

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.06.002

◇ 药学研究 ◇

胰激肽原酶对慢性高眼压大鼠视网膜神经节细胞的保护作用及机制

苏杰¹, 杨馥宇¹, 黄帅², 田华¹作者单位:¹华北理工大学附属医院眼科, 河北 唐山 063000; ²邯郸市第三医院眼科, 河北 邯郸 056000

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2020110, QN2017124)

摘要:目的 研究注射用胰激肽原酶对慢性高眼压大鼠眼压及视网膜神经节细胞(RGCs)的保护作用。方法 SD大鼠30只,按随机数字表法分为空白组、模型组、治疗组,每组10只。模型组和治疗组用巩膜静脉烧灼法制作慢性高眼压大鼠模型,造模成功1周后,治疗组给予胰激肽原酶(0.8 U)治疗,而空白组、模型组给予腹腔注射等剂量0.9%氯化钠溶液(0.2 mL),均每天1次,连续2周。监测大鼠眼压的变化并记录数据。苏木精-伊红(HE)染色观察RGCs形态,DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL)测定RGCs凋亡情况,免疫组织化学染色法测定细胞凋亡相关基因B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的含量。结果 造模前眼压各组无明显变化($F=0.152, P>0.05$),造模后模型组[术后1周:(32.85 ± 2.06)mmHg,术后2周:(33.27 ± 2.24)mmHg,术后3周(33.00 ± 1.09)mmHg]与治疗组[术后1周:(32.77 ± 2.07)mmHg,术后2周:(31.68 ± 2.20)mmHg,术后3周(30.09 ± 2.52)mmHg]眼压均升高,与空白组[术后1周:(15.44 ± 1.02)mmHg,术后2周:(15.21 ± 1.41)mmHg,术后3周(14.90 ± 1.32)mmHg]比较差异有统计学意义($F=355.429, F=427.714, F=315.063$;均 $P<0.001$)。HE染色示空白组视网膜各层结构清晰,模型组RGCs排列不规整,细胞缺失,有空泡形成。治疗组细胞排列稍不规整,细胞少量缺失。TUNEL示空白组偶见凋亡细胞,模型组凋亡细胞增多,治疗组凋亡细胞减少,组间比较差异有统计学意义($F=796.179, P<0.001$)。免疫组化示模型组Bcl-2、Bax表达均有所增强,而治疗组较模型组Bcl-2表达增强,Bax表达明显减弱,各组间比较差异有统计学意义($F=389.728, F=525.331$;均 $P<0.01$)。结论 胰激肽原酶可以缓慢降低眼压,还可能通过升高Bcl-2,降低Bax的表达抑制RGCs凋亡,达到保护视神经的目的。

关键词: 高眼压; 胰激肽; 基因; Bcl-2; Bcl-2相关X蛋白质; 视网膜神经节细胞; 胰激肽原酶

The protection and mechanism of pancreatic kininogenase on RGCs in chronic high intraocular pressure rats

SU Jie¹, YANG Fuyi¹, HUANG Shuai², TIAN Hua¹

Author Affiliations: ¹Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; ²Department of Ophthalmology, The Third Hospital of Handan, Handan, Hebei 056000, China

Abstract: Objective To study the protective effect of pancreatic kininogenase on intraocular pressure and retinal ganglion cells (RGCs) in rats with chronic ocular hypertension. **Methods** Thirty SD rats were assigned into blank group, model group and treatment group according to random number table method, 10 rats in each group. The model group and the treatment group used scleral vein cauterization to make a chronic ocular hypertension rat model. After 1 week of successful modeling, the treatment group was given pancreatic kininogenase (0.8 U), while the blank group and the model group were given intraperitoneal injection of 0.9% sodium chloride solution (0.2 mL), once a day for 2 consecutive weeks. Changes in rat intraocular pressure were monitored and recorded. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphology of RGCs, TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) of DNA fragmentation was used to determine the apoptosis of RGCs, and immunohistochemical staining was used to determine the contents of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax. **Results** The pressure had no significant change before modeling ($F=0.152, P>0.05$). After modeling, the model group [1 week after operation: (32.85 ± 2.06) mmHg, 2 weeks after operation: (33.27 ± 2.24) mmHg, 3 weeks after operation (33.00 ± 1.09) mmHg] and the treatment group [1 week after operation: (32.77 ± 2.07) mmHg, 2 weeks after operation: (31.68 ± 2.20) mmHg, 3 weeks after operation (30.09 ± 2.52) mmHg] both had increased intraocular pressures, which was significantly different from that of the blank group [1 week after operation: (15.44 ± 1.02) mmHg, 2 weeks after operation: (15.21 ± 1.41) mmHg, 3 weeks after operation (14.90 ± 1.32) mmHg] ($F=355.429, F=427.714, F=315.063$, respectively; all $P<0.001$). HE staining showed clear structure of the retinal in the blank group. But poorly arranged in the model group, the cells were absent, and the vacuoles were formed. In the treatment group, the cells were slightly irregular and decreased. TUNEL

