周期为 12 h/12 h(光照时间6:00~18:00),背景噪声为(40±10) db,温度(23±3)℃,动物饲料为标准化颗粒饲料,动物自由进食、进水。动物饲养和实验操作遵循美国视觉和眼科研究学会(Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO)和湖南中医药大学制定的科研动物和实验室使用规范。实验经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准(LL2019100802)。

1.1.2 实验药物 青光安Ⅱ号汤剂由枸杞子、黄芪、女贞子等道地药材按规定比例用灭菌蒸馏水制成悬混液;基于团队前期中药高通量筛选体系^[5-6]对青光安Ⅱ号方中药组分库的筛选,提取出青光安Ⅱ号方有效组分悬混液。益脉康分散片:湖南湘雅制药有限公司,规格:400 mg/片,批号:1903119。

1.1.3 主要实验试剂 苏木素染液(批号:G1004)、伊红染液(批号:G1001)、Proteinase K(批号:G1234)、柠檬酸抗原修复液(批号:G1202)、丽春红染液(批

号:G2011)、HRP 标记-山羊抗兔二抗(批号:GB23301)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号:G2026),均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;兔抗糖原合酶激酶-3β(Glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)多克隆抗体(批号:bs-0023M)、兔抗 β-连环蛋白(β-Catenin)多克隆抗体(批号:bs-1165R)、兔抗同源盒基因-6(Paired box gene-6, Pax6)多克隆抗体(批号:bs-11204R)、兔抗 β-Actin 多克隆抗体(批号:bs-0016R),均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.1.4 主要实验仪器 Tono-pen AVIA 型笔式眼压计(美国 Reichert 公司);SL-2G 型裂隙灯显微镜(日本 Topcon 公司);Micron IV 型小动物视网膜影像系统(美国 Phoenix Research Labs 公司);SK3300H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);RM2235 型石蜡轮转切片机(德国 Leica 公司);RT-2100C 型酶标检测仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);Neofuge 13R 型台式高速冷冻离心机(香港力康生物医疗科技控股有限公司);MX-F 型涡旋混合器、TSY-B 型脱色摇床(武汉赛维尔生物科技有限公司);DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪、DYCZ-40D 型转印电泳仪(北京六一生物科技有限公司);alphaEaseFC 灰度分析软件(美国 Alpha Innotech 公司);Adobe PhotoShop 图像分析软件(美国 Adobe 公司)。

1.2 方法

1.2.1 眼压测量 所有动物适应性饲养 3 d 后开始测量眼压,在小鼠清醒状态下由两人配合使用 Tono-pen AVIA 接触式眼压笔每 4 周测量 1 次,测量时间为早上 9:00 至 12:00。取连续 10 次测量的平均值(且 LCD 上显示置信指标≥95)作为该眼眼压值。

1.2.2 实验分组与给药 DBA/2J 小鼠从 28 周龄开始眼压逐渐升高,28~44 周龄持续高眼压,56 周龄眼压开始降低^[7],本实验将 38 周龄的 DBA/2J 小鼠初步纳入慢性高眼压青光眼模型组,由于 DBA/2J 小鼠高眼压在个体中存在一定差异,在同年龄段不同小鼠、同小鼠不同眼别眼压升高进程不平衡^[8],根据 DBA/2J 小鼠 38 周龄时平均眼压和标准差,剔除眼压值平均值在±3 mmHg 范围以外的 DBA/2J 小鼠。

第38周龄时,从C57BL/6J小鼠中随机选取8只(30眼)纳入组成正常对照组(A组);在剔除后剩余的DBA/2J小鼠中选取48只(180眼),按照随机数字表法平均分为青光眼模型组(B组)、益脉康分散片组(C组)、青光安Ⅱ号方汤剂组(D组)、青光安Ⅱ号方有效组分低剂量组(E组)、青光安Ⅱ号方有效组分中剂量组(F组)、青光安Ⅱ号方有效组分高剂量组(G组)。药物均用蒸馏水作为溶剂进行配制,各组小鼠给药药物配制浓度、给药剂量见表1。

表1 各组小鼠给药药物配制浓度及给药剂量

组别	n	药物配制浓度	给药剂量
A组	8	-	12.91 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
B组	8	-	12.91 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
C组	8	2.40 g/100 mL	0.31 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
D组	8	74.87 g/100 mL	9.67 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
E组	8	6.59 g/100 mL	0.85 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
F组	8	13.18 g/100 mL	1.70 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
G组	8	26.36 g/100 mL	3.40 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹

