

# 补精益视片对大鼠慢性高眼压模型视神经 PI3K/Akt 通路 MDM2、p53 表达的影响

刘欢<sup>1</sup> 李翔<sup>2</sup> 刘红佶<sup>3</sup> 袁铭悦<sup>4</sup> 李祥玉<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的 观察补精益视片对 SD 大鼠慢性高眼压(Elevated Intraocular Pressure, EIOP)模型视神经 PI3K/Akt 通路 MDM2、p53 表达的影响,探讨其作用机理。方法 30 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和给药组。采用烙闭上巩膜静脉法建立大鼠慢性 EIOP 模型,对照组、模型组予生理盐水灌胃,给药组予补精益视片混悬液灌胃,连续 8 周。记录造模前、造模后即刻、造模后 8 周大鼠的眼压,用免疫组化法检测视神经 MDM2、p53 总面积、积分光密度和平均光密度。结果 (1)眼压:给药组造模后 8 周眼压较造模后即刻低(均  $P < 0.05$ )。(2)视神经 MDM2:给药组总面积( $0.1625 \pm 0.026$ )  $\mu\text{m}^2$ 、积分光密度( $2086.70 \pm 744.326$ )、平均光密度( $210.36 \pm 2.730$ )均较对照组( $0.2604 \pm 0.047$ )  $\mu\text{m}^2$ 、 $3548.57 \pm 906.465$ 、 $215.62 \pm 1.627$ )低(均  $P < 0.05$ ),较模型组( $0.0910 \pm 0.027$ )  $\mu\text{m}^2$ 、 $1195.86 \pm 334.984$ 、 $202.32 \pm 3.124$ )高(均  $P < 0.05$ )。(3)视神经 p53:给药组总面积( $2.6553 \pm 0.396$ )  $\mu\text{m}^2$ 、积分光密度( $96419.47 \pm 38603.142$ )、平均光密度( $208.40 \pm 4.817$ )均较对照组( $1.9827 \pm 0.350$ )  $\mu\text{m}^2$ 、 $29393.33 \pm 9977.039$ 、 $199.97 \pm 5.905$ )高(均  $P < 0.05$ ),较模型组( $3.3768 \pm 0.168$ )  $\mu\text{m}^2$ 、 $345824.79 \pm 56678.048$ 、 $217.81 \pm 4.378$ )低(均  $P < 0.05$ )。结论 补精益视片可能有保护 SD 大鼠慢性 EIOP 模型视神经的作用,表现为轻度降低眼压,上调 MDM2 表达,下调 p53 表达。

**【关键词】** 青光眼; SD 大鼠慢性高眼压模型; 视神经; 补精益视片; MDM2; p53

DOI:10.3969/j.issn.1674-9006.2020.02.004

中图分类号:R77

**Effect of bujinyishi tablet on the expression of MDM2、p53 in the PI3K/Akt pathway of the optic nerve in rat model of chronic elevated intraocular pressure** Liu Huan<sup>1</sup>, Li Xiang<sup>2</sup>, Liu Hongji<sup>3</sup>, Yuan Mingyue<sup>4</sup>, Li Xiangyu<sup>3</sup> (1. Ziyang Hospital of TCM, Ziyang, Sichuan, 641300; 2. Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 610072; 3. Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 610075; 4. Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ankang, Shanxi, 725000)

**【Abstract】 Objective** To observe effect of BuJingYiShi tablet on the expression of MDM2 and p53 in PI3K/Akt pathway of optic nerve in SD Rat Model of Chronic Elevated Intraocular Pressure, and explore its mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups: control group, model group and treatment group. Establishment of chronic EIOP model in rats by cauterization of superior scleral vein. The rats in treatment group were treated with the suspension of Bujing Yishing tablet after making model, control group and model group were given physiological saline for 8 consecutive weeks. Record IOP before modeling, immediately after modeling and 8 weeks after modeling. Measured the total area, integral optical density and mean optical density of the MDM2 and p53 in optic nerve. **Results** (1) IOP: Compared with immediately after modeling, IOP in treatment group at 8 weeks after modeling is decreased, the difference was statistically significant (all  $P < 0.05$ ). (2) MDM2 expression in optic nerve as follows: Total area ( $0.1625 \pm 0.026$ )  $\mu\text{m}^2$ , integrated optical density ( $2086.70 \pm 744.326$ ) and average optical density ( $210.36 \pm 2.730$ )