showed sporadic apoptotic cells in the blank group, increased apoptotic cells in the model group, and decreased apoptotic cells in the treatment group; there were significant differences among the 3 groups ($F = 796.179, P < 0.001$). Immunohistochemical staining showed increased expressions of Bcl-2 and Bax in the model group, and the expression of Bcl-2 was higher and the expression of Bax was significantly lower in the treatment group than in the model group; the differences among the groups were statistically significant ($F = 389.728, F = 525.331$; all $P < 0.01$). **Conclusion** The pancreatic kininogenase can slow down the intraocular pressure gradually, and inhibit the apoptosis of the retinal ganglion cells to protect the optic nerve by increasing the expression of Bcl-2 and reducing the expression of Bax.

Key words: Ocular hypertension; Kallidin; Genes, Bcl-2; Bcl-2-associated X protein; Retinal ganglion cells; Pancreatic kininogenase

青光眼是一种以视神经萎缩和视野缺损为共同特征的一种疾病,与视网膜神经节细胞(RGCs)的死亡或凋亡密切相关^[1]。但RGCs死亡或凋亡的机制如何,至今仍是人们讨论的焦点,寻找一种有效防止RGCs死亡或凋亡的药物至关重要。胰激肽原酶在体内以酶原形式存在,可以作用于激肽原释放出激肽,具有扩张血管、改善血液循环、降低血压等作用^[2],还可以改善视网膜微循环,减轻视网膜缺血缺氧状态^[3],但是否可降低眼内压,延缓RGCs的凋亡?尹连荣、高健生^[4]的研究表明黄芪对RGCs有保护作用,目前胰激肽原酶并无人探讨。本实验于2018年3—6月通过制作慢性高眼压模型,给予腹腔注射胰激肽原酶,研究用药后眼压的变化、RGCs的凋亡情况,以及与细胞凋亡相关基因B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的关系,以期为青光眼的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康SD大鼠30只,月龄范围为2~3月,体质量范围为200~250 g,雌雄各15只,由华北理工大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(京)2014-0004,环境温度:19~22℃,湿度:50%~60%,自由饮食饮水。实验前已签署华北理工大学动物实验伦理审查表(编号:2018003)。造模前眼前节及眼底检查均未见明显异常,按随机数字表法分为三组:空白组、模型组、治疗组,每组10只。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 用经典的巩膜静脉烧灼法制作慢性高眼压大鼠模型,方法:采用3%戊巴比妥腹腔注射全麻,右眼点用丙美卡因滴眼液3次,顺上方角膜缘做放射状切口,分离周边筋膜及肌肉,使用加热的弯曲针头针对颞上、颞下以及鼻上象限3条上巩膜静脉予以烧灼处理,术后0.9%氯化钠溶液冲洗。采用手持压平式眼压计监测大鼠眼压,眼压 ≥ 23 mmHg为造模成功。造模成功1周后,治疗组给予腹腔注射胰激肽原酶0.8 U(常州千红药业),药物剂量换算依据体表面积换算法得出,而空白组、模

型组给予腹腔注射等剂量0.9%氯化钠溶液(0.2 mL),均每天1次,连续2周。

1.2.2 RGCs苏木精-伊红(HE)染色 实验结束后手术摘除眼球,眼球标本常规石蜡包埋,制备切片,入苏木精水溶液染色,流水冲洗,70%和90%乙醇各脱水10 min,入伊红染色2 min,纯乙醇脱水,二甲苯透明,选择中性树胶封片处理,光镜下观察视网膜各层形态。