1.2.3 取材方法 灌胃4周后,各组小鼠行颈椎脱臼处死,仔细剥离小鼠眼球,一只置于装有2.5 mL FAS眼球固定液的EP管中,固定25 min后,取出眼球,沿角巩膜缘剪开,除去角膜、虹膜、晶状体,制作成含视网膜的眼杯,放入FAS眼球固定液中继续固定48 h,石蜡包埋切片,备行HE染色、TUNEL染色、免疫组化染色。另一只眼球置于冰盘上,用眼科显微器械沿角巩膜缘剪开,除去角膜、虹膜、晶状体,迅速剥离出视网膜组织,置入EP管中,再放入液氮罐中保存,备行Western blot检测。

1.2.4 视网膜石蜡切片标本制作 采用80%乙醇、95%乙醇Ⅰ、95%乙醇Ⅱ、无水乙醇Ⅰ、无水乙醇Ⅱ、无水乙醇Ⅲ分别脱水10~15 min;二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ透明10~15 min;56℃石蜡浸蜡1 h。浸蜡后的眼杯水平切面朝向包埋盒底,58~60℃硬蜡包埋,蜡块冷却后,室温保存待切;用轮转式切片机切片,靠近视乳头的位开始切片,厚约4 μm,每个眼杯至少切取3张切片包含有视网膜,40~46℃水浴,放在水上展平切片;把切片置于载物片的三分之一处,捞于载物片中央,晾干,放在切片盒内,置于4℃冰箱备用。

1.2.5 视网膜HE染色 取出各组小鼠视网膜组织切片,每张视网膜选取一张切片,400倍镜下拍照。

1.2.6 视网膜RGCs凋亡检测 取出各组小鼠视网膜石蜡切片,每张视网膜选取一张切片,根据TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书的操作步骤进行。细胞核固缩、胞浆浓缩,细胞核呈棕褐色为阳性细胞,每张切片随机选取1个视野(×400)拍照,计数视野中阳性着色RGCs数目,计算出RGCs细胞的凋亡指数(凋亡指数=阳性细胞数/RGCs总细胞数×100%),取平均值。

1.2.7 视网膜GSK-3β、β-Catenin及Pax6蛋白表达半定量检测 取出各组小鼠视网膜石蜡切片,每张视网膜选取3张切片,每张切片用于检测1个蛋白,根据通用二步法试剂盒中说明书操作步骤进行。胞浆、细胞核及细胞膜之一出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞,每张切片随机选取1个视野(×400)拍照。重点观察每张切片上神经节细胞层细胞染色情况。

1.2.8 视网膜GSK-3β、β-Catenin、Pax6蛋白表达定量检测 取出各组小鼠视网膜组织,每组每2张视网膜组织为1个样本,共检测4个样本。步骤如下:(1)将每个视网膜组织匀浆、裂解,后转移至离心管中,移至台式高速冷冻离心机中,4℃、12 000 r/min离心5 min(半径95 mm),离心后取上清并转移至1.5 mL新的离心管中,保存于-20℃备用。(2)蛋白浓度测定:用BCA蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度。(3)制备Western blot实验用蛋白样品。(4)SDS-PAGE电泳。(5)转膜。(6)染色、封闭。(7)孵育一抗:先用封闭液稀释各指标一抗(兔抗-GSK3β、兔抗-β/Catenin、兔抗-Pax6及兔抗β-Actin多克隆抗体,均按照1:1000稀释),然后弃去封闭袋中的封闭液,加入稀释的一抗,置于4℃冰箱中孵育过夜。(8)孵育二抗。(9)将条带放在保鲜膜上,设定曝光时间进行曝光、拍照。采用AlphaEaseFC软件分析系统进行灰度值分析各目标蛋白的灰度值,以β-Actin蛋白灰度值作为内参,二者比值即为灰度值,表示蛋白表达量。

1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0统计软件。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表

示,符合正态分布以及方差齐性,采用单因素方差分析,多重比较采用 *LSD* 法,C57BL/6J 小鼠与 DBA/2J 小鼠组间相同时相点眼压比较采用成组 *t* 检验;不符合正态分布或方差齐性,采用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C57BL/6J 小鼠与 DBA/2J 小鼠眼压

20 只(40 眼)C57BL/6J 小鼠在 10~38 周龄眼压一直波动在 10~16 mmHg。100 只(200 眼)DBA/2J 小鼠在 10 周龄和 34 周龄测量眼压时,分别有 1 只小鼠死亡,死亡小鼠当周双眼眼压数据即开始不纳入统计范围内。DBA/2J 小鼠眼压在 10~22 周龄之间逐渐上升。详见图 1。

2.2 各组小鼠视网膜形态结构

A 组小鼠视网膜各层结构清晰、完整、染色均匀,清晰可见 3 个核层,由内向外依次为 GCL、内核层(inner nuclear layer, INL)以及外核层(outer nuclear layer, ONL);神经节细胞呈单层排列,比较连续无间断,细胞大小不一,呈圆形或椭圆形,INL 及 ONL 细胞呈多层分布,内丛状层(inner plexiform layer, IPL)位于 GCL 与 INL 之间,外丛状层(outer plexiform layer, OPL)位于 INL 与 ONL 之间。B 组以 GCL 损伤最为

