

补肾活血中药对大鼠慢性高眼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

李翔 曹水清 毛欣 黄江丽

成都中医药大学附属医院眼科 (四川 成都 610072)

摘要: 目的: 观察补肾活血中药对 SD 大鼠慢性高眼压 (elevated intraocular pressure EOP) 模型视网膜神经节细胞凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 表达的影响。方法: 采用烙闭上巩膜静脉法, 制作大鼠慢性 EOP 模型, 随机分为模型对照组, 补肾活血高剂量组、中剂量组、低剂量组, 空白对照组。连续灌胃 8 周, 并于 8 周末处死大鼠, 观察其对 EOP 大鼠视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells RGCs) 凋亡基因的影响。结果: 补肾活血中药可上调大鼠 EOP 视网膜神经节细胞抗凋亡基因 Bcl-2, 抑制凋亡促进基因 Bax。结论: 补肾活血中药可调控大鼠 EOP 视网膜神经节细胞凋亡基因的表达。

关键词: 补肾活血中药 视网膜神经节细胞 凋亡 Bcl-2 Bax

中图分类号: R 259 文献标识码: A 文章编号: 1000-3649 (2010) 02-0022-03

The Effect of Traditional Chinese Medicine (TCM) of BuShenHuoXue Principle on Retinal Ganglion Cells (RGCs) Apoptosis-related Gene Bcl-2, Bax Expression in Rat Model of Elevated Intraocular Pressure (EOP) // Li Xiang Cao Shuiqing Mao Xin Huang Jiangli Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (Chengdu Sichuan 610072, China)

Abstract Objectives To observe the effect of Traditional Chinese Medicine (TCM) of BuShenHuoXue Principle on retinal ganglion cells (RGCs) apoptosis-related gene Bcl-2, Bax expression and in rat model of elevated intraocular pressure (EOP). Methods By unilaterally cauterizing 3 episcleral vessels, the rat model of EOP was gotten. Rats were divided into 5 groups randomly: model control group, treatment groups with high, middle, low dosage of BuShenHuoXue formula of TCM, and normal control group. After given drugs or normal saline for 8 weeks, the rats were put to death and eyeballs were taken out. To observe the effect of intraocular pressure (IOP), retinal ganglion cells (RGCs) of apoptosis gene. Results BuShenHuoXue formula of TCM can increase Bcl-2 gene, degrade Bax gene expression, and add RGCs Bcl-2/Bax. Conclusions BuShenHuoXue formula of TCM can regulate the expression of RGCs apoptosis gene.

Key words BushenHuoXue retinal ganglion cells (RGCs) apoptosis Bcl-2 Bax

青光眼 (glaucoma) 是一类以特异性视神经损害和视野缺损为共同特征的眼病^[1]。一直以来因其不可逆致盲性而备受关注。青光眼视神经损害的确切机制目前尚不十分清楚, 但对青光眼的机理研究表明可能有多种机制参与青光眼性视神经损伤, 而无论何种机制, 其最终的结局均是视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells RGCs) 的凋亡^[2]。因此调控 RGCs 凋亡对青光眼视神经保护具有重要意义。根据青光眼的血流学说及中医眼科学的基础理论, 本

实验观察了补肾活血中药对持续性高眼压大鼠 RGCs 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 雌雄各半, 8~12 周龄, 体重约 160~200g, 饲养室温 20~25℃, 空气流通, 相对湿度 55%~75%, 12 小时光照维持, 昼夜循环, 自由摄食饮水。纳入标准: ①无外眼疾病; ②双眼瞳孔对光反射正常; ③无歪颈。

等^[5]报道丹参注射液各剂组对 Lewis 肺癌小鼠瘤重、体积均有抑制作用, 在实验范围内无明显的剂量依赖关系。启膈方抑制小鼠移植瘤 (FC) 的生长, 阻断转移过程, 减少了肺转移的发生。关于启膈方抑制前胃癌小鼠肺转移的机制, 值得深入探讨。

