

·实验研究·

本文引用:姚小磊,时健,刘倩宏,陈立浩,侯念婷. 青光安Ⅱ号方对诱导损伤的RGC-5细胞中NF- κ B/HIF-1 α 通路相关细胞因子的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2021,41(7):992-997.

青光安Ⅱ号方对诱导损伤的RGC-5细胞中NF- κ B/HIF-1 α 通路相关细胞因子的影响

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

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;2.中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙410208;
3.湖南中医药大学,湖南长沙410208;4.广西骨伤医院,广西南宁530001)

〔摘要〕目的 观察青光安Ⅱ号方对谷氨酸诱导损伤的RGC-5细胞中核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α)、BCL2/腺病毒E1B相互作用蛋白3(BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3, BNIP3)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的影响。方法 体外培养RGC-5细胞,分为4组:空白组、模型组、含药血清组和阻断剂组。模型组、含药血清组和阻断剂组予以谷氨酸诱导细胞损伤,模拟青光眼对神经节细胞的损伤,含药血清组加入青光安Ⅱ号方含药血清,阻断剂组加入KC7F2进行HIF-1 α 通路的阻断。以CCK-8法摸索含药血清以及谷氨酸的最佳干预浓度;采用Hoechst法检测各组细胞的凋亡情况;Western blot检测NF- κ B、HIF-1 α 、BNIP3蛋白表达情况;比色法检测SOD、MDA的表达情况。结果 CCK8法确定青光安Ⅱ号方5倍组含药血清为实验量,确定谷氨酸的最佳干预浓度为200 μ M。与空白组比较,模型组NF- κ B、HIF-1 α 、BNIP3、SOD、MDA表达显著升高($P<0.05$);与模型组比较,含药血清组、阻断剂组NF- κ B、HIF-1 α 、BNIP3和SOD的表达显著降低($P<0.05$);含药血清组与阻断剂组的NF- κ B、HIF-1 α 、BNIP3、SOD及MDA差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 青光安Ⅱ号方对NF- κ B具有抑制作用,进而抑制了HIF-1 α 相关通路的激活,减弱了由于氧化应激所致RGC-5细胞的凋亡,对RGC具有保护作用。

〔关键词〕 青光眼;青光安Ⅱ号方;视网膜神经节细胞;核因子 κ B;低氧诱导因子-1 α ;BCL2/腺病毒E1B相互作用蛋白3;超氧化物歧化酶;丙二醛

〔中图分类号〕R276.7

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.07.004

Effects of Qingguangan II Formula on NF- κ B/HIF-1 α Pathway Related Cytokines in Injury-induced RGC-5 Cells

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

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Key Laboratory of Hunan Province for Prevention and Treatment of Eye, Ear, Nose and Throat Diseases with Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;
4. Guangxi Orthopedic Hospital, Nanning, Guangxi 530001, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of Qingguangan II Formula on nuclear factor kappa-B (NF- κ B), hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α), BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 (BNIP3), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in RGC-5 cells injury induced by glutamate. **Methods** The RGC-5 cells cultured in vitro were divided into 4 groups:

〔收稿日期〕2021-03-10

〔基金项目〕国家自然科学基金地区基金项目(81860870);湖南省自然科学基金项目(2018JJ3389);第64批中国博士后科学基金面上资助一等资助项目(2018M640754);中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);湖南中医药大学研究生创新课题项目(219CX69)。

