

引文格式: 李翔, 王桃, 柯欣怡, 刘红佶. 补精益视片对大鼠慢性高血压模型视网膜 p-Akt 表达的影响[J]. 眼科新进展, 2015, 35(12): 1105-1108. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0303

【实验研究】

## 补精益视片对大鼠慢性高血压模型视网膜 p-Akt 表达的影响<sup>△</sup>

李翔 王桃 柯欣怡 刘红佶

作者简介: 李翔, 女, 1964年7月出生, 四川西昌人, 博士, 主任医师, 教授, 硕士、博士研究生导师。四川省中医药学会眼科专业委员会副主任委员。联系电话: 13658080415; E-mail: jeannelxiang@126.com

**About LI Xiang:** Female, born in July, 1964. Ph. D. Director of physician, professor, master's and doctoral tutor. Tel: 13658080415; E-mail: jeannelxiang@126.com

收稿日期: 2015-03-15

修回日期: 2015-07-09

本文编辑: 盛丽娜

△基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 81373695/H2713); 成都中医药大学科技发展基金资助(编号: 030018024)

作者单位: 610072 四川省成都市, 成都中医药大学附属医院眼科

通讯作者: 王桃, E-mail: wtwang1986@163.com

Received date: Mar 15 2015

Accepted date: Jul 9 2015

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No: 81373695/H2713); Chengdu University of Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Foundation(No: 030018024)

From the Department of Ophthalmology, the Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

**Responsible author:** WANG Tao, E-mail: wtwang1986@163.com

### Effects of Bujingyishipian on the expression of retinal p-Akt in rat model of chronic elevated intraocular pressure

LI Xiang, WANG Tao, KE Xin-Yi, LIU Hong-Ji

**【Key words】** glaucoma; bujingyishipian; optic nerve; rat model of chronic elevated intraocular pressure; retina; p-Akt

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of bujingyishipian on retinal p-Akt in SD rat model of chronic elevated intraocular pressure (EIOP) and explore the mechanism of it initially.

**Methods** Thirty SD rats were randomly and equally divided into 3 groups: control group, model group and treatment group, 10 rats in each group. By unilaterally cauterizing 3 episcleral vessels, the rat model of chronic EIOP was established in model group and treatment group. After given bujingyishipian (1.8 g · kg<sup>-1</sup>, once per day) or normal saline for 8 weeks, the rats were sacrificed. The intraocular pressure (IOP), expression of retinal p-Akt were observed. **Results** At models building and 8 weeks after-models, IOP was obviously increased by unilaterally cauterizing episcleral vessels (all  $P < 0.01$ ); IOP was obviously reduced at 8 weeks after-models in treatment group compared models building ( $P < 0.01$ ), while model group was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). At 8 weeks after-models, the immunohistochemical analysis of retinal p-Akt expression showed that the total area in treatment group was (74 631.81 ± 12 841.30) μm<sup>2</sup>, mean optical density was 939.26 ± 175.17, integrated optical density was 37 814.96 ± 5822.71, while the total area in model group was (37 947.26 ± 8050.51) μm<sup>2</sup>, mean optical density was 481.45 ± 161.02, integrated optical density was 18 907.64 ± 4367.29, there were statistical differences between two groups (all  $P < 0.01$ ). Though mean black degree in treatment group (138.55 ± 8.58) was little higher than model group (136.52 ± 3.81), there was no significant difference in statistics ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Bujingyishipian can protect the visual function on the rat model of chronic EIOP by up-regulating the expression of retinal p-Akt and reducing IOP slightly.

