

补肾活血中药对 SD 大鼠慢性高眼压模型初级视皮质磷酸化 FoxO1 和 IKK2 表达的影响

袁铭悦¹ 李翔² 刘红佶³ 刘欢³ 李祥玉³

【摘要】 目的 观察补肾活血中药对 SD 大鼠慢性高眼压(EIOP)模型初级视皮质(PVC)的影响,并对其作用机理进行初步探讨。方法 采用烙闭 3 支上巩膜静脉法,制作大鼠慢性 EIOP 模型,随机分为 3 组:对照组、模型组、给药组。连续灌胃 8 周,并于 8 周末处死大鼠,观察其对大鼠眼压(IOP),PVC 尼氏小体含量、PI3K/Akt 通路上 p-FoxO1 及 IKK2 表达的影响。结果 ①造模后大鼠 IOP 明显升高,造模后 8 周(实验结束)IOP 仍较高,补精益视片有轻度降 IOP 作用。②免疫组化检测 3 组大鼠 PVC 中 p-FoxO1 和 IKK2 表达:模型组>给药组>对照组。结论 补肾活血中药可以保护 SD 大鼠慢性 EIOP 模型视功能:降低眼压,下调 p-FoxO1 和 IKK2 的表达。

【关键词】 补肾活血; 慢性高眼压模型; 视功能保护; 初级视皮质; 磷酸化 FoxO1; IKK2

DOI:10.3969/j.issn.1674-9006.2020.02.001

中图分类号:R77

The Effect of Bushenhuoxue on primary visual cortex's p-FoxO1 and IKK2 in the PI3K/Akt pathway in rats model of chronic elevated intraocular pressure Yuan Mingyue¹, Li Xiang², Liu Hongji³, Liu Huan³, Li Xiangyu³

(1. Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ankang, Shanxi, 725000; 2. Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan, 610072; 3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan, 610075)

【Abstract】 Objective To observe the effect of traditional Chinese medicine(TCM) of bushenhuoxue on primary visual cortex(PVD) changes in SD rat model of chronic elevated intraocular pressure (EIOP), and explore the mechanism of it initially. **Methods** By unilaterally cauterizing 3 episcleral vessels establish the rat model of chronic EIOP 30 SD rats were divided into 3 groups randomly: control group, model group and treatment group. After given bushenhuoxue of TCM, or normal saline for 8 weeks, the rats were put to death. To observe the effect of bushenhuoxue of TCM on the EIOP SD rats model's intraocular pressure (IOP), niess body and PI3K/Akt signal pathway's p-FoxO1 and IKK2 in primary visual cortex. **Results** ① The establishment of chronic EIOP model in SD rats by unilaterally cauterizing 3 episcleral vessels can increase the IOP of SD rats, and it can last at least 8 weeks (at the end of the experiment), bushenhuoxue of TCM had mild the effect to reduce IOP. ② The p-FoxO1 and IKK2 on PVC which were detected by immunohistochemical method in 3 groups: The p-FoxO1 and IKK2 on PVC in the model group were highest, and the drug delivery group higher than the control group. **Conclusion** bushenhuoxue of TCM can protect the visual function from elevating IOP, by reducing the expression of p-FoxO1 and IKK2 in PVC.

【Keywords】 Bushenhuoxue; A rat of chronic elevated intraocular pressure; Protection the visual function; Primary visual cortex; p-FoxO1; IKK2

基金项目:1. 国家自然科学基金(81373695/H2713);2. 成都中医药大学科技发展基金(030018024);3. 成都中医药大学杏林学者计划(NO. YXRC2019009)

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

通讯作者:李翔, E-mail:jeannelxiang@126.com

青光眼(glaucoma)是以特异性视神经(optic nerve, ON)损伤和视功能损害为特征的一类眼病,是全球仅次于白内障、可导致视力丧失的主要原因^[1]。据统计,2013 年,全世界 40~80 岁人群中,青光眼患病率为 3.54%,有 6 426 万,预计到 2020 年和 2040 年分别将达 7 602 万和 11 182 万,约有 60% 青光眼患者