〔作者简介〕姚小磊,男,副主任医师,博士研究生导师,研究方向:中医药防治青光眼、干眼、视网膜静脉阻塞。

〔通信作者〕*侯念婷,女,医师,E-mail:505276872@qq.com。

blank group, model group, drug-containing serum group and blocker group. Glutamic acid was added to model group, drug-containing serum group and blocker group to simulate retinal ganglion cell damage caused by glaucoma, and Qingguangan II Formula serum was added to drug-containing serum group, and the blocker group was added with KC7F2 to block the HIF-1 α pathway. The CCK-8 method was used to find optimal intervention concentration of drug-containing plasma and glutamate; Hoechst method was used to detect the apoptosis of cells in each group; Western blot was used to detect the expression of NF- κ B, HIF-1 α , BNIP3; colorimetry was used to detect the expression of SOD and MDA. **Results** CCK8 method determined 5 times serum content as the Qingguangan II Formula experimental amount, and the optimal intervention concentration of glutamate was 200 μ M. Compared with blank group, the expression of NF- κ B, HIF-1 α , BNIP3, SOD and MDA increased significantly in the model group ($P<0.05$); compared with the model group, the expression of NF- κ B, HIF-1 α , BNIP3 and SOD in the drug-containing serum group and blocker group significantly decreased ($P<0.05$); there was no statistically significant difference between NF- κ B, HIF-1 α , BNIP3, SOD and MDA in drug-containing serum group and blocker group ($P>0.05$). **Conclusion** Qingguangan II Formula has an inhibitory effect on NF- κ B, thereby inhibiting the activation of HIF-1 α related pathways, reducing the apoptosis of RGC-5 cells caused by oxidative stress, it also has a protective effect on RGC.

[**Keywords**] Qingguangan II Formula; retinal ganglion cell; nuclear factor kappa-B; hypoxia inducible factor-1; BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3; superoxide dismutase; malondialdehyde

青光眼为导致人类失明的三大眼类疾病之一。调查显示,2020年全球青光眼患病人数高达7 600万,其中我国占2 100万,位居世界之首^[1],目前,超过40岁以上人群青光眼的总患病康复率仅有1.5%~3.6%^[2],治疗方案主要以控制眼压来保存视力,但是青光眼导致的视神经损伤却不可逆,且没有较好的视神经保护方案。彭清华教授通过多年临床经验总结出“青光安II号方”,研究表明其有较好的临床疗效,尤其对青光眼术后仍存在视力下降的患者,有较好的视神经保护效应^[3],但其具体的机制并不清楚。动物实验中发现青光安II号方对于Caspase-3有影响,可减少视网膜神经细胞的凋亡^[4]。有研究表明,青光眼的视神经损伤可能与氧化应激有关^[5-6],活性氧的增加是小胶质细胞在高眼压过程中死亡的主要原因^[7]。因此,本研究通过实验的方法探讨青光安II号方对RGC-5细胞模型^[8]中核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)/低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α)通路中相关因子的影响,以期明确其视神经保护的相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

取健康SPF级雄性和雌性SD大鼠各30只,由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2019-2004,体质量0.17~0.28 kg。动物实验伦理合格证号:LL2019121901。RGC-5细胞株(批号:CP-M122,武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 药物

中药配方:黄芪(批号:CK19111807)、枸杞子(批号:SL19112203)、灯盏细辛(批号:2019011616)、

牛膝(批号:CK19101401)、川芎(批号:SL19111503)、女贞子(批号:2019011201)均购自湖南中医药大学第一附属医院。

1.3 试剂与仪器

CCK-8试剂盒(批号:CA1210)、30%制胶液(批号:A1010)均购自索莱宝公司;总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(批号:A001-3-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号:A003-1)均购自南京建成公司;Tris(中国医药集团有限公司,批号:30188216);5 \times SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(批号:P0015L)、ECL发光液(批号:P0018S-2)均购自上海碧云天生物技术有限公司;蛋白Marker(赛默飞世尔科技公司,批号:26617);PVDF膜(美国密理博公司,批号:IPVH00010);膜再生液(北京普利莱基因技术有限公司,批号:P1650);HIF-1 α (批号:ab1)、BCL2/腺病毒E1B相互作用蛋白3(BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3, BNIP3)(批号:ab109362)、NF- κ B(批号:ab16502)均购自上海Abcam生物技术有限公司;GAPDH(美国proteintech公司,批号:10494-1-AP);羊抗兔-HRP(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-0295G-HRP);KC7F2(上海浩洋生物科技有限公司,批号:S7946)。