**【关键词】** 青光眼; 补精益视片; 视神经; 大鼠慢性高血压模型; 视网膜; p-Akt

**【摘要】 目的** 观察补精益视片对大鼠慢性高血压(elevated intraocular pressure, EIOP)模型 p-Akt 表达的干预作用, 探讨其作用机理。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 对照组、模型组、给药组。模型组和给药组采用烙闭上巩膜静脉法建立 SD 大鼠慢性 EIOP 模型, 给药组每天予 1.8 g · kg<sup>-1</sup> 体质量补精益视片混悬液灌胃, 对照组、模型组每天予 3 mL 生理盐水灌胃, 连续给药 8 周, 并于 8 周末处死大鼠, 观察各组大鼠眼压、视网膜 p-Akt 表达的情况。结果 模型组、给药组大鼠造模后即刻直至造模后 8 周与造模前眼压相比均升高, 差异均有统计学意义(均为  $P < 0.01$ ); 造模后 8 周眼压与造模后即刻相比, 给药组有降低趋势, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 模型组无降低趋势, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。造模后 8 周视网膜 p-Akt 表达免疫组织化学分析示: 给药组总面积、平均光密度和积分光密度分别为 (74 631.81 ± 12 841.30) μm<sup>2</sup>, 939.26 ± 175.17 和 37 814.96 ± 5822.71, 与模型组的 (37 947.26 ± 8050.51) μm<sup>2</sup>, 481.45 ± 161.02 和 18 907.64 ± 4367.29 相比, 差异均有显著统计学意义(均为  $P < 0.01$ ); 给药组平均黑度为 138.55 ± 8.58, 虽高于模型组的 136.52 ± 3.81, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 补精益视片通过降低眼压、上调视网膜 PI3K/Akt 信号转导通路中 p-Akt 的表达而保护慢性 EIOP 模型 SD 大鼠的视功能。

青光眼是一组以进行性视神经萎缩和视野缺损为特征的不可逆性致盲眼病, 长期以来一直受到人们的关注。其起病隐匿, 不易发现, 患者常因未及时救治而失明<sup>[1]</sup>。其发病基数大, 致残率高, 已成为继白内障后第二大致盲眼病。本病病因、病理机制复

杂, 迄今尚未明确, 病理性眼压增高是其主要危险因素之一, 但部分患者眼压控制后视神经萎缩和视野缺损仍然呈进行性发展。因此探讨青光眼视功能损害机制与保护方法具有重要意义。本实验采用烙闭上巩膜静脉的造模方法诱导产生眼压维持稳定、持

续时间较长的慢性高血压(elevated intraocular pressure, EIOP)动物模型<sup>[2]</sup>,选取补精益视片作为干预药物,通过观察慢性EIOP大鼠眼压及PI3K/Akt信号转导通路中视网膜p-Akt的表达变化,探讨补精益视片对视功能保护的作用机理,为补精益视片在青光眼的临床应用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 标准1级SD大鼠30只,雌雄不拘,8~12周龄,体质量150~200g,全价饲料饲养,大鼠及饲料均由成都中医药大学实验动物中心提供。饲养室温20~25℃,空气流通,相对湿度55%~75%,12h光照维持,昼夜循环。自由摄食饮水。纳入标准:(1)无外眼疾病;(2)双眼瞳孔直接对光反射和间接对光反射正常;(3)无歪颈。SD大鼠购回后适应性喂养3d,测量眼压,取眼压为9~18mmHg(1kPa=7.5mmHg)者,以SPSS 17.0统计软件产生随机数字,分为对照组、模型组、给药组,每组各10只。

**1.1.2 药品与试剂** 补精益视片由成都中医药大学附属医院生产,批号:20120625。p-Akt试剂盒由Orbigen美国(四川生工科技有限公司)提供,批号SY-3879813。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模方法** 模型组与给药组在眼科显微镜下烙闭右眼巩膜上静脉进行造模处理,对照组右眼暴露巩膜上静脉后未行巩膜上静脉热处理,为假烙闭。模型组和给药组均单眼(右眼)造模。方法为<sup>[2]</sup>:大鼠称体质量、麻醉及固定后,用30g·L<sup>-1</sup>戊巴比妥钠按1.5mL·kg<sup>-1</sup>行左下腹腔注射全身麻醉,同时术眼予5g·L<sup>-1</sup>盐酸丙美卡因滴眼液角结膜表面麻醉,于10点至2点钟位距角巩膜缘1~2mm处剪开上方球结膜,分离筋膜,暴露角巩膜缘后3~4mm近赤道部10点、12点和1点钟位处3支巩膜上静脉并以眼科手术止血器烙闭,整复球结膜,术眼涂金霉素眼膏,待大鼠苏醒后放回笼内,2.5g·L<sup>-1</sup>氯霉素眼液滴眼,每天2次,连续6d。对照组眼科手术止血器不开开关而不起烙闭作用,其余操作相同。左眼不作处理。因为灌胃原因动物死亡6只(每组各2只)。