分布在亚洲^[2]。青光眼视功能损害的病因、病机复杂,迄今尚未明确。近年来,许多学者提出青光眼是一种中枢神经退行性病变^[3],病变涉及了包括视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)、视神经、视交叉、视束、外侧膝状体(lateral geniculate nucleus, LGN)、视放射、视皮质(visual cortex, VC)整个视路。因此,青光眼视功能保护研究应深入到视神经颅内段更广阔的范畴。

Qing G 等^[4]利用核磁共振检查原发性开角型青光眼患者发现中心视野未受损时相对应的 VC 区的神经元已出现了对视觉刺激的反应下降,表明青光眼患者视皮质神经元损伤可能早于目前常用视野计能检测到的视野改变,由此推断青光眼患者视皮质的改变可能不仅是 RGCs 及视神经的损伤的继发改变,还有可能是其主动参与了青光眼的发病。中医药对此的相关报道并不多。本实验采用烙闭巩膜静脉的方法诱导产生眼压维持稳定、持续时间较长的慢性高眼压(elevated intraocular pressure, EIOP)模型,选用杞菊地黄丸合复方丹参片作为干预药物,通过 SD 大鼠眼压(intraocular pressure, EIOP),初级视皮质(primary visual cortex, PVC)中尼氏小体、磷酸化 FoxO1、IKK2 的含量等客观指标观察补肾活血中药对大鼠慢性 EIOP 模型 PVC 损害的干预,探讨 SD 大鼠慢性 EIOP 模型视功能损害的中枢机制和补肾活血中药的干预及作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,8~12 周龄,体重 160~200g。饲养条件:空气流通,相对湿度 55%~75%,室温 20~25℃,12 小时光照维持,昼夜循环,自由摄食饮水。纳入标准:①外眼无异常;②双眼瞳孔直径对光反射无异常;③无歪颈。

1.1.2 试剂 FoxO1(phospho-Ser319)抗体、IKK2 抗体均由 BeacomBio 提供,批号分别为: BIO95906、BIO87319。

1.2 分组与给药方法

动物购回后,适应性喂养 3 天,进行 IOP 测量,正常 IOP 区间估计,取平均 IOP 在 9~18mmHg 者,以 SPSS 20.0 统计软件产生随机数字,分为 3 组,对照组,模型组和给药组进行单眼(右眼)造模。

对照组和模型组每天予 3ml 生理盐水灌胃;给药组以成人剂量的 20 倍换算,每天灌胃予 0.96g/kg 体重的复方丹参片、3.0g 原生药/kg 体重的杞菊地黄丸

的混悬液 3ml 灌胃(混悬液制作:将复方丹参片、杞菊地黄丸磨成粉状,加入生理盐水)。每周称体重 1 次,根据大鼠体重变化调整给药量。每天同一时间段给药(16:00—17:00)。造模后 1 周开始给药,连续给药 8 周。

1.3 取材方法

大鼠灌胃 8 周后,大鼠灌注固定法(参陈浩宇等^[5],结合本实验加以改良):3%戊巴比妥钠溶液腹腔麻醉大鼠,大鼠仰卧暴露腹部,固定四肢,剑突下剪开胸腔,暴露心脏,将套有 16 号灌胃针针头的注射器经左心室插入升主动脉,同时剪开右心耳,快速推注含肝素钠注射液(20u/ml)生理盐水 50 ml 冲洗,以无血液流出为度,换 4%多聚甲醛溶液 50~80 ml 灌注固定,先快后慢,约 10~15 min 推完固定液,灌注结束后,开颅取出脑组织,固定液固定 72h。