1.2.3 Bcl-2、Bax免疫组化及DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL) 制备的切片按照Bcl-2、Bax免疫组化试剂盒说明书进行操作,切片经过脱蜡,抗原修复,血清封闭,加一抗、二抗,二氨基联苯胺(DAB)显色,复染,脱水,封片。观察RGCs中各因子的表达。每只动物选取不连续的3张切片,于高倍显微镜(40倍)下选取2个视野(每个视野50 620 μm^2),应用Image-pro-plus软件观察光密度(OD)值。凋亡染色同样按照TUNEL试剂盒说明书进行操作,高倍镜下观察凋亡细胞阳性细胞率。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0数据包进行统计,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间整体比较进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。三组间两两比较采用Bonferroni校正的 t 检验, $P < 0.017$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼压分析 各组造模前眼压稳定($P > 0.05$)。造模后模型组与治疗组眼压均升高,与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),治疗组用药后眼压稍有下降,但无临床意义。见表1。

表1 慢性高眼压大鼠各组眼压的变化/(mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术前	术后1周	术后2周	术后3周
空白组	10	15.10 $\pm$ 1.54	15.44 $\pm$ 1.02	15.21 $\pm$ 1.41	14.90 $\pm$ 1.32
模型组	10	14.83 $\pm$ 2.07	32.85 $\pm$ 2.06 ^a	33.27 $\pm$ 2.24 ^a	33.00 $\pm$ 1.09 ^a
治疗组	10	14.64 $\pm$ 1.99	32.77 $\pm$ 2.07 ^a	31.68 $\pm$ 2.20 ^a	30.09 $\pm$ 2.52 ^a
F 值		0.152	355.429	427.714	315.063
P 值		0.860	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P < 0.01$

2.2 各组大鼠视网膜HE染色情况 正常大鼠的视网膜各层结构清晰,各层细胞排列规整有序。模型组可见视网膜结构有所变薄,RGCs排列不规则,分布紊乱,细胞数量减少、缺失,空泡形成。治疗组RGCs排列较规整,数量轻度减少,可见少量空泡形成。

2.3 各组大鼠RGCs TUNEL染色情况 正常大鼠视网膜肉眼未见TUNEL阳性细胞,模型组可见大量的TUNEL阳性细胞染色,胞核呈深棕色,治疗组也存在TUNEL阳性细胞,但数量较少且染色较浅。各组间凋亡率比较差异有统计学意义($P < 0.001$),见表2。

2.4 各组大鼠视网膜Bcl-2、Bax表达情况 健康大鼠视网膜中存在少量的Bcl-2、Bax蛋白表达,模型组Bcl-2、Bax表达均有所增强,治疗组较模型组Bcl-2表达升高,Bax表达下降。各组因子阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.001$),见表2。

表2 各组大鼠Bcl-2、Bax的表达
与视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡情况/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Bcl-2	Bax	TUNEL/%
空白组	10	0.421±0.589	0.361±0.566	0.301±0.535
模型组	10	15.180±3.326 ^a	22.289±2.665 ^a	23.192±2.100 ^a
治疗组	10	23.012±2.974 ^{ab}	17.409±2.777 ^{ab}	19.638±2.595 ^{ab}
F值		389.728	525.331	796.179
P值		0.000	0.000	0.000

注:Bcl-2为B细胞淋巴瘤/白血病-2,Bax为Bcl-2相关X蛋白,TUNEL指DNA断裂的原位末端标记法。与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$

3 讨论

青光眼是世界上主要致盲眼病之一,主要原因是视神经的不可逆损伤^[5-6],视网膜节细胞凋亡是视神经损伤的主要方式^[7],视网膜内5层仅由视网膜中央动脉(终末动脉)供血,较易发生缺血,而RGCs在缺血缺氧环境中极易受损,并且再生能力有限^[8],所以阻止或延缓RGCs的丧失是保护青光眼病人视功能的关键,抑制神经节细胞凋亡对青光眼的救治有重要价值^[9]。

胰激肽原酶属于丝氨酸蛋白酶类,在生物体内以酶原形式存在。它可作用于体内激肽原释放出激肽,激肽可以松弛平滑肌,扩张微血管,提高微血管内血液流速,增加灌注,改善代谢及微循环,扩张血管的同时降低血压,胰激肽原酶还可抑制血小板聚集,防止血栓形成,增加微血管交连,有利于侧支循环建立,改善视网膜组织缺血缺氧状态等^[10-11]。胰激肽原酶目前主要应用于改善糖尿病视网膜病