基金项目: 1 国家自然科学基金(编号:81373695); 2 四川省中医药管理局科学技术研究基金(编号:2018LC008); 3 四川省科学技术厅应用基础研究项目(编号:2018JY0658); 4 成都中医药大学杏林学者提升计划(编号:YXRC2019009)

作者单位: 1. 641300, 四川资阳, 资阳市中医医院; 2. 610072, 四川成都, 成都中医药大学附属医院; 3. 610075, 四川成都, 成都中医药大学; 4. 725000, 陕西安康, 安康市中医医院

通讯作者: 李翔, E-mail: jeannelxiang@126.com

2.730) in treatment group were lower than control group ( $0.2604 \pm 0.047 \mu\text{m}^2$ ,  $3548.57 \pm 906.465$ ,  $202.32 \pm 3.124$ , all  $P < 0.05$ ), which were obviously higher than model group ( $0.0910 \pm 0.027 \mu\text{m}^2$ ,  $1195.8 \pm 334.984$ ,  $217.81 \pm 4.378$ , all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Bujinyishi tablet is possible to protect the optic nerve of the chronic EIOP model of rats. Its function as follows: Slight reduction of intraocular pressure; Increase the content of myelin sheath of optic nerve; and it may up-regulate the expression of MDM2 in PI3K/Akt pathway of optic nerve and down-regulate the expression of p53 in PI3K/Akt pathway of optic nerve.

**【Keywords】** Glaucoma; SD rat Chronic high intraocular pressure model; Optic nerve; BuJingYiShi tablet; MDM2; p53

青光眼是继白内障后的世界第二大致盲性眼病<sup>[1]</sup>,高眼压为主要的危险因素,将眼压控制到靶眼压范围内是目前青光眼的主要治疗措施,可即使眼压降至正常范围内,视神经的损伤仍在继续发展,最终致视力丧失<sup>[2]</sup>。而且,临床上患者首次就诊时,病情常常均已至中晚期、视神经已明显损害。因此如何保护视神经已成为青光眼研究的重点和难点。本实验采用烙闭上巩膜静脉法<sup>[3]</sup>建立 SD 大鼠慢性 EIOP 模型,观察补精益视片对 SD 大鼠慢性 EIOP 模型视神经 PI3K/Akt 通路 MDM2、p53 表达的干预作用,探讨补精益视片对 SD 大鼠慢性 EIOP 模型视神经损害的保护机制,为补精益视片治疗青光眼视神经损害提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康清洁级 SD 大鼠 30 只,8~12 周龄,体重 160~200g,检查无外眼部疾病,瞳孔对光反射、眼压正常,无歪颈,由成都达硕实验动物有限公司提供。补精益视片(批号:20170328),购自成都中医药大学附属医院;MDM2(批号: BIO11033)、p53(批号: BIO14497)抗体试剂盒,均由 BeacomBio 公司提供;复合固定液由成都中医药大学附属医院病理科提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及模型建立** 30 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和给药组,每组 10 只。模型组与给药组予烙闭大鼠右眼 3 支上巩膜静脉造模处理,对照组予暴露巩膜上静脉但不行烙闭处理(为假烙闭)。具体方法如下:大鼠称重、固定、麻醉及消毒铺巾后,在上穹隆角膜缘剪开球结膜 180°,暴露巩膜静脉,用眼科手术烙闭器烙闭角巩膜缘后 3~4mm 近赤道部约 10、12 和 1 钟位的 3 支上巩膜静脉血管,烙闭后近角膜缘端的血管充盈扩张,远角膜缘端的血管血流消失表示烙闭成功,术毕术眼涂金霉素眼膏,待大鼠苏醒后放回笼内,氯霉素眼液每天 2 次滴眼,连续 1 周。

**1.2.2 给药方法** 造模后 3 天给药,对照组、模型组予 3mL 生理盐水灌胃;给药组以  $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的标准(相当于成人剂量的 20 倍)予补精益视片混悬液

3ml 灌胃。每天同一时间灌胃 1 次,连续 8 周。每 2 周称大鼠体重 1 次,根据体重调整给药量。

### 1.3 IOP 测量

用 TONO-PEN 眼压计每日固定时间测量 IOP。测量 3 组大鼠造模前、造模后即刻、造模后 8 周 IOP。

### 1.4 取材及固定

造模 8 周后以颈椎脱臼法处死大鼠,取眼球及视神经在内的组织块,放置于中性甲醛液中固定 72 小时后,标本采用梯度酒精脱水,石蜡包埋,选取球后 2~4mm 的视神经,做常规  $4 \mu\text{m}$  连续切片,烘干备用。