1.4 眼压测量

TNON-PEN XL 眼压计每天同一时间段(14:00—16:00)测量 IOP。术前 3 天连续测量大鼠 IOP,取平均值为正常 IOP;术后即刻、术后 1w、术后 2w、术后 4w、术后 6w、术后 8w,各测 1 次各组大鼠右眼 IOP。

1.5 免疫组化检测 PVC 中磷酸化 FoxO1、IKK2

脑组织固定 72h 后,参照《大鼠脑立体定位图谱(第三版)》^[6]切取视皮质区脑组织,标本逐级酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做 4μm 连续切片,烘干备用。分别用 BeacomBio 的 FoxO1(phospho-Ser319)及 IKK2 抗体染色,检测 PVC 磷酸化 FoxO1、IKK2 含量。

1.6 统计方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合正态分布者,采用自身前后比较采用配对 *t* 检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间符合正态分布且方差齐者采用单因素方差分析。不符合正态分布的计量资料采用非参数检验。 $\alpha=0.05$,即 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P>0.05$ 表示差异无统计学意义。

2 结果

2.1 补肾活血中药对 SD 大鼠慢性 EIOP 模型 IOP 的影响见表 1

表 1 各组大鼠组间及造模、用药前后 IOP 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	造模前	造模后即刻	给药后 8 周
对照组	8	14.10±1.80	15.20±1.47	15.00±1.30
模型组	7	14.30±1.88	25.89±1.91 [☆]	25.50±1.40 ^{☆△}
给药组	7	14.50±1.52	26.70±2.01 [☆]	24.00±2.01 ^{☆△}

注:☆与对照组造模后即刻比较, $P<0.05$;★与同一组别造模前比较, $P<0.05$;△与同一组别造模后即刻比较;模型组 $P>0.05$,给药组 $P<0.05$ 。

2.2 补肾活血中药对 SD 大鼠慢性 EIOP 模型 PVC 中磷酸化 FoxO1 表达的影响见表 2(图 1)。

表 2 补肾活血中药对 SD 大鼠 EIOP 模型 PVC 中磷酸化 FoxO1 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	总面积(μm^2)	积分光密度	平均光密度
对照组	0.0486 $\pm$ 0.0119	29403.664 $\pm$ 9808.723	200.279 $\pm$ 1.720
模型组	0.0920 $\pm$ 0.0142 $\star$	103665.448 $\pm$ 11059.419 $\star$	211.706 $\pm$ 2.308 $\star$
给药组	0.0729 $\pm$ 0.0085 $\star\triangle$	68525.140 $\pm$ 13022.671 $\star\triangle$	207.743 $\pm$ 3.227 $\star\triangle$

注: $\star$ 与对照组比较, $\star$ 与对照组比较, $\triangle$ 与模型组比较,均为 $P < 0.05$ 。

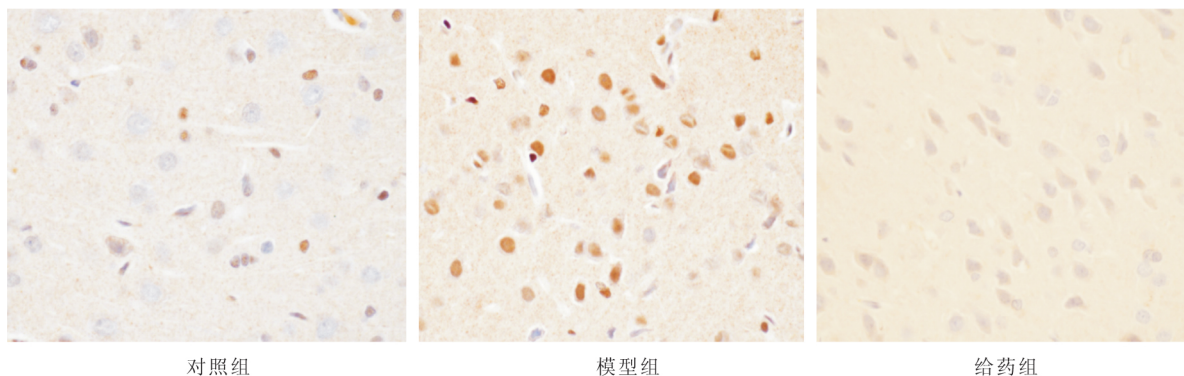


图 1 各组大鼠 PVC 中磷酸化 FoxO1 含量(免疫组化 $\times 400$) Fig. 1 p-FoxO1 in PVC of rats of all groups(Immunohistochemical method $\times 400$)