酶标仪(上海碧云天生物技术有限公司,型号:Synergy H4);KHB洗板机(上海科华实验系统有限公司,型号:ST-36WT);电泳仪(伯乐生命医学产品有限公司,型号:1645070);电转仪(伯乐生命医学产品有限公司,型号:BE6085);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:5200)。

1.4 含药血清的获取

将60只SD大鼠随机分成青光安Ⅱ号方10倍组、青光安Ⅱ号方5倍组、青光安Ⅱ号方2.5倍组和空白组。按体表面积换算的方法计算出每只大鼠的灌药量,灌药大鼠均按照10倍成人等效剂量灌胃。适应性饲养1d后开始灌胃,空白对照组灌同等剂量的生理盐水,每日1次。灌胃7d后,提取血清。取血方法:每只大鼠麻醉前1h灌胃,大鼠麻醉、固定,颈总动脉采血,离心提取含药血清和空白血清。青光安Ⅱ号方10倍组:所取血清即为高剂量血清;青光安Ⅱ号方5倍组:所取血清加入1倍体积DMEM低糖培养基,设为中剂量血清;青光安Ⅱ号方2.5倍组:所取血清加入3倍体积DMEM低糖培养基,设为低剂量血清。收集的血清56℃下灭活补体30min,按组别混合后放-80℃冰箱保存。

1.5 含药血清加入量及谷氨酸加入量的摸索

采用CCK-8法确定含药血清及谷氨酸加入量。将细胞以 2×10^4 个/mL、200 μ L/孔的密度接种在96孔板中,在37℃、5% CO₂箱中培养24h,移出孔板,分别加入0、25、100、200 μ M的谷氨酸;继续放回37℃、5% CO₂箱进行培养;24h干预后取出96孔板;向每个孔中添加10 μ L CCK-8反应溶液;在37℃、5% CO₂箱中继续孵育2h;用酶标仪测量450nm处的吸光度(OD),并通过存活率判定各种浓度下的细胞增殖活性,由此选择适当的谷氨酸浓度。同时按照上述方法分别加入3种不同浓度的24 μ L含药血清,通过存活率OD判定各种浓度下的细胞增殖活性。选择适当的含药血清浓度。

1.6 细胞模型建立及分组、干预

使用RGC-5细胞株,培养至状态良好,体外培养的RGC-5细胞分为4组。空白组:10%胎牛血清的DMEM低糖培养基加空白血清进行培养。模型组:细胞培养基中加入谷氨酸,以此模拟RGC-5细胞损伤^[8],10%胎牛血清的DMEM低糖培养基加空白血清进行培养。含药血清组:细胞培养基中加入谷氨酸,以此模拟RGC-5细胞损伤^[8],10%胎牛血清的DMEM低糖培养基加含药血清进行培养。阻断剂组:细胞培养基中加入谷氨酸,以此模拟RGC-5细胞损伤^[8],10%胎牛血清的DMEM低糖培养基加含药血清进行培养,合并使用阻断剂KC7F2^[9]2 μ M处理。

1.7 Hoechst染色法检测细胞凋亡

将细胞以 2×10^4 个/mL、2 mL/孔密度接种于6孔板爬片中,在37℃、5% CO₂箱中培养24h;取出孔板,按以上分组进行处理,先加入200 μ M谷氨酸;

继续在37℃、5% CO₂箱中培养24h;取出孔板,按以上分组换入空白对照血清、5倍青光安血清、以及5倍青光安血清和KC7F2;继续在37℃、5% CO₂箱中培养24h;取出孔板,吸去上清液,每孔加入1 mL Hoechst染色剂,继续在37℃、5% CO₂箱中培养30min;取出孔板,观察是否出现荧光;如果出现荧光,首先吸去上清液,PBS清洗2次,封片。每组拍摄3次。