### 1.5 免疫组织化学法检测视神经 MDM2、p53 的表达

石蜡切片常规脱蜡至水,过氧化氢室温孵育 10min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)浸泡 5 分钟;10%的正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10min,滴加适当比例稀释的 MDM2 或 p53,37°C 孵育 2h, PBS 洗涤;滴加生物素标记二抗工作液,37°C 孵育 30min, PBS 洗涤;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37°C 孵育 30 min, PBS 洗涤;DAB 显色,脱水、透明、封片,显微镜观察阳性表达为棕黄色染色。每张切片随机取 5 个不同视野,用 Mias-2000 型图形图像分析仪测量视神经 MDM2 和 p53 阳性染色总面积及积分光密度、平均光密度的均值,作为该玻片的测量值。

### 1.6 统计学方法

用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组内大鼠造模前后眼压的比较采用配对 *t* 检验,组间眼压值及检测指标的总面积、积分光密度和平均光密度值的比较采用方差分析;如为非正态分布,则用非参数检验。按  $\alpha = 0.05$  为检验水准, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IOP 情况

各组大鼠造模前、造模后即刻及造模后 8 周 IOP 情况见表 1。由表 1 可见:造模前 3 组眼压比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。模型组和给药组的造模后即刻、造模后 8 周均较造模前眼压高,差异均有统计学

意义( $P < 0.05$ )。模型组造模后 8 周与造模后即刻眼压比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而给药组造模后 8 周较造模后即刻眼压低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 造模前、造模后即刻及造模后 8 周各组大鼠眼压值统计表(单位: mmHg,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	造模前	造模后即刻	造模后 8 周
空白组	14.10±1.80	15.20±1.47	15.00±1.30
模型组	14.30±1.88	25.89±1.91 $\Delta\Delta$	25.50±1.40 $\Delta\Delta\star$
治疗组	14.50±1.52	26.70±2.01 $\Delta\Delta$	24.00±2.01 $\Delta\Delta\star$

注:与造模前比较, $\Delta P < 0.05$ ; Compared with control group, $\Delta P < 0.05$ ; Compared with models building, $\star P < 0.05$ ; 1 kPa = 7.5 mmHg.

## 2.2 补精益视片对大鼠慢性 EIOP 模型视神经 PI3K/Akt 通路 MDM2 表达的影响

各组视神经 MDM2 表达的总面积、积分光密度、

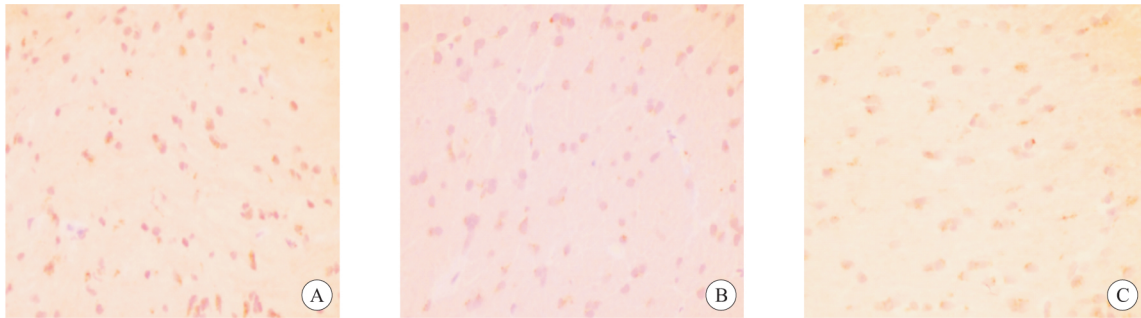


图 1 各组视神经 MDM2 免疫组化阳性染色( $\times 400$ )。A:对照组; B:模型组; C:给药组

## 2.3 补精益视片对大鼠慢性 EIOP 模型视神经 PI3K/Akt 通路 p53 表达的影响

各组视神经免疫组化检测 p53 表达的总面积、积分光密度、平均光密度结果见表 3、图 2。由上可知,造模后模型组和给药组视神经 p53 均上升,两组 p53 阳性染色总面积、积分光密度及平均光密度均较对照组高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组 p53 阳性染色总面积、积分光密度及平均光密度与给药组相