**1.2.2 给药方法** 3组大鼠均连续灌胃8周,给药组大鼠每天予1.8g·kg<sup>-1</sup>体质量的补精益视片混悬液灌胃,相当于20倍成人剂量。对照组、模型组每天予3mL生理盐水灌胃。每天均于16:00~18:00灌胃1次,连续灌胃8周。均于每2周称体质量1次,根据大鼠体质量调整给药量。

**1.2.3 取材及标本处理** 给药8周后以颈椎脱臼法处死大鼠,沿角巩膜缘剪开球结膜,分离筋膜,剪断眼外肌,靠近眼眶剪断视神经,视神经保留长约1mm,完整剥离眼球,立即放入福尔马林-乙酸-乙醇

混合液中固定48h,蒸馏水洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明、浸蜡、包埋,常规切片4μm,烘干备用。

### 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 眼压测量** 采用TONO-PEN笔式眼压计每天固定时间进行各组眼压测量。连续测定造模前3d眼压,取平均值为正常眼压;造模后即刻、2周、4周、6周、8周各测一次眼压。

**1.3.2 视网膜p-Akt免疫组织化学检测** (1)实验步骤:切片常规脱蜡至水,体积分数3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育10min,以消除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗,PBS浸泡5min,体积分数10%的正常山羊血清(PBS稀释)封闭,室温孵育10min,倾去血清,勿洗,滴加稀释的p-Akt一抗(稀释倍数1:100)4℃过夜,PBS冲洗5min×3次,滴加生物素标记二抗工作液,放入37℃温箱中孵育30min,PBS冲洗5min×3次,DAB显色剂显色,在显微镜下掌握染色程度,自来水充分冲洗10~15min,复染,脱水,透明,封片。(2)分析:视网膜各层组织内出现棕黄色着色为p-Akt阳性染色。每张切片选取p-Akt表达最多的5个视野,每组共35个视野,用Mias-2000型图形图像分析仪测量视网膜部位p-Akt阳性染色面积、平均光密度、积分光密度、平均黑度,求取每张切片5个视野的染色面积总和、平均光密度总和、积分光密度总和、平均黑度总和。

**1.4 统计学方法** 应用统计学软件SPSS 17.0进行数据分析,实验结果的所有计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。符合正态分布的计量资料:多组间比较采用单因素方差分析,组内的前后比较采用配对样本t检验,两组间比较采用独立样本t检验。对不符合正态分布的计量资料采用非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组眼压情况** 各组大鼠造模前后眼压情况见表1、图1。由表1可见,造模前各组眼压比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );给药组、模型组造模后即刻至造模后8周眼压均较造模前明显升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$ ),且两组造模后即刻至造模后8周眼压均较对照组明显升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$ ),以上结果说明成功制备了大鼠EIOP模型。给药组造模后8周与造模后即刻相比,差异亦有统计学意义( $P < 0.01$ ),而模型组造模后8周与造模后即刻相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明给药组有一定的降眼压作用。

**2.2 PI3K/Akt信号通路中p-Akt的表达** 各组大鼠视网膜p-Akt的表达比较情况见表2、图2。由表2可知,模型组大鼠视网膜p-Akt的染色总面积、积分光密度、平均黑度与对照组相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$ ),平均光密度差异无统计学意义( $P > 0.05$ );而给药组染色总面积、平均光密度、积

分光密度与对照组和模型组相比,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.01$ );给药组平均黑度明显大于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而给药组平均黑度虽高于模型组,但其差异并无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示慢性 EIOp 大鼠模型视网膜 p-Akt 表达

表 1 各组大鼠不同时间点眼压情况  
 Table 1 IOP in each group at different time  
 ( $\bar{x} \pm s$  P/mmHg)