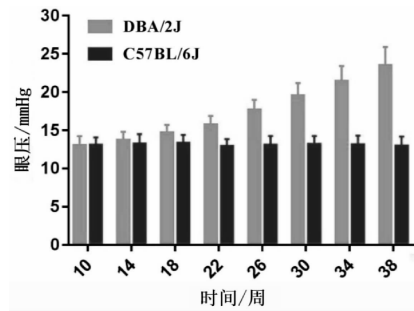


图 1 C57BL/6J 小鼠和 DBA/2J 小鼠 10~38 周龄不同时相点眼压

明显,神经节细胞明显减少,连续性中断,胞内空泡样变性,核固缩。C 组、D 组、E 组、F 组、G 组神经节细胞数目增多,胞内空泡样变性改变均有所改善,以 C 组、D 组、F 组、G 组较为明显。详见图 2。

2.3 各组小鼠视网膜 RGCs 凋亡情况

A 组小鼠视网膜呈现核固缩的细胞较少;B 组在 GCL、INL 及 ONL 层均可见大量核固缩细胞,TUNEL 染色呈现棕褐色且为深染,视网膜厚度明显变薄;C 组、D 组、F 组、G 组核固缩和 TUNEL 阳性细胞数目减少,且为浅染。详见图 3。

与 A 组比较,B 组凋亡指数明显升高($P<0.01$);与 B 组比较,C 组、D 组、E 组、F 组、G 组凋亡指数均明显降低($P<0.01$);与 C 组或 D 组比较,E 组凋亡指数升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),G 组凋亡指数明显降低($P<0.01$)。详见图 4。

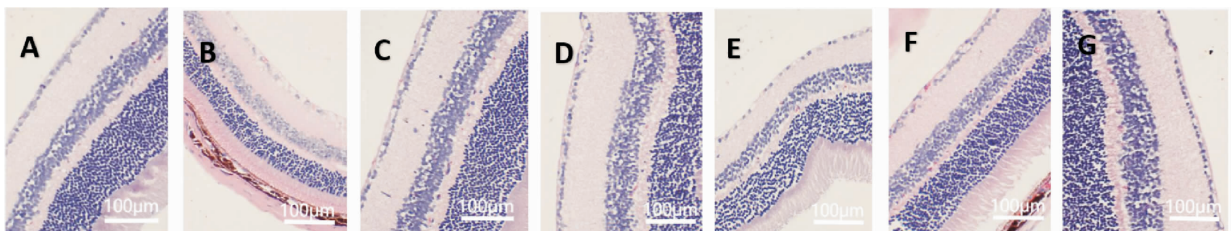


图 2 各组小鼠视网膜组织结构(HE,×400)

注:A.正常对照组;B.青光眼模型组;C.益脉康分散片组;D.青光安Ⅱ号方汤剂组;E.青光安Ⅱ号方有效组分低剂量组;F.青光安Ⅱ号方有效组分中剂量组;G.青光安Ⅱ号方有效组分高剂量组。

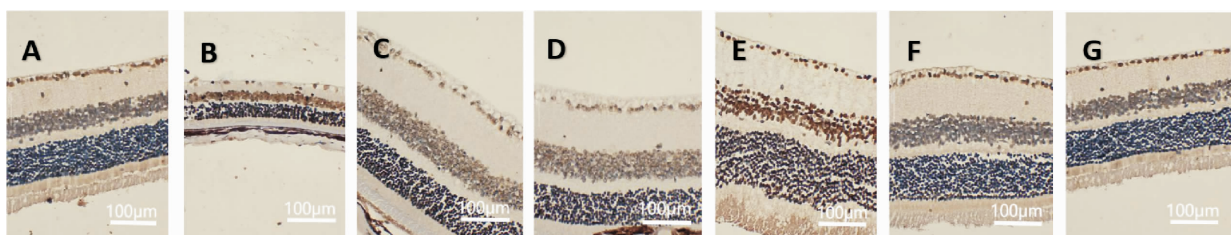


图 3 各组小鼠视网膜神经节细胞层 RGCs 凋亡情况(Tunel,×400)

注:A.正常对照组;B.青光眼模型组;C.益脉康分散片组;D.青光安Ⅱ号方汤剂组;E.青光安Ⅱ号方有效组分低剂量组;F.青光安Ⅱ号方有效组分中剂量组;G.青光安Ⅱ号方有效组分高剂量组。