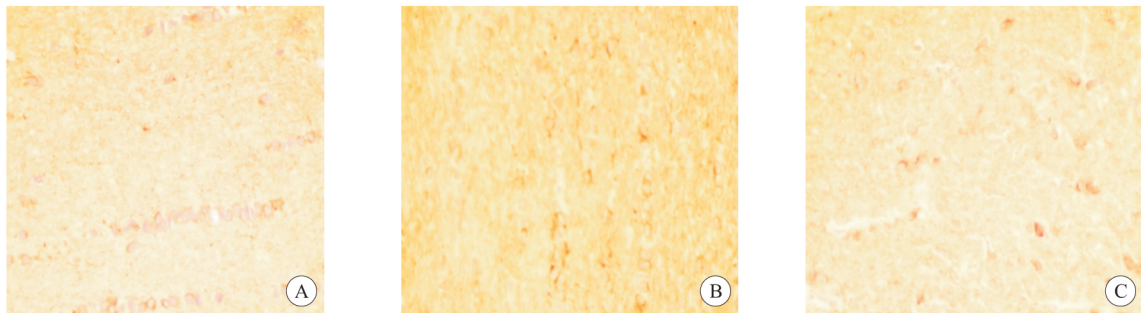


图 2 各组视神经 p53 免疫组化阳性染色( $\times 400$ )。A:对照组; B:模型组; C:给药组

## 3 讨论

PI3K/Akt 信号通路为近年来基因调控细胞凋亡

平均光密度结果见表 2、图 1。由上可知,造模后模型组和给药组视神经 MDM2 表达均下降,两组 MDM2 阳性染色总面积、积分光密度及平均光密度较对照组低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组 MDM2 阳性染色总面积、积分光密度及平均光密度与给药组相比,明显偏低,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 各组视神经 MDM2 的表达情况( $\bar{x} \pm s$ )

指标检测	总面积( $S/\mu m^2$ )	积分光密度	平均光密度
对照组	0.2604±0.047	3548.57±906.465	215.62±1.627
模型组	0.0910±0.027 $\star$	1195.86±334.984 $\star$	202.32±3.124 $\star$
给药组	0.1625±0.026 $\Delta$	2086.70±744.326 $\Delta$	210.36±2.730 $\Delta$
F	36.574	17.069	40.632
P	0.000	0.000	0.000

注: $\star$ 与对照组及给药组比较  $P < 0.05$ ;  $\Delta$ 与对照组比较  $P < 0.05$ 。

比,明显偏高,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 3 各组视神经 p53 的表达情况( $\bar{x} \pm s$ )

指标检测	总面积( $S/\mu m^2$ )	积分光密度	平均光密度
对照组	1.9827±0.350	29393.33±9977.039	199.97±5.905
模型组	3.3768±0.168 $\star$	345824.79±56678.048 $\star$	217.81±4.378 $\star$
给药组	2.6553±0.396 $\Delta$	96419.47±38603.142 $\Delta$	208.40±4.817 $\Delta$
F	28.404	104.219	18.576
P	0.000	0.000	0.000

注: $\Delta$ 与对照组比较  $P < 0.05$ ;  $\star$ 与对照组及给药组比较  $P < 0.05$ 。

的研究热点。PI3K/Akt 信号通路有促进神经元存活的作用<sup>[4-6]</sup>。国外已有实验证明 PI3K/Akt 信号通路

对 RGCs 的凋亡过程起抑制作用<sup>[7]</sup>,但具体作用机理仍不清楚。研究发现,PI3K/Akt 信号通路对于神经细胞的存活有着特殊的重要性。我们前期对大鼠慢性高眼压模型视网膜神经节细胞 PI3K/Akt 信号转导通路中 p-Akt 的表达进行了分析,证实了通过上调 p-Akt 的表达可修复和保护 RGCs<sup>[8]</sup>。MDM2、p53 亦为 PI3K/Akt 信号转导通路中的相关因子,PI3K 为整个信号通路的起点,PI3K 被激活后,激活后的产物与 Akt 的 PH 结构域结合,实现激活 Akt,激活后的 Akt 使 MDM2 的第 166 位和 188 位丝氨酸磷酸化,增加 MDM2 蛋白的稳定性,促进 p53 降解,从而对细胞发挥作用<sup>[5]</sup>。MDM2 是对细胞生长有调节作用的癌基因,对细胞有增强生存活力、延长生存期及促进增生等作用<sup>[9]</sup>。p53 是人体重要的肿瘤抑制因子,具有调控细胞 DNA 修复和诱导细胞衰老、自噬、凋亡等作用<sup>[10]</sup>。MDM2 和 p53 在细胞内互相制衡,MDM2 抑制 p53 转录活性,促进 p53 降解;p53 翻译 MDM2,激活 MDM2 基因转录,二者形成负反馈调节。病理情况下,当 MDM2 减少,不能降解或抑制 p53 转录活性,使 p53 在细胞内的含量增加,导致细胞周期停滞或凋亡。