Group	Eyes	Pre-models	Models building	8 weeks after-models
Control	8	14.10 ± 1.79	15.20 ± 1.48	15.00 ± 1.31
Model	8	14.30 ± 1.89	25.89 ± 1.90* #	25.50 ± 1.41* #
Treatment	8	14.50 ± 1.51	26.70 ± 2.00* #	24.00 ± 2.00* #△
F		0.130	124.890	100.330
P		0.876	0.000	0.000

Note: Compared with pre-models building, \*  $P < 0.01$ ; Compared with control group, #  $P < 0.01$ ; Compared with models building, △  $P < 0.01$

表 2 各组大鼠视网膜 p-Akt 的表达

Table 2 Expression of retinal p-Akt in each group

Group	Eyes	Total area( $S/\mu m^2$ )	Mean optical density	Integrated optical density	Mean black degree
Control	8	24 214.43 ± 10 045.86	454.71 ± 129.41	10 113.84 ± 4092.58	121.49 ± 5.87
Model	8	37 947.26 ± 8050.51 <sup>△#</sup>	481.45 ± 161.02 <sup>#</sup>	18 907.64 ± 4367.29* <sup>#</sup>	136.52 ± 3.81*
Treatment	8	74 631.81 ± 12 841.30*	939.26 ± 175.17*	37 814.96 ± 5822.71*	138.55 ± 8.58*
F/ $\chi^2$		43.151	21.236	60.344	14.888
P		0.000	0.000	0.000	0.000

No: Compared with control group, \*  $P < 0.01$ , △  $P < 0.05$ ; Compared with treatment group, #  $P < 0.01$

均增强,尤以给药组明显,说明补精益视片可增强慢性 EIOp 大鼠视网膜 p-Akt 的表达。

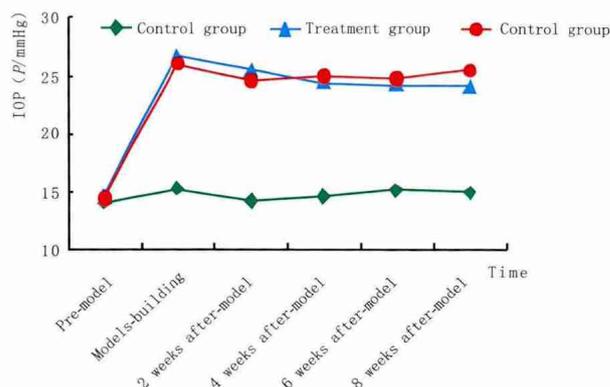


Figure 1 Changes of IOP in each group at different time 各组大鼠不同时间点眼压变化情况

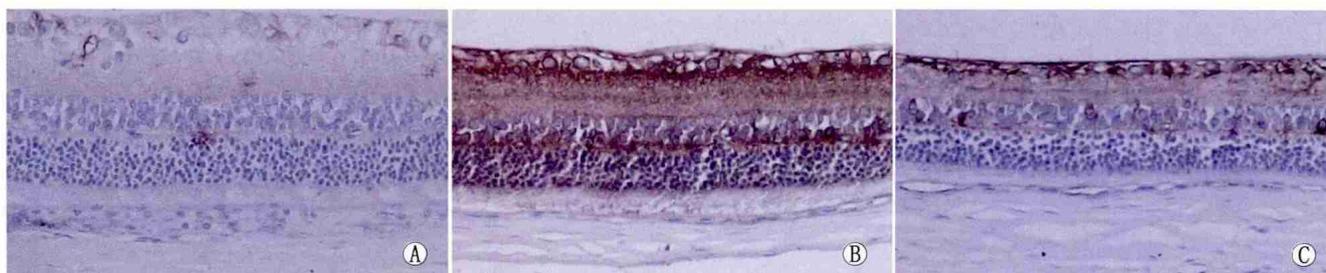


Figure 2 Retinal p-Akt staining ( $\times 200$ ). A: Control group; B: Treatment group; C: Model group 视网膜 p-Akt 染色 ( $\times 200$ )。A: 对照组; B: 给药组; C: 模型组