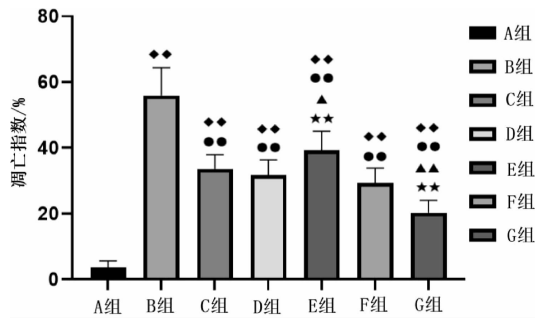


图 4 各组视网膜神经节细胞层凋亡指数比较

注:A.正常对照组;B.青光眼模型组;C.益脉康分散片组;D.青光安Ⅱ号方汤剂组;E.青光安Ⅱ号方有效组分低剂量组;F.青光安Ⅱ号方有效组分中剂量组;G.青光安Ⅱ号方有效组分高剂量组。与A组比较,♦♦ $P<0.01$;与B组比较,●● $P<0.01$;与C组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与D组比较,** $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠视网膜 GSK-3β、β-Catenin 及 Pax6 免疫组化染色情况

GSK-3β、β-Catenin 和 Pax6 蛋白在小鼠视网膜的表达主要位于神经节细胞层,在内核层也可以见

到其少许表达,在神经节细胞层,其表达主要位于细胞质和细胞膜。与A组比较,B组视网膜 GSK-3β 表达量明显升高($P<0.01$),β-Catenin 和 Pax6 表达量明显降低($P<0.01$);与B组比较,C组、D组、E组、F组、G组 GSK-3β 表达量均明显降低($P<0.01$),C组、D组、F组、G组 β-Catenin 表达量均有升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),C组、D组、F组、G组 Pax6 表达量均有升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与C组和D组比较,G组 GSK-3β 表达量降低($P<0.05$),β-Catenin 和 Pax6 表达量升高($P<0.01$)。详见图 5 至图 7、表 2。

2.5 各组视网膜 GSK-3β、β-Catenin、Pax6 蛋白表达量

与A组比较,B组视网膜 GSK-3β 表达量明显升高($P<0.01$),β-Catenin 和 Pax6 表达量明显降低 ($P<0.01$);与B组比较,C组、D组、E组、F组、G组 GSK-3β 表达量均明显降低 ($P<0.01$),C组、D组、G组

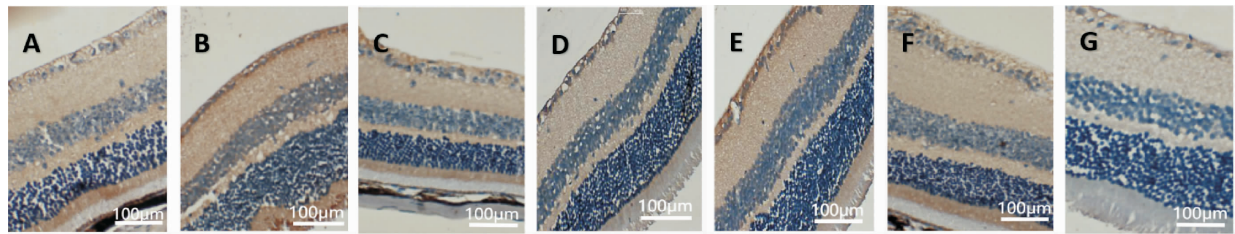


图 5 各组视网膜 GSK-3β 蛋白表达(免疫组化,×400)

注:A.正常对照组;B.青光眼模型组;C.益脉康分散片组;D.青光安Ⅱ号方汤剂组;E.青光安Ⅱ号方有效组分低剂量组;F.青光安Ⅱ号方有效组分中剂量组;G.青光安Ⅱ号方有效组分高剂量组。

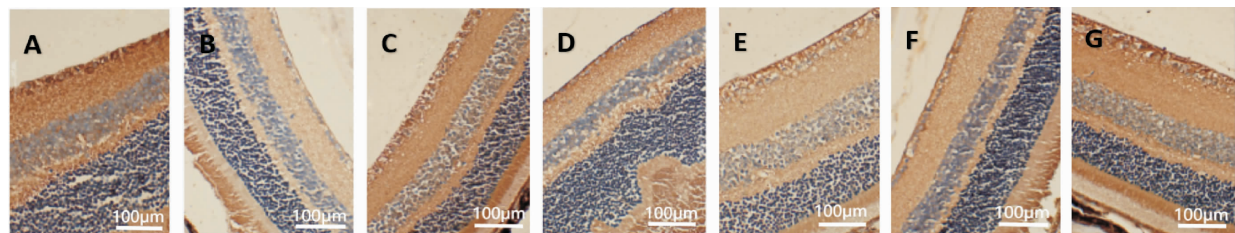


图 6 各组视网膜 β-Catenin 蛋白表达(免疫组化,×400)