青光眼归属于中医的“五风内障”,多由风火痰虚瘀等导致气血失和、气滞血瘀、玄府闭塞、神水瘀积,日久肝肾两亏、神光衰微甚至泯灭,不睹三光而成青盲(青光眼视神经损害),故肝肾不足、脉络瘀滞为青光眼视神经损害的主要病机。补精益视片(原名益视片),是中医眼科名家陈达夫据古方“驻景丸”加减化裁而成,由菟丝子、楮实子、枸杞子、五味子、茺蔚子、车前子、丹参、三七、青皮、木瓜组成,具有滋养肝肾、活血通络的功效,为补肾活血法的代表方。现代药理研究表明补精益视片中多种药物均含各种微量元素、氨基酸等成分,能调节免疫,保持机体内环境的平衡<sup>[11]</sup>。前期研究亦证实:补精益视片能轻度降低眼压<sup>[12]</sup>,保护 SD 大鼠慢性高眼压模型的 RGCs<sup>[13]</sup>,抑制感光细胞凋亡,修复视网膜和提高视力<sup>[14]</sup>等。

本研究通过观察补精益视片对 SD 大鼠慢性

EIOP 模型视神经 PI3K/Akt 通路 MDM2、p53 表达的干预作用。结果发现,补精益视片能轻度降低 SD 大鼠慢性 EIOP 模型的眼压,上调视神经 PI3K/Akt 通路凋亡抑制因子 MDM2、下调凋亡促进因子 p53 的表达,推测补精益视片保护青光眼视神经的作用机制可能是通过降眼压及调控 PI3K/Akt 通路的多个相关因子来实现的。

#### 4 参考文献

- [1] 李诺,黄丽娜,曾平. 青光眼视神经保护治疗的研究进展[J]. 中国中医眼科杂志,2013,23(3):231-233.
- [2] 郝晓丽. 银杏叶片联合弥可保对青光眼术后视神经保护的疗效观察[J]. 河北大学学报,2010,30(12):1332-1335.
- [3] 吴真真,朱益华. 烙印上巩膜静脉建立大鼠慢性高眼压模型[J]. 福建医科大学学报,2012,46(6):415-418.
- [4] 冯美江,丁新生. Akt 与细胞生存[J]. 国外医学:分子生物学分册,2002,(5):29-31.
- [5] 杨章民,王一理,司履生. 磷酸酰肌醇-3 激酶家族研究进展[J]. 国外医学:分子生物学分册,2003,(5):285-289.
- [6] 张薇薇,苗玲. PI3K/Akt 信号通路及其在神经疾病中的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志,2007,24(6):755-757.
- [7] Jian Min Luo, Ling Ping Cen, Xin Mei Zhang, *et al.* PI3K/akt, JAK/STAT and MEK/ERK pathway inhibition protects retinal ganglion cells via different mechanisms after optic nerve injury [J]. *European Journal of Neuroscience*,2007,26:828-842.
- [8] 汪伟,李翔,王桃,柯欣怡,刘红信,贾正品,牟琳. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型视网膜神经节细胞 PI3K/Akt 信号转导通路 p-Akt 表达的影响[J]. 眼科新进展,2015,35(9):816-820.
- [9] 李玉梅,吴穷,秦叔逵. Mdm2 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2012,17(3):277-281.
- [10] Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells [J]. *Nature*,1979,278(5701):261-263.
- [11] 陈涛,马娜. 补精益视片联合甲钴胺片治疗眼压控制后青光眼疗效观察[J]. 陕西中医,2015,36(10):1385-1386.
- [12] 李翔,王桃,柯欣怡,刘红信. 补精益视片对大鼠慢性高眼压模型视网膜 p-Akt 表达的影响[J]. 眼科新进展,2015,35(12):1105-1108.
- [13] 李翔,王桃,柯欣怡. 补精益视片对大鼠慢性高眼压模型视网膜损害的影响[J]. 眼科新进展,2015,35(10):909-912.
- [14] 汪辉,汪涓,张玲. 补精益视片对孔源性视网膜脱离复位术后视功能的影响[J]. 成都中医药大学学报,2011,34(2):23-24.