1.8 四氮唑蓝(tetrazolium blue, NBT)核黄素比色法检测SOD含量

样品6倍稀释后种于6孔板中培养至最佳状态,加入底物、酶,测定孔、测定空白孔加样品20 μ L,对照孔、对照空白孔加超纯水20 μ L。对照孔、测定孔加酶工作液20 μ L;对照空白孔、测定空白孔加酶稀释液20 μ L。每孔加底物应用液200 μ L,混匀后37℃加热20min,450nm处酶标仪读数。结果计算公式:SOD抑制率=[(对照孔OD值-对照空白孔OD值)-(测定孔OD值-测定空白孔OD值)]/(对照孔OD值-对照空白孔OD值)×100%;SOD活力(U/mL)=SOD抑制率/50%×反应体系稀释倍数×样本测试前稀释倍数。

1.9 硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)比色法检测MDA含量

MDA试剂盒准备完毕后,配置相关试剂:(1)试剂一:37℃加热溶解至透明;(2)试剂二:加170 mL超纯水配制;(3)试剂三:加30 mL超纯水后加热95℃充分溶解,再加30 mL冰醋酸,混匀。空白管加无水乙醇20 μ L,标准管加10 nmol/mL标准品20 μ L,测定管加样品20 μ L。每管加试剂一20 μ L,混匀。每管加试剂二3 mL,加试剂三1 mL。用针在离心管盖上扎1个小孔,混匀后95℃加热40min,取出后流水冷却,3 500 r/min离心10min,离心半径20cm,取上清200 μ L加入到酶标板中,532nm处测各管吸光度值。结果计算公式:MDA含量(nmol/mL)=(测定管OD值-空白管OD值)/(标准管OD值-空白管OD值)×标准品浓度×稀释倍数。

1.10 Western blot检测NF- κ B、HIF-1 α 、BNIP3蛋白的表达

RGC-5细胞长至90%铺满时再消化传代。将细胞以 5×10^4 个/mL密度接种于6孔板中,2 mL/孔;按以上分组进行处理,37℃、5% CO₂箱中继续培养24h;吸去上清液,PBS清洗1次;吸去PBS,每孔加入100 μ L蛋白裂解液;细胞刮刀将细胞刮下后吸进1.5 mL离心管中,-80℃保存;从-80℃冰箱中取出样本,置于冰上解冻,4℃下12 000 r/min离

心 20 min,离心半径 20 cm,取上清。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度;根据浓度测定结果对蛋白浓度进行调整,保证不同组别之间蛋白浓度一致,每孔上样量为 30 μg ,与适量 5 \times loading buffer 混匀,95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 后进行上样,剩余样本于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。制备电泳胶、上样电泳、转膜、封闭、孵一抗[用含 2% BSA 的 TBST 稀释相应的一抗,NF- κB (1:2 000)、HIF-1 α (1:500)、BNIP3(1:2 000)];孵二抗[用封闭液稀释 HRP 标记二抗(1:5 000)]、显色曝光、膜洗脱再生,再次进行封闭。内参孵育,加入二抗,曝光。曝光结果使用 Image J 软件分析灰度值。

1.11 统计学分析

用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。先进行正态性及方差齐性检验,若数据呈正态分布,且方差齐,则进行单因素方差分析。若分析结果显示,各组间存在差异,则采用 Tukey 法进行多组比较。若不满足正态性要求,则采用非参数检验,若分布正态但方差不齐者,则采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 含药血清和谷氨酸加入量的确定

含药血清中空白组细胞存活率为 100%,2.5 倍组为 89.05%,5 倍组为 88.96%,10 倍组为 74.93%。为确保含药量,选用 5 倍组作为实验量。细胞培养 24 h 后,谷氨酸加入量为 0 μM 时细胞存活率为 100%、25 μM 时为 95.85%、100 μM 时为 84.87%、200 μM 时为 64.20%,最终选用 200 μM 的谷氨酸为加入量。