注:A.正常对照组;B.青光眼模型组;C.益脉康分散片组;D.青光安Ⅱ号方汤剂组;E.青光安Ⅱ号方有效组分低剂量组;F.青光安Ⅱ号方有效组分中剂量组;G.青光安Ⅱ号方有效组分高剂量组。

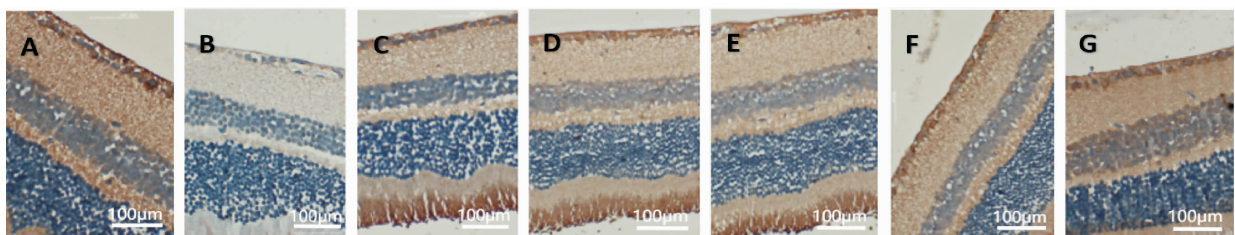


图 7 各组视网膜 pax6 蛋白表达(免疫组化,×400)

注:A.正常对照组;B.青光眼模型组;C.益脉康分散片组;D.青光安Ⅱ号方汤剂组;E.青光安Ⅱ号方有效组分低剂量组;F.青光安Ⅱ号方有效组分中剂量组;G.青光安Ⅱ号方有效组分高剂量组。

表 2 各组小鼠视网膜 GSK-3β、β-Catenin、Pax6 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	GSK-3β	β-Catenin	Pax6
A 组	0.30±0.06	0.78±0.13	0.83±0.13
B 组	0.85±0.07♦♦	0.20±0.08♦♦	0.25±0.05♦♦
C 组	0.62±0.09♦♦♦♦	0.28±0.07♦♦♦♦	0.36±0.07♦♦♦♦
D 组	0.60±0.05♦♦♦♦	0.31±0.08♦♦♦♦	0.37±0.04♦♦♦♦
E 组	0.58±0.06♦♦♦♦	0.32±0.06♦♦	0.39±0.08♦♦
F 组	0.46±0.11♦♦♦♦	0.35±0.07♦♦♦♦	0.42±0.10♦♦♦♦
G 组	0.42±0.03♦♦♦♦▲▲	0.41±0.04♦♦♦♦▲▲	0.49±0.05♦♦♦♦▲▲
F 值	24.280	22.204	21.330
P 值	0.000	0.000	0.000

注:与 A 组比较,♦ $P<0.05$,♦♦ $P<0.01$;与 B 组比较,● $P<0.05$,●● $P<0.01$;与 C 组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与 D 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

β-Catenin 表达量均有升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),C 组、D 组、F 组、G 组 Pax6 表达量均有升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 C 组和 D 组比较,G 组 GSK-3β 表达量降低 ($P<0.05$),β-Catenin 和 Pax6 表达量升高 ($P<0.01$)。详见图 8、表 3。

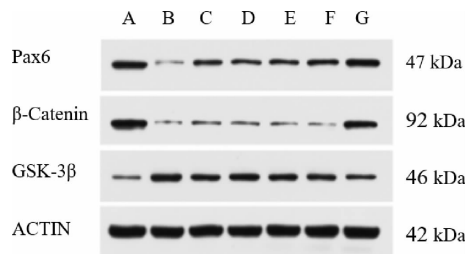


图 8 各组视网膜 GSK-3β、β-catenin 及 Pax6 蛋白电泳图

注:A.正常对照组;B.青光眼模型组;C.益脉康分散片组;D.青光安 II 号方汤剂组;E.青光安 II 号方有效组分低剂量组;F.青光安 II 号方有效组分中剂量组;G.青光安 II 号方有效组分高剂量组。

表 3 各组小鼠视网膜 GSK-3β、β-Catenin、Pax6 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	GSK-3β	β-Catenin	Pax6
A 组	0.25±0.04	0.73±0.07	0.64±0.10
B 组	0.70±0.10♦♦	0.15±0.04♦♦	0.16±0.04♦♦
C 组	0.50±0.08♦♦♦♦	0.25±0.03♦♦♦♦	0.30±0.06♦♦♦♦
D 组	0.52±0.07♦♦♦♦	0.26±0.05♦♦♦♦	0.28±0.06♦♦♦♦
E 组	0.54±0.09♦♦♦♦	0.20±0.04♦♦	0.24±0.05♦♦
F 组	0.49±0.08♦♦♦♦	0.22±0.03♦♦	0.33±0.07♦♦♦♦
G 组	0.38±0.05♦♦♦♦▲▲	0.48±0.09♦♦♦♦▲▲	0.48±0.08♦♦♦♦▲▲
F 值	14.099	54.220	21.205
P 值	0.000	0.000	0.000