### 3 讨论

青光眼视功能损害的病因、病理至今未明,目前多考虑与机械损伤、缺血及遗传、基因易感性等相关。但无论哪种因素,青光眼视功能损害中最核心的问题是视网膜视神经病变,病理表现为视网膜变薄、视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)损伤、变性、凋亡<sup>[3]</sup>。临床上,降低眼压是治疗青光眼的主要方法。但部分患者尽管眼压已降至正常,但 RGCs 的凋亡和视野缺损仍在继续,部分患者眼压正常却发生了典型青光眼性 RGCs 损害,称为正常眼压性青光眼(normal tension glaucoma, NTG)。由此可知,单纯降眼压可能并不能完全终止青光眼视神经进行性损害,视功能保护对青光眼预后也非常重要。因此,通过药物或其他干预方法使未受损、轻度受损或处于毒性内环境中临近凋亡的 RGCs 得以存活或

延长生存时间,从而最大程度地保留残存视力和视野是青光眼视功能保护的重要手段。

祖国医学认为青光眼类似于“五风内障”及“青盲”与肝肾关系密切。“五风内障”基本病理为目中玄府闭阻,脉络不利,神水瘀滞<sup>[4]</sup>,日久则肝肾虚损、脉络瘀滞而成“青盲”。补精益视片由枸杞子、菟丝子、五味子、丹参、三七、菟蔚子、楮实子、车前子、青皮、木瓜组成,具有滋养肝肾、活血通络的功效,正契合青光眼视神经病理改变“肝肾虚损、脉络瘀滞”的主要病理机制。以往研究表明,补精益视片可抑制感光细胞凋亡,减轻光感受器损伤及防治视网膜变性<sup>[5]</sup>;且可在一定程度上促进视网膜脱离术后视功能的恢复<sup>[6]</sup>;具有稳定或改善高度近视患者视力及玻璃体混浊的作用<sup>[7]</sup>,由以上可见补精益视片有较好的视功能保护及改善作用。

近年来的许多研究都已证实 PI3K/Akt 信号通

路中的 p-Akt 的高表达可以促进细胞生长、抑制细胞凋亡。随着研究的深入,有学者<sup>[8]</sup>发现多种生长因子的表达都需要通过 PI3K/Akt 这一信号转导通路而发挥作用,目前该激酶级联反应已被公认为是促进生长因子表达、保护细胞生存的一个重要通路。PI3K 普遍存在于机体内各类细胞中<sup>[9]</sup>,参与细胞信息传递、细胞增生和分化,抑制细胞凋亡等一系列生理过程。许多细胞因子和理化因素可以激活 PI3K/Akt 信号通路,活化的 PI3K 催化产生有磷酸根的多磷酸肌醇脂,包括 3-*A*-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)和 3-*A*-5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)等。蛋白激酶 B (PKB 或 Akt) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 PI3K 的活化物质,主要负责由 PI3K 始动的生物信息转导。生长因子等胞外因子通过与其相应的酪氨酸激酶受体结合,引导 PI3K 移动至附近的浆膜。活化的 PI3K 催化产生的 PIP3 可诱导无活性的 Akt 激活,激活后的 Akt 即 p-Akt 通过直接磷酸化凋亡机器组件或间接改变编码凋亡机器组件的基因表达水平来控制凋亡过程,主要作用于线粒体、核糖体、内质网等细胞器内,发挥抗凋亡、促进细胞增殖和分化的重要作用。有研究报道,红细胞生成素、脑源性神经营养因子、人粒细胞集落刺激因子等可通过刺激 PI3K/Akt 信号通路中 p-Akt 的表达而起到对 RGCs 的保护和再生功能<sup>[9-11]</sup>,另外 Nakazawa 等<sup>[12]</sup>在对 PI3K/Akt 通路的视神经保护作用机制研究中发现,视网膜损伤后 1 h 即能发现 Akt 的表达,6 h 后可达高峰。两组 1 周后病理切片均提示 RGCs 减少,而应用 Akt 抑制剂组其 RGCs 数量明显少于对照组。上述研究都证实了 PI3K/Akt 通路的视神经保护作用为 p-Akt 的高表达。