2.2 各组细胞凋亡情况

与空白组比较,模型组凋亡细胞个数明显增多,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组和阻断剂组凋亡细胞个数明显减少,差异均有统计学意义($P<0.01$);与含药血清组比较,阻断剂组凋亡细胞个数减少,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 各组细胞凋亡个数($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞计数
空白组	27.00 \pm 6.48
模型组	58.67 \pm 23.64**
含药血清组	43.67 \pm 5.31 [#]
阻断剂组	29.67 \pm 5.56 [#]
F 值	8.095
P 值	0.044

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$

2.3 各组 NF- κB 、HIF-1 α 、BNIP3 蛋白表达情况

与空白组比较,模型组 NF- κB 、HIF-1 α 、BNIP3 蛋白的表达明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,含药血清组及阻断剂组 NF- κB 、HIF-1 α 、BNIP3 蛋白的表达明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);与含药血清组比较,阻断剂组 NF- κB 、HIF-1 α 、BNIP3 蛋白的表达差异无统计学意义($P>0.05$);但与空白组比较,阻断剂组 HIF-1 α 蛋白的表达量明显增加,而 BNIP3 蛋白的表达量明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 2、图 2。

表 2 各组 NF- κB 、HIF-1 α 、BNIP3 蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	NF- κB /GAPDH	HIF-1 α /GAPDH	BNIP3/GAPDH
空白组	0.853 \pm 0.006	0.734 \pm 0.107	0.786 \pm 0.074
模型组	1.352 \pm 0.063*	1.370 \pm 0.092**	1.248 \pm 0.016**
含药血清组	1.008 \pm 0.072 [#]	1.105 \pm 0.086** [#]	0.528 \pm 0.006** [#]
阻断剂组	1.009 \pm 0.120 [#]	1.054 \pm 0.008** [#]	0.597 \pm 0.007** [#]
F 值	16.742	19.809	146.859
P 值	0.010	0.007	0.000

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

2.4 各组 SOD 和 MDA 含量表达情况

与空白组比较,模型组 SOD 及 MDA 的含量明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组 SOD 及 MDA 的含量明显减少、阻断剂组 SOD 明显减少,差异均有统计学意义($P<0.01$);与含药血清组比较,阻断剂组 SOD 含量明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$),MDA 的含量差异无统计学意义($P>0.05$);但与空白组比较,阻断剂组 MDA 的含量明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 3。

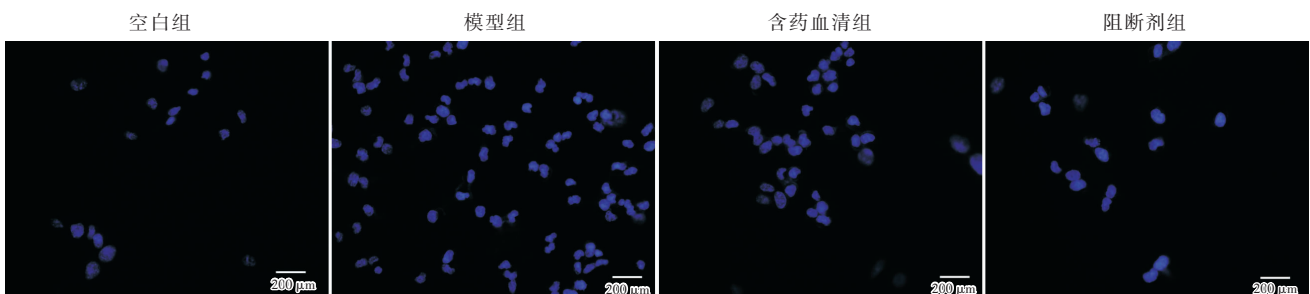


图 1 各组细胞凋亡情况(Hoechst 染色, $\times 400$)