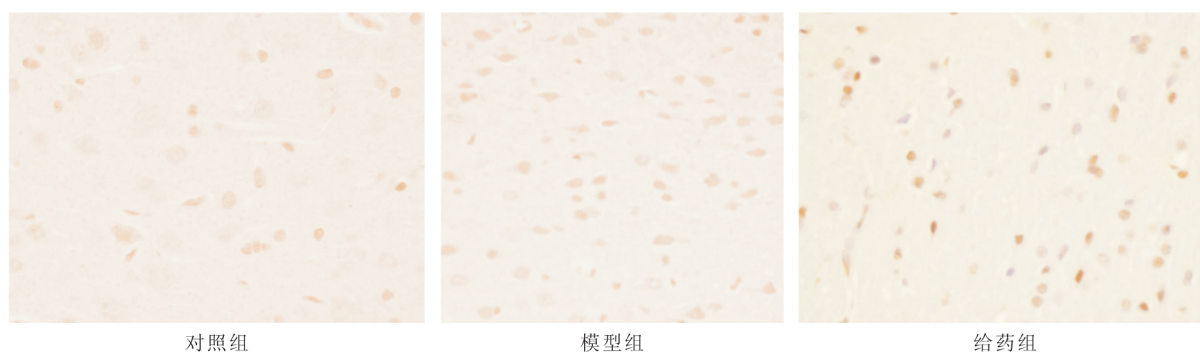


图 2 各组大鼠 PVC 中 IKK2 含量(免疫组化 $\times 400$)

Fig. 2 IKK2 in PVC of rats of all groups(Immunohistochemical method $\times 400$)

3 讨论

青光眼视功能损害的病因、病机复杂,迄今尚未明确。目前认为,青光眼视功能损害可由多种因素共同作用引起的。目前认为,青光眼视功能损害可由多种因素引起,近年来,许多学者提出青光眼是一种中枢神经退行性病变^[3],青光眼患者视皮质的改变可能不仅是 RGCs 及视神经的损伤的继发改变,还有可能是其主动参与了青光眼的发病。

青光眼类似中医的“五风内障”及“青盲”,多由风、火、痰、郁、虚等导致气血失和,气滞血瘀,玄府闭塞,神水瘀积为病,病久肝肾两亏,神光衰微甚至泯灭、不睹三光而成“青盲”,所以肝肾虚损、脉络瘀滞是青光眼视神经病理改变的主要病机,滋养肝肾、活血化瘀为防治

2.3 补肾活血中药对 SD 大鼠慢性 EIOP 模型 PVC 中磷酸化 IKK2 表达的影响见表 3(图 2)。

表 3 补肾活血中药对 SD 大鼠 EIOP 模型 PVC 中磷酸化 IKK2 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	总面积(μm^2)	积分光密度	平均光密度
对照组	0.0321 $\pm$ 0.0085	4633.886 $\pm$ 1353.392	186.747 $\pm$ 10.488
模型组	0.1091 $\pm$ 0.0236 $\star$	19593.710 $\pm$ 3052.406 $\star$	211.965 $\pm$ 5.743 $\star$
给药组	0.0536 $\pm$ 0.0135 $\star\triangle$	13800.057 $\pm$ 3879.046 $\star\triangle$	197.737 $\pm$ 4.467 $\star\triangle$