注:与 A 组比较,♦ $P<0.05$,♦♦ $P<0.01$;与 B 组比较,● $P<0.05$,●● $P<0.01$;与 C 组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与 D 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3 讨论

DBA/2J 小鼠是一种年龄相关性高眼压青光眼

视神经损伤模型,在一定时期内随着年龄的增长眼压逐渐升高,升高的眼压导致视网膜神经节细胞凋亡和轴突变性。它是由于 GPNMB 和 TYRP1 基因突变^[9]导致虹膜脱色素、虹膜萎缩,脱落的色素和细胞碎片聚集在房水外流通道中,导致房水外流受阻,引起高眼压,继而产生视网膜神经节细胞凋亡、视盘神经纤维层变薄以及视盘变大等视神经损害。SHELDON 等^[10]于 1995 年首次对其进行了描述,该青光眼模型具有自然性、年龄相关性及进展性,类似人类青光眼发病方式,所以在青光眼实验研究中得以广泛使用,特别是在探讨压力相关性视神经节细胞凋亡、视神经变性机制^[11-12]和评估视神经保护药物疗效^[13]等方面。DBA/2J 小鼠的眼压增高程度具有一定的个体化差异,本研究发现,DBA/2J 小鼠 38 周龄时,98 只(196 眼)眼压波动范围在 16~37(23.47±2.44) mmHg,进行离群值取舍后判定眼压波动范围在 16.15~30.79 mmHg 之间,故将眼压<16.15 mmHg 和>30.79 mmHg 的 DBA/2J 小鼠予以剔除。

Wnt/β-Catenin 信号通路主要由 Wnt 家族分子等组成的配体^[14],包括卷曲蛋白(frizzled, FZ)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6(low density lipoprotein receptor related protein 5/6, LRP-5/6)等跨膜受体, GSK-3β、结肠腺瘤样息肉病基因产物(adenomatous polyposis coli, APC)、蓬乱蛋白(dishevelled, Dsh)、β-Catenin、轴蛋白(Axin)等调节蛋白及转录因子 TCF/LEF 家族等组成。当存在分泌的 Wnt 蛋白时,细胞外 Wnt 蛋白与细胞膜上的 FZ/LRP 受体结合启动 Wnt/β-Catenin 信号,然后通过磷酸化并激活细胞浆内的 Dsh 蛋白,抑制 GSK-3β/APC/Axin 复合物对 β-Catenin 的磷酸化,胞浆内 β-Catenin 累积并稳定后会转移至细胞核与 TCF/LEF 家族的转录因子结合,促进下游 Pax6、Ngn2、c-myc、cyclinD1 等靶基因的表达,这些基因多是参与细胞增殖、凋亡调控的基因^[5]。在没有 Wnt 蛋白存在或者 GSK-3β 活化过度时,GSK-3β/APC/Axin 复合物在 GSK-3β 的作用下将降解 β-Catenin,而不能引起下游相关靶基因的表达,使 Wnt/β-Catenin 信号通路处于抑制或关闭状态,因此,GSK-3β 是许多神经退行性疾病的关键调节因子^[15]。

青光眼作为一种眼部神经退行性疾病,病理机制与其他神经退行性疾病相似,存在神经元 Tau 蛋白磷酸化异常、轴浆转运障碍、凋亡及变性等病理改变^[16-18]。在慢性高眼压病程中伴随有 GSK-3 β 活化的危险因素,比如视网膜的缺血缺氧、DNA 损伤、神经营养因子缺乏、 β 淀粉样蛋白异常沉积等^[19-21]。研究也证实,慢性高眼压可引起视网膜视神经 GSK-3 β 活化与过度表达^[22],使视网膜视神经 Wnt/ β -Catenin 信号通路处于抑制状态,包括 Pax6 在内的下游靶基因表达将可能受到抑制,而 Pax6 靶基因可以通过上调 Math5 和 Brn3b 蛋白水平,可以促使胚胎干细胞分化形成视网膜神经节样细胞^[23],参与细胞增殖、凋亡调控。通过抑制 GSK-3 β 过度活化,促使 β -Catenin 表达与向核内转移,可以促进 Wnt/ β -Catenin 信号通路激活,从而达到保护神经系统,延缓神经退行性疾病病程进展的目的^[24-26]。