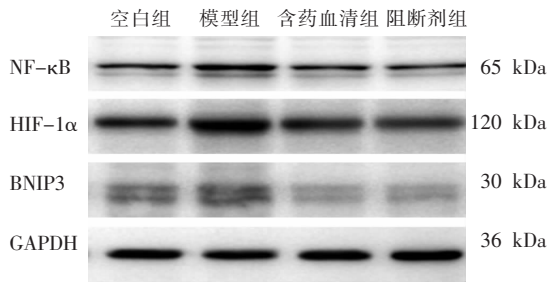


图2 各组 NF-κB、HIF-1α、BNIP3 蛋白表达电泳图

表3 各组 SOD 及 MDA 的含量表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
空白组	20.26±5.16	5.69±1.14
模型组	55.70±7.01**	19.37±4.32**
含药血清组	39.13±10.01***	11.95±3.52 [#]
阻断剂组	29.78±9.11 ^{#△△}	14.46±3.93**
F 值	21.144	16.272
P 值	0.000	0.000

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与含药血清组比较,^{△△} $P<0.01$

3 讨论

青光眼在控制眼压后仍然可引起 RGC 的凋亡,目前对于视神经的挽救方式较少,神经生长因子的效果并不具有优势^[10-11],而干细胞移植仍处于实验室阶段^[12-13]。中医药因其具有庞大的药物组分库,具备从中进行创新药物挖掘的潜力,越来越受到学者的重视。彭清华教授所创制的“青光安 II 号方”对 RGC 的 Caspase-3 表达有抑制作用,能有效抑制 RGC 的凋亡^[4],但青光安 II 号方抑制凋亡的具体机制并不清楚。

氧化应激可能与青光眼的视神经损伤有关^[14-15],研究^[7]表明活性氧的增加是小胶质细胞在高眼压过程中死亡的主要原因,而抑制氧化应激损伤则可以保护胶质细胞^[16]。目前,关于中医药的研究中,细胞黄素、银杏叶提取物对于缺氧损伤的 RGC 具有保护作用^[17-18];枸杞子、丹参、川芎、灯盏细辛等,也具有视神经保护效应^[19]。所以本研究从氧化应激的相关细胞因子进行研究,来验证青光安 II 号方对于 RGC 的保护作用是否是通过调控氧化应激相关因子来实现的。

研究表明,HIF-1α 和 NF-κB 均是氧化应激相关通路中的核心因子,且两者之间还有密切联系:HIF-1α 可诱导缺氧细胞中的 NF-κB 的活化^[20];而 NF-κB 也可与 HIF-1α 启动子结合,上调缺氧反应中 HIF-1α 的表达^[21]。缺氧反应发生后,细胞内氧自由基的大量生成会引发 SOD 的上调,其最终产物 MDA 也

会大量生成;同时引发 BNIP-3 的激活,诱导 RGC 发生线粒体自噬^[22-23]。为了观察青光安 II 号方含药血清是否是通过调控 HIF-1α 发挥作用,本实验中加入 HIF-1α 的阻断剂 KC7F2,它是一种选择性 HIF-1α 蛋白翻译抑制剂,可抑制 HIF-1α 的蛋白合成,进一步抑制 BNIP-3 和 SOD 的激活。

中医学认为青光眼的病理机制是气虚血瘀,脉络阻滞,目系失养,玄府闭塞,神水瘀积^[24],中医治疗宜采用益气活血利水的治法,“青光安 II 号方”在此思想指导下应运而生^[25]。其组方由黄芪、枸杞子、灯盏细辛、牛膝、川芎、女贞子组成,重用枸杞子、女贞子、牛膝三味,归肝肾经,为滋补肝肾之品,其中以枸杞子、女贞子补肝肾明目为君,另加黄芪补气健脾,四药补益正气取其“正气存内,邪不可干”之意,扶助正气以驱邪外出。故本方以补为主,侧重补肝肾之阴,同时在补益基础上,用牛膝及灯盏细辛活血。黄芪利水,川芎行气,一使气行则血行、气行亦水行,二使全方补而不滞。全方补通兼施,使目窍通畅、气血调和,则诸症俱解。