注: $\star$ 与对照组比较, $\star$ 与对照组比较, $\triangle$ 与模型组比较,均为 $P < 0.05$ 。

青光眼视神经损害的基本方法^[7]。本实验选用杞菊地黄丸和复方丹参片作为研究药物,滋养肝肾、活血化瘀,杞菊地黄丸为经典古方,为滋补肝肾明目的代表方剂,复方丹参片活血化瘀,两者均为《中国药典》载入药品,非处方用药,经济实用,服用方便。我们前期研究也证实具有补肾活血中药(杞菊地黄丸和复方丹参片合用)对 SD 大鼠慢性 EIOP 模型视网膜、视神经、视中枢损伤及眼压控制后的青光眼患者视功能均有一定的保护作用^[8-18]。

本实验病理组织学观察了 PVC PI3K/Akt 通路上磷酸化 FoxO1 和 IKK2 的表达。

近年来,关于 PI3K/Akt 信号通路(磷酸肌醇-3-激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶, phosphatidylinositol 3'-OH kinase/ protein kinase B, PI3K /Akt)调控细胞凋亡研

究较多。Akt 在 PI3K 调控下激活后,通过多种途径对细胞凋亡进行调控。包括①抑制 NF- κ B、FoxOs 等转录因子的活性,调控凋亡;②磷酸化 Bad、抑制 caspase-9 的磷酸化过程、抑制 GSK-3 活性,抑制凋亡;③抑制线粒体相关功能,抑制凋亡等^[19]。FoxO1 是 FOX 亚家族 FoxO 家族的一员,磷酸化后,会由细胞核转移到细胞质中,与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白结合,抑制细胞正常的周期、损伤修复及代谢活动,从而导致细胞周期停滞和凋亡^[20-22]。IKK2 为 IKK 的催化亚基^[23],是细胞因子介导的核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 活化所必须的亚基结构^[24]。NF- κ B 在生物体内各种类型的细胞中均存在,对细胞的凋亡具有双向调节作用。有研究证明 IKK/NF- κ B 信号通路在中枢神经系统疾病中起着重要作用,在神经细胞的凋亡过程中发挥着重要作用^[25]。

本实验结果显示:采用的烙闭巩膜静脉的方法建立的 SD 大鼠慢性 EIOP 模型可以使大鼠 IOP 升高,且可维持至少 8 周(实验结束时)。补精益视片可轻度降低 SD 大鼠慢性 EIOP 模型的眼压;阻断 SD 大鼠慢性 EIOP 模型初级视皮质中的尼氏小体的分解过程,改善初级视皮质的神经元的功能。降低 SD 大鼠慢性 EIOP 模型初级视皮质中 PI3K/Akt 通路中 p-FoxO1 及 IKK2 的表达,可抑制 SD 慢性 EIOP 模型初级视皮质的神经细胞凋亡,对大鼠慢性 EIOP 模型的视功能具有作用。另外 IKK2 为 NF- κ B 活化所必须的亚基结构,因此推测补精益视片可能可以降低 SD 大鼠慢性 EIOP 模型初级视皮质中 NF- κ B 的表达。

综上,补精益视片可有效保护 SD 大鼠慢性 EIOP 模型的视功能,其作用表现在轻度降低 IOP,提高 PVC 尼氏小体的含量,降低 PVC 中 p-FoxO1 及 IKK2 的表达。