变病人眼底微循环,青光眼病人暂无应用报道。本实验通过制作大鼠慢性高眼压模型,腹腔注射胰激肽原酶,研究结果显示:胰激肽原酶腹腔注射后,治疗组眼压较模型组有所降低,但未达到正常范围(10~21 mmHg),眼压无明显临床意义,眼压下降原因考虑可能为激肽作用于血管壁,扩张房水静脉,导致房水引流增多所致。但下降的眼压是否对保护RGCs有所帮助,需进一步研究证实。

正常视网膜各细胞层结构清晰,细胞排列有序。本实验HE染色显示:模型组RGCs排列稀疏、紊乱,细胞变性、凋亡,数量减少,空泡形成较多,而治疗组用药后RGCs形态明显改善,损伤较轻,空泡细胞减少,说明胰激肽原酶腹腔注射后可以有效保护RGCs,修复损伤。

有研究表明,RGCs的凋亡受到多种基因调控,而Bcl-2、Bax对RGCs的凋亡起主要调控作用^[12]。Bcl-2蛋白可以与一些细胞凋亡相关细胞结合,影响这些细胞的传导通路最终达到抑制凋亡的目的^[13]。它是一种抗细胞凋亡基因,可抑制细胞的凋亡,而Bax是促凋亡蛋白,与Bcl-2结合后封闭其活性,导致细胞凋亡^[14]。免疫组化实验结果显示:模型组与治疗组较空白组Bcl-2、Bax表达均增多,胰激肽原酶腹腔注射2周后,与模型组相比,治疗组Bcl-2表达增加,Bax表达减少,差异有统计学意义,说明胰激肽原酶可以上调抗细胞凋亡因子Bcl-2的表达,下调Bax促细胞凋亡因子的表达,从而实现抗细胞凋亡,因此,胰激肽原酶通过调控Bcl-2、Bax的表达可以达到保护RGCs的目的。

有研究表明,青光眼不管损伤机制是如何形成和发展,最后的结局即RGCs的凋亡,可应用TUNEL技术来测定细胞凋亡的情况^[15]。TUNEL染色是常用的观察凋亡的实验方法,正常大鼠RGCs层偶见凋亡细胞,本实验结果显示:空白组未见明显凋亡细胞,模型组较治疗组凋亡细胞增多,组间比较差异均有统计学意义,提示眼压升高后可导致RGCs发生凋亡坏死,而胰激肽原酶腹腔注射对RGCs具有保护作用,减少凋亡。

综上所述,胰激肽原酶可以改善视网膜微循环,轻度降低眼压,上调促凋亡因子Bcl-2,下调凋亡因子Bax的表达,抑制RGCs凋亡,达到保护视神经节细胞的目的,为青光眼的进一步治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] WAN C, QIAN J, LI F, et al. Ultrasound-targeted microbubble de-

- struction enhances polyethylenimine-mediated gene transfection in vitro in human retinal pigment epithelial cells and in vivo in rat retina[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2835-2841.
- [2] 袁源智, 袁非. 激肽系统与糖尿病视网膜病变[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(2): 436-440.
- [3] 王华敏, 张孟丽. 胰激肽原酶治疗糖尿病早期视网膜病变的临床效果[J]. 糖尿病新世界, 2016, 19(6): 108-109.
- [4] 尹连荣, 高健生. 黄芪对高血压大鼠视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(10): 828-832.
- [5] 梁静, 万新顺. 川芎嗪对慢性高血压大鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响[J]. 眼科新进展, 2013, 33(8): 717-720, 728.
- [6] YOU Y, GUPTA VK, LI JC, et al. Optic neuropathies: characteristic features and mechanisms of retinal ganglion cell loss[J]. Rev Neurosci, 2013, 24(3): 301-321.
- [7] 程辉, 孙兆霞, 宋育泽. 丹参预处理对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的作用及对Bcl-2表达的影响[J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(1): 17-20.
- [8] 杜红彦, 李建良, 骆煌, 等. 川芎嗪注射液对高血压大鼠视网膜Bcl-2、Bax 蛋白表达和视网膜神经节细胞凋亡的影响[J]. 中国中医急症, 2017, 26(10): 1703-1706.
- [9] 张楠, 周利晓, 孙成林. 利鲁唑对急性高血压致大鼠视网膜损伤的保护作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2015, 53(8): 27-31.
- [10] 刘克锋, 周霖, 赵杰. 胰激肽原酶联合递法明治疗糖尿病视网膜病变的疗效观察[J]. 中国药房, 2016, 27(2): 250-252.
- [11] 顾杰, 赵东生. 胰激肽原酶治疗糖尿病早期视网膜病变120例[J]. 国际眼科杂志, 2012, 12(6): 1170-1171.
- [12] WANG DY, RAY A, RODGERS K, et al. Global gene expression changes in rat retinal ganglion cells in experimental glaucoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(8): 4084-4095.
- [13] VERMA P, PFISTER JA, MALLICK S, et al. HSF1 protects neurons through a novel trimerization- and HSP-independent mechanism[J]. J Neurosci, 2014, 34(5): 1599-1612.
- [14] 张婷婷, 赵岩松, 王海宇, 等. N-乙酰-5-羟色胺(NAS)对视网膜缺血再灌注损伤(RIRI)大鼠视网膜活性Caspase-3、Bcl-2、Bax表达的影响[J]. 眼科新进展, 2017, 37(8): 701-704, 708.
- [15] 谭可, 谭蕾, 王莹. 尿激酶对慢性青光大鼠视神经保护机制研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(15): 1626-1628, 1631.