本次研究中,我们使用谷氨酸诱导 RGC-5 细胞损伤,模拟青光眼所造成的 RGC 凋亡^[5,26-27]。本次研究结果中,模型组的 NF-κB、HIF-1α 均出现高表达,与空白组、含药血清组和阻断剂组比较,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),说明当 RGC-5 细胞损伤出现时,会激活其中 NF-κB 表达,进一步激活 HIF-1α 表达,两者可能形成正反馈的调节。SOD、MDA 在模型组中表达升高($P<0.01$),说明在视神经损伤后,细胞内活性氧增加,引发了 SOD 上调以及代谢产生 MDA 的集聚;另外,BNIP-3 在模型组中高表达($P<0.01$),说明在激活 HIF-1α 后,引发了 BNIP-3 途径的线粒体自噬反应,有可能进而形成细胞凋亡。Hoechst 法检测到模型组细胞凋亡数量明显多于其他各组($P<0.01$),也验证了这一点,且与前期研究的结果一致^[4]。而与模型组相比,含药血清组与阻断剂组在谷氨酸致损后,其 NF-κB 表达均得到了一定的抑制,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);同时此两组的 HIF-1α 表达也受到明显抑制($P<0.01$);而含药血清组与阻断剂组之间并无明显差异($P>0.05$),表明含药血清对 RGC-5 细胞产生了组的 BNIP-3 蛋白表达和 SOD 含量均明显受到抑制,表明含药血清在抑制 NF-κB 和 HIF-1α 蛋白表达的基础上,进一步抑制了 BNIP-3 和 SOD 的表达,前者可以减弱 RGC-5 细胞的线粒体自噬,对抑制 RGC 的凋亡有正向作用;而后者将导致 MDA 的减少,与本次实验的结果吻合,最终形成了对细胞凋

亡的抑制作用,表现为含药血清组与阻断剂组的细胞凋亡数量明显减少($P<0.01$)。

综上所述,青光安Ⅱ号方含药血清对谷氨酸诱导损伤的RGC-5细胞中NF- κ B具有抑制作用,进而抑制了HIF-1 α 通路的激活,减弱了由于氧化应激所致的细胞凋亡。