本实验通过观察慢性 EIOP 大鼠视网膜 PI3K/Akt 信号通路中 p-Akt 的表达变化来探讨补精益视片对青光眼视功能保护的作用机理。结果显示,造模后模型组及给药组 p-Akt 表达均有升高,提示 PI3K/Akt 通路有神经细胞自我保护和修复的作用,

其中给药组 p-Akt 水平又明显高于模型组,表明补精益视片能够上调 PI3K/Akt 信号转导通路中 p-Akt 的表达。另外,本实验结果表明补精益视片还有一定的降眼压作用。由以上推测补精益视片可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路中的 Akt,降低眼压而发挥对 RGCs 的保护作用。

补精益视片是根据中医眼科名家陈达夫教授经验制成的成都中医院大学附属医院院内制剂,应用已数十年,价廉物美,服用方便。可作为临床青光眼视神经保护药物推广应用。

### 参考文献

- 1 刘兵,马晓华. 青光眼视神经保护治疗的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(11): 2137-2140.
- 2 Akira S, Neufeld AH. Confirmation of the rat model of chronically elevated intraocular pressure[J]. *Exp Eye Res*, 1999, 69(5): 525-531.
- 3 葛坚, 主编. 眼科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 246.
- 4 廖金正, 主编. 中医眼科学[M]. 中国中医药出版社, 2000: 164-171.
- 5 马鹏飞. 补精益视片调控 MNU 诱导的大鼠感光细胞凋亡信号转导通路的研究[D]. 成都: 成都中医药大学临床医学院, 2012.
- 6 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.
- 7 李翔, 谢钊, 张敏. 补肾活血法治疗高度近视 120 例[J]. 陕西中医, 2009, 30(7): 842-843.
- 8 Nakazawa T, Tamai M, Mori N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(10): 3319-3326.
- 9 兰兰, 王雨生, 王耀春, 张鹏. 磷脂酰肌醇-3 激酶信号转导通路在缺氧诱导的人视网膜色素上皮细胞增生中的作用[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(2): 306-310.
- 10 Tsai RK, Chang CH, Sheu MM, Huang ZL. Anti-apoptotic effects of human granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) on retinal ganglion cells after optic nerve crush are PI3K/AKT-dependent[J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90(5): 537-545.
- 11 Kretz A, Happold CJ, Marticke JK, Isenmann S. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 29(4): 569-579.
- 12 Nakazawa T, Shimura M, Tomita H, Akiyama H, Yoshioka Y, Kudou H et al. Intrinsic activation of PI3K/Akt signaling pathway and its neuroprotective effect against retinal injury[J]. *Curr Eye Res*, 2003, 26(1): 55-63.

### 《眼科新进展》杂志征订启事

《眼科新进展》杂志是由新乡医学院主办的眼科学高级学术刊物,创刊于 1980 年,大 16 开,100 页,国内外公开发行。1999 年加入国家科技部《万方数据系统科技期刊群》和《中国学术期刊(光盘版)》,1997 年被上海医科大学图书馆选定为医学类核心期刊,2000 年被美国《化学文摘》收录,2001 年被俄罗斯《文摘杂志》收录,自 2002 年连续入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),自 2008 年连续入选中国中文核心期刊,并连续被评为河南省二十佳科技期刊。2009 年入选 WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM),并被评为 RCCSE 中国核心学术期刊。国际标准连续出版物号为:ISSN 1003-5141,国内统一刊号:CN 41-1105/R 邮发代号:36-42。

本刊辟有名家讲坛(述评)(Editorial)、实验研究(Experimental study)、应用研究(Applied study)、文献综述(Review article)、海外信息(Overseas information)、消息(News)、读者来信(Letters)等栏目。本刊读者对象主要是眼科学临床、科研和教学工作者。欢迎国内外眼科医学工作者踊跃投稿和订阅。国内每期定价 10.00 元,全年定价 120.00 元。如错过邮局订阅,可直接汇款到我刊编辑部。联系地址:河南省新乡市金穗大道 601 号 新乡医学院期刊社《眼科新进展》杂志编辑部,邮编:453003。联系电话:0373-3029404; E-mail: ykxjz@xxmu.edu.cn; ykxjz@163.com; 网址: <http://www.ykxjz.com>