青光眼的疾病特征就是进行性 RGCs 死亡和神经纤维丧失,凋亡是 RGCs 死亡的主要途径^[1]。SCHUETTAUF 等^[27]用 TUNEL 法标记凋亡的 RGCs,发现 DBA/2J 小鼠 RGCs 凋亡峰时出现在 6 月龄。而杨帆等^[28]用 Nissl 染色标记法追踪 DBA/2J 小鼠 RGCs 丢失情况,发现 RGCs 丢失从 7 月龄开始,高峰时在 9~11 月龄,14 月龄 RGCs 仅零星可见。观察到的 DBA/2J 小鼠 RGCs 凋亡高峰时间不同可能是由于他们采取了不同的研究方法所致。本研究选取 38 周龄的 DBA/2J 小鼠作为青光眼视神经损伤模型,通过 TUNEL 法标记凋亡的 RGCs,发现 38 周龄 DBA/2J 小鼠凋亡指数达到 55.86% \pm 8.53%,明显高于正常对照组($P<0.01$)。进一步说明了 DBA/2J 小鼠自 38 周龄后具有显著的 RGCs 凋亡特征,是理想的青光眼视神经损伤模型,对于评估视神经保护药物的疗效是可行的。采用益脉康分散片、青光安 II 号方、青光安 II 号方有效组分低、中、高剂量干预青光眼模型 DBA/2J 小鼠 4 周,发现益脉康分散片、青光安 II 号方汤剂、青光安 II 号方有效组分低中、高剂量均能够明显延缓或阻止 DBA/2J 小鼠 RGCs 的凋亡;其中青光安 II 号方有效组分高剂量对 DBA/2J 小鼠 RGCs 的凋亡抑制作用明显优于益脉康分散片和青光安 II 号方汤剂。

GSK-3 β 和 β -Catenin 是 Wnt/ β -Catenin 信号通路中的两个关键信号蛋白分子^[29],GSK-3 β 活化

过度时,GSK-3 β /APC/Axin 复合物在 GSK-3 β 的作用下将降解 β -Catenin,不能引起下游 Pax6 等靶基因的表达。通过 Western blot 检测各组小鼠视网膜 GSK-3 β 、 β -Catenin 及 Pax6 蛋白表达量发现,与正常对照组 C57BL/6J 小鼠比较,青光眼模型组 GSK-3 β 在视网膜表达水平明显升高, β -Catenin 和 Pax6 在视网膜表达水平明显降低($P<0.01$),说明 38 周龄后 DBA/2J 小鼠视网膜 Wnt/ β -Catenin 信号通路处于抑制状态,下游 Pax6 基因同样难以表达。益脉康分散片、青光安 II 号方、青光安 II 号方有效组分剂量组干预青光眼模型组 DBA/2J 小鼠 4 周后,发现益脉康分散片、青光安 II 号方汤剂、青光安 II 号方有效组分高剂量均能激活 DBA/2J 小鼠视网膜 Wnt/ β -Catenin 信号通路相关蛋白及下游 Pax6 基因表达,且青光安 II 号方有效组分高剂量组的作用更为明显。

本实验验证了青光安 II 号方有效组分高剂量具有明显抑制青光眼动物模型 RGCs 细胞凋亡、保护视神经的作用,其作用与激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路和下游 Pax6 基因表达关系密切。在后期研究中,本团队将采用 UPLC-Q-TOF 法,结合相关文献和化合物质谱信息,分析鉴定出该有效组分的相关化学成分,为治疗青光眼的中药新药的研发提供基础。

参考文献

- [1] STEIN J D, KHAWAJA A P, WEIZER J S. Glaucoma in adults—Screening, diagnosis, and management[J]. JAMA, 2021, 325(2): 164.
- [2] 颜春薇,蒋鹏飞,彭俊,等.基于数据挖掘分析彭清华教授治疗青光眼的用药经验[J].湖南中医药大学学报,2022,42(3):425-429.
- [3] 蒋鹏飞,彭俊,黄学思,等.青光安 II 号方治疗眼压已控制的青光眼气阴两虚血瘀证患者 60 例临床观察[J].中医杂志,2022,63(5): 443-449.
- [4] 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.
- [5] 周亚莎,徐剑,彭俊,等.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.
- [6] 周亚莎,徐剑,刘悦,等.青光安 II 号对慢性高血压 SD 大鼠模型中视网膜 PAX6 和 Ngn1 及 Ngn2 mRNA 表达的影响[J].国际眼科杂志,2017,17(9):1631-1634.
- [7] DONAHUE R J, FEHRMAN R L, GUSTAFSON J R, et al. BCLXL