4 参考文献

- [1] 葛坚. 眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2015:261.
- [2] Tham YC, Li X, Wong TY, *et al.* Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(12):2081-2090.
- [3] Schwartz M. Physiological approaches to neuroprotection boosting of protective autoimmunity [J]. *Surv Ophthalmol*, 2001, 45(13):256-260.
- [4] Qing G, Zhang S, Wang B, *et al.* Functional MRI signal changes in primary visual cortex corresponding to the central normal visual field of patients with primary open-angle glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(9):4627-4634.
- [5] 陈浩宇,高亚兵,彭瑞云,等. 一种改进的大鼠脑组织灌注固定方法[J]. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26(3):208-209, 212.
- [6] 诸葛启钊(主译). 大鼠脑立体定位图谱(第三版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.
- [7] 李翔,文晓霞,王万杰,等. 杞菊地黄丸与复方丹参片联合甲钴胺片治疗眼压控制后青光眼及对视力视野的影响[J]. *陕西中医*, 2010, 31(4):455-457.
- [8] 李翔,毛欣,张富文. 补肾活血中药对大鼠慢性高血压模型多焦视网膜电图的影响[J]. *四川中医*, 2009, (8):18-21.
- [9] 李翔,毛欣,张富文. 补肾活血中药对大鼠慢性高血压模型视网膜病理改变的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 32(6):390-393.
- [10] 毛欣,李翔. 补肾活血中药对慢性高血压模型大鼠视功能损害的干预作用[J]. *国际眼科杂志*, 2010, (2):238-240.
- [11] 李翔,曹水清,毛欣,等. 补肾活血中药对大鼠慢性高血压模型视网膜神经节细胞凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. *四川中医*, 2010, 28(2):22-24.
- [12] 李翔,谢钊,郭红建,等. 补肾活血中药对大鼠慢性高血压模型外侧膝状体病理改变的影响[J]. *眼科新进展*, 2012, 32(1):20-23.
- [13] 李翔,谢钊,郭红建,等. 补肾活血中药对大鼠慢性高血压模型外侧膝状体脑源性神经营养因子改变的影响[J]. *眼科新进展*, 2012, 32(10):918-921.
- [14] LI Xiang, GUO Hong-jian, WEN Xiao-xia, *et al.* Influence of BuShenHuoXue on primary visual cortex's Nissl bodies damage in rat model of chronic elevated intraocular pressure [J]. *Int Eye Sci*, 2012, 12(12):2256-2260.
- [15] LI Xiang, GUO Hong-jian, WEN Xiao-xia, *et al.* Influence of bushenhuoxue on primary visual cortex' BDNF damage in rat model of chronic elevated intraocular pressure [J]. *Int Eye Sci*, 2013, 13(4):647-651.
- [16] 李翔,马世勇,李娟,王毅. 补肾活血中医对大鼠慢性高血压模型视神经病理改变的影响[J]. *眼科新进展*, 2013, 33(2):122-125.
- [17] 刘红结,李翔,李祥玉,等. 补肾活血中药对 SD 大鼠慢性高血压模型初级视皮质 PI3K/Akt 通路凋亡相关因子 BAX 及 BCL-2 的影响[J]. *中医眼耳鼻喉杂志*, 2017, 7(4):197-202.
- [18] 张静,李翔,汪伟,等. 补肾活血中药对大鼠慢性高血压模型视网膜 PI3K/Akt 通路 Bcl-2 及 Bad 的影响[J]. *中医眼耳鼻喉杂志*, 2017, 7(4):206-211.
- [19] 潘蓉蓉,金永喜,朱文宗. PI3K/Akt 信号通路介导的细胞凋亡机制研究进展[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2013, 23(1):70-72.
- [20] 李晞璠,陈吉. 叉头框(FOX)基因家族的概述及进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(52):72-73.
- [21] Hosaka T, Biggs WH3rd, Tieu D, *et al.* Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9):2975-2980.
- [22] Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues [J]. *Biochem J*, 2000, 349(2):629-634.
- [23] 张劲松,王兴宇,单佑安,张宗梁. 转录因子 NF- κ B 的研究进展[J]. *科学通报*, 2002, 47(5):323-329.
- [24] Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K, *et al.* Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK-beta-deficient mice [J]. *Immunity*, 1999, 10(4):421-429.
- [25] 张茵燕,殷小平. IKK/NF- κ B 信号通路与中枢神经系统疾病[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2016, 33(12):1143-1145.