参考文献

- [1] 梁远波,江俊宏.我国青光眼防治问题与展望[J].浙江医学,2020,42(22):2377-2382.
- [2] 梁远波,江俊宏,王宁利.中国青光眼流行病学调查研究回顾[J].中华眼科杂志,2019,55(8):634-640.
- [3] 李银鑫,欧晨,周亚莎,等.彭清华教授采用青光安Ⅱ号方治疗青光眼中晚期视神经损害[J].亚太传统医药,2020,16(12):113-116.
- [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] LIU Y, LEE R K. Cell transplantation to replace retinal ganglion cells faces challenges - the Switchboard Dilemma[J]. Neural Regeneration Research, 2021, 16(6): 1138-1143.
- [6] AHMAD A, AHSAN H. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in ophthalmic disorders[J]. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2020, 41(3): 257-271.
- [7] AIRES I D, BOIA R, RODRIGUES-NEVES A C, et al. Blockade of microglial adenosine A2A receptor suppresses elevated pressure-induced inflammation, oxidative stress, and cell death in retinal cells[J]. Glia, 2019, 67(5): 896-914.
- [8] HU X X, DAI Y, SUN X H. Parkin overexpression protects retinal ganglion cells against glutamate excitotoxicity[J]. Molecular Vision, 2017, 23: 447-456.
- [9] LI J, JIANG G H, CHEN Y L, et al. Altered expression of hypoxia-inducible factor-1 α participates in the epileptogenesis in animal models[J]. Synapse, 2014, 68(9): 402-409.
- [10] EFTIMIADI G, SOLIGO M, MANNI L, et al. Topical delivery of nerve growth factor for treatment of ocular and brain disorders[J]. Neural Regeneration Research, 2021, 16(9): 1740-1750.
- [11] LAMBIASE A, MANTELLI F, BONINI S. Nerve growth factor eye drops to treat Glaucoma[J]. Drug News & Perspectives, 2010, 23(6): 361-367.
- [12] HARADA C, NORO T, KIMURA A, et al. Suppression of oxidative stress as potential therapeutic approach for normal tension Glaucoma[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2020, 9(9): 874-886.
- [13] XIONG S, KUMAR A, TIAN S, et al. Stem cell transplantation rescued a primary open-angle glaucoma mouse model[J]. Elife. 2021, 10: e63677.
- [14] LIU Y, LEE R K. Cell transplantation to replace retinal ganglion cells faces challenges-the Switchboard Dilemma[J]. Neural Regeneration Research, 2021, 16(6): 1138-1143.
- [15] AHMAD A, AHSAN H. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in ophthalmic disorders[J]. Journal of Immunoassay & Immunochemistry, 2020, 41(3): 257-271.
- [16] MEANS J C, LOPEZ A A, KOULEN P. Estrogen protects optic nerve head astrocytes against oxidative stress by preventing caspase-3 activation, tau dephosphorylation at Ser⁴²² and the formation of tau protein aggregates[J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2021, 41(3): 449-458.
- [17] CHO H K, KIM S, LEE E J, et al. Neuroprotective effect of Ginkgo biloba extract against hypoxic retinal ganglion cell degeneration in vitro and in vivo[J]. Journal of Medicinal Food, 2019, 22(8): 771-778.
- [18] MALISHEVSKAYA T N, YUSUPOV A R, SHATSKIKH S V, et al. Efficacy and safety of neuroprotection in patients with primary open-angle Glaucoma[J]. Vestnik Oftalmologii, 2019, 135(2): 83-92.
- [19] 周亚莎,廖林丽,覃艮艳,等.不同中药对青光眼小鼠视网膜 TRPV4 及 TRAAK 蛋白影响的比较研究[J].湖南中医杂志,2020,36(12):153-157.
- [20] LEE S H, LEE Y J, HAN H J. Effect of arachidonic acid on hypoxia-induced IL-6 production in mouse ES cells: Involvement of MAPKs, NF- κ B, and HIF-1 α [J]. Journal of Cellular Physiology, 2010, 222(3): 574-585.
- [21] BELAIBA R S, BONELLO S, Z HRINGER C, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Molecular Biology of the Cell, 2007, 18(12): 4691-4697.
- [22] ZENG C, ZOU T T, QU J Y, et al. Cycloviobuxine D induced-mitophagy through the p65/BNIP3/LC3 axis potentiates its apoptosis-inducing effects in lung cancer cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 5820.
- [23] HUANG Y N, WEN Q L, HUANG J F, et al. Manganese (II) chloride leads to dopaminergic neurotoxicity by promoting mitophagy through BNIP3-mediated oxidative stress in SH-SY5Y cells [J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2021, 26(1): 23.
- [24] 秦裕辉.问目哪得清如许,唯有活血利水来——评《眼科活血利水法的研究》[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(3):381-382.
- [25] 彭俊,曾志成,谭涵宇,等.眼科活血利水法的基础研究进展[J].眼科新进展,2010,30(6):585-589,593.
- [26] SUCHER N J, LIPTON S A, DREYER E B. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells[J]. Vision Research, 1997, 37(24): 3483-3493.
- [27] KRITIS A A, STAMOULA E G, PANISKAKI K A, et al. Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2015, 9: 91.