- gene therapy moderates neuropathology in the DBA/2J mouse model of inherited glaucoma[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12: 781.
- [8] WANG J, DONG Y. Characterization of intraocular pressure pattern and changes of retinal ganglion cells in DBA2J glaucoma mice[J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2016, 9(2): 211–217.
- [9] ROHOWETZ L J, RIORDAN S, KOULEN P. Corneal abnormalities in the DBA/2J mouse model of glaucoma: DBA/2J-Gpnb+/SjJ as a critical control[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2021, 62(8): 2353.
- [10] SHELDON W G, WARBRITTON A R, BUCCI T J, et al. Glaucoma in food-restricted and ad libitum-fed DBA/2Nnia mice[J]. *Laboratory Animal Science*, 1995, 45(5): 508–518.
- [11] PÉREZ DE LARA M J, AVILÉS-TRIGUEROS M, GUZMÁN-ARÁNGUEZ A, et al. Potential role of P2X7 receptor in neurodegenerative processes in a murine model of glaucoma[J]. *Brain Research Bulletin*, 2019, 150: 61–74.
- [12] WILLIAMS P A, BRAINE C E, KIZHATIL K, et al. Inhibition of monocyte-like cell extravasation protects from neurodegeneration in DBA/2J glaucoma[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 14(1): 6.
- [13] ZHANG Q L, WANG W, JIANG Y, et al. Protective effects of a composition of Chinese herbs-Gurigumu-13 on retinal ganglion cell apoptosis in DBA/2J glaucoma mouse model[J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(3): 363–368.
- [14] LI B, CAI S, ZHAO Y, et al. Nerve growth factor modulates the tumor cells migration in ovarian cancer through the WNT/ β -catenin pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81026–81048.
- [15] FAN Y, WANG J, HE N, et al. PLK2 protects retinal ganglion cells from oxidative stress by potentiating Nrf2 signaling via GSK-3 β [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2021, 35(8): e22815.
- [16] DIKMETAS O, AYGÜN O, KOCABEYOGLU S, et al. Smell sensitivity in primary open-angle Glaucoma and pseudoexfoliation Glaucoma[J]. *Journal of Glaucoma*, 2022, 31(5): 300–304.
- [17] YAN Z, LAI M, JIA Y, et al. CircXPO5 plays a neuroprotective function in the lateral geniculate nucleus of Glaucoma by regulating GRIN2A[J]. *Brain Sciences*, 2022, 12(6): 780.
- [18] ZHOU R R, LI H B, YOU Q S, et al. Silencing of GAS5 alleviates Glaucoma in rat models by reducing retinal ganglion cell apoptosis[J]. *Human Gene Therapy*, 2019, 30 (12): 1505–1519.
- [19] SACCA S C, GANDOLFI S, BAGNIS A, et al. From DNA damage to functional changes of the trabecular meshwork in aging and glaucoma[J]. *Ageing Research Reviews*, 2016, 29: 26–41.
- [20] YAN Z, LIAO H, CHEN H, et al. Elevated intraocular pressure induces amyloid- β deposition and tauopathy in the lateral geniculate nucleus in a monkey model of Glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(12): 5434–5443.
- [21] ODDONE F, ROBERTI G, MICERA A, et al. Exploring serum levels of brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor across Glaucoma stages[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0168565.
- [22] 向艳,高晶,罗班,等.慢性高血压模型鼠视网膜神经节细胞及视神经中9位丝氨酸磷酸化糖原合酶激酶3 β 的表达变化[J]. *眼科新进展*, 2017, 37(4): 326–329, 334.
- [23] GANESH D, COLEMAN A L, SHIBAYAMA V P, et al. Netarsudil-induced corneal flattening in a child with secondary open-angle Glaucoma[J]. *Case Reports in Ophthalmology*, 2022, 13(2): 330–335.
- [24] XIONG S B, HUANG P C, XU S M, et al. microRNA (miR)-29 modified bone marrow stem cells (BMSCs) regulating wnt- β -catenin-p53 pathway to inhibit the migration and proliferation of conjunctival fibroblasts[J]. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2021, 11(8): 1517–1523.
- [25] YAO Y, CHEN X, BAO Y, et al. Puerarin inhibits β -amyloid peptide 1–42-induced tau hyperphosphorylation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(6): 9081–9085.
- [26] 霍江涛,张小乔,严洁,等.川芎嗪激活 Wnt 信号通路改善阿尔茨海默病大鼠脑组织炎症研究[J]. *浙江临床医学*, 2015(8): 1262–1264.
- [27] SCHUETTAUF F, QUINTO K, NASKAR R, et al. Effects of anti-glaucoma medications on ganglion cell survival: The DBA/2J mouse model[J]. *Vision Research*, 2002, 42(20): 2333–2337.
- [28] 杨帆,吴玲玲,郭秀娟,等.青光眼动物模型 DBA/2J 小鼠的眼部特征及组织学观察[J]. *眼科研究*, 2010, 28(2): 103–108.
- [29] LUO H, SONG B, XIONG G, et al. Cadmium inhibits neural stem/progenitor cells proliferation via MitoROS-dependent AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2021, 41(12): 1998–2010.

(本文编辑 苏维)