(收稿日期: 2018-09-13, 修回日期: 2018-10-29)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.06.003

◇ 药学研究 ◇

阿托伐他汀联合葛根素对激素性股骨头缺血性坏死的作用机制研究

胡彦婷^{1a}, 汪瑜^{1a}, 熊德建^{1a}, 黄歆^{1a}, 杨云戟^{1a}, 罗梅懿², 张霞^{1b}作者单位:¹成都市第七人民医院,^a骨科,^b护理部, 四川 成都610041;²四川省医学科学院、四川省人民医院特需门诊, 四川 成都610072

通信作者: 张霞, 女, 副主任护师, 研究方向为肿瘤护理学, E-mail: 19054963@qq.com

摘要: **目的** 研究阿托伐他汀和葛根素对股骨头缺血性坏死大鼠的治疗作用及作用机制。 **方法** 50只SD大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、阿托伐他汀组、葛根素组、联合用药组, 每组10只。除空白组外, 其余各组用脂多糖联合甲强龙建立大鼠激素性股骨头缺血性坏死模型。各组大鼠用对应药物灌胃给药, 连续8周。酶联免疫吸附剂测定(ELISA)检测大鼠血清中碱性磷酸酶(ALP)和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)的含量; 苏木精-伊红(HE)染色观察病理变化及DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL法)观察细胞凋亡; 实时荧光定量PCR(qPCR)检测核因子- κ B受体活化因子(RANK)和核因子- κ B受体活化因子配基(RANKL)mRNA, 并用蛋白质印迹法(Western Blot)检测骨保护蛋白(OPG)、RANK、RANKL和肿瘤坏死因子受体相关因子6 (TRAF-6)蛋白表达。 **结果** 空白组大鼠血清中ALP和TGF- β 1含量分别为(25.23 $\pm$ 1.24)IU/L和(47.12 $\pm$ 2.41)ng/mL, 而模型组大鼠血清中ALP含量升高, TGF- β 1含量降低, 分别为(31.86 $\pm$ 1.23)IU/L和(37.74 $\pm$ 2.68)ng/mL; 与模型组相比, 联合用药组能够降低ALP和升高TGF- β 1含量($P < 0.01$), 分别为(26.96 $\pm$ 1.54)IU/L和(44.12 $\pm$ 2.42)ng/mL; HE染色结果显示模型组大鼠股骨头组织被破坏, 血管减少; 联合用药组的软骨细胞排列整齐, 骨髓腔内有大量造血细胞, 脂肪细胞分布均匀。RT-PCR和蛋白质印迹法结果显示模型组OPG、RANK、RANKL和TRAF-6表达量升高。与模型组相比, 联合用药组能提高OPG、RANK和降低RANKL、TRAF-6表达量($P < 0.05$)。 **结论** 阿托伐他汀联合葛根素可有效治疗激素性股骨头缺血性坏死, 作用机制可能与OPG/RANKL/RANK信号通路有关。

关键词: 股骨头坏死/药物疗法; 核因子 κ B受体活化因子; RANK配体; 骨保护素; 碱性磷酸酶; 肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (TRAF-6); 阿托伐他汀; 葛根素