参考文献

- [1] 杨光霖, 董律明, 张筠庭, 等. 胃癌尸检材料分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 1983, (5): 362~365
- [2] 高进, 章静波主编. 癌的侵袭与转移基础与临床 [M]. 科学出版社, 2003: 98
- [3] 单贤, 陈峻青, 王舒宝. 早期胃癌术后复发转移的探讨

[J]. 中华医学会杂志, 1996 (76): 750~752

[4] 李宝贵, 高进, 陈锡萍. 小鼠可移植性瘤株胃癌 (FC) 连续传代自发转移的研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1986 (12): 186

[5] 徐磊, 吕宾, 俞林峰. 温郁金提取液对化学致癌剂致大鼠胃癌的预防作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2007 (24): 2589~2592

[6] 梁华, 姜玉华, 褚磊. 丹参注射液对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤生长转移及 VEGF 表达的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2008 (2): 177~181

(收稿日期 2009-10-24)

1.2 分组与给药方法 动物购回后,适应性喂养 3 天,连续测量 3 天 DP,进行正常 DP 区间估计,取平均 DP 在 9~18mmHg 者,以 SPSS 统计软件产生随机数字,随机分为五组,空白组不做处理,其余四组采用烙闭巩膜静脉法^[3]进行单眼(右眼)造模,造模后成模动物随机分为模型组,补肾活血高、中、低剂量组。因为灌胃等原因动物死亡 8 只。补肾活血高、中、低剂量组分别予相当于 20 倍、10 倍、5 倍成人剂量的复方丹参片(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂生产,批号 7122426,成人剂量每次 3 片相当于原生药 3g 每日 3 次)和杞菊地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂生产,批号 7072153,成人剂量每次 8 丸相当于原生药 3g 每日 3 次)的混悬液,模型组、空白组分别予生理盐水,每天同一时间灌胃 1 次,连续灌胃 8 周。每 2 周称体重 1 次,调整给药量。

1.3 视网膜神经节细胞凋亡相关基因的观察 于造模后第 8 周过量麻醉处死大鼠,12 点钟位缝线标记,立即摘除眼球(包括球后视神经 2mm),角膜穿一小切口,浸泡于 1% 甲醛组织固定液中,24 小时后沿标记缝线——视神经连线对剖眼球,去除眼前节和玻璃体,余下部分逐节脱水、透明、石蜡包埋,于视乳头颞侧旁开 1mm,做 4μm 切片,送成都中医

药大学病理科检测,采用免疫组织化学染色 (labeled dextran polymer method LDP) 的方法,对石蜡切片进行免疫组织化学染色。观察指标:神经节细胞核和核周出现棕黄色反应物即为阳性表达,在 100 倍光镜下全面观察切片后,寻找 Bcl-2、Bax 阳性物质最丰富区域(即“热点”区,染色颜色最深或染色面积最多的区域),然后选择 5 个 400 倍视野的阳性细胞热点区,采用 Mias-2000 计算机图像分析系统测量各个指标阳性物质积分光密度(表示被测个体截面或投影轮廓或体积内光密度的积分值,亦是吸光物质的总含量)。

1.4 统计方法 采用 SPSS13.0 for windows 统计软件分析。自身前后对照比较用配对 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析,各项指标均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

通过对 EDP 大鼠 RGCs 凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 及 Bcl-2/Bax 比值的检测发现补肾活血中药可上调大鼠 EOP 视网膜神经节细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 抑制凋亡促进基因 Bax,可使慢性高眼压大鼠 RGCs Bcl-2/Bax 比值升高,具有抑制 RGCs 凋亡的作用,详见表 1 及图 1~4

表 1 各组大鼠 RGCs 凋亡基因 Bcl-2、Bax 积分光密度 (IOD) 值及 Bcl-2/Bax 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	Bcl-2 IOD 值	Bax IOD 值	Bcl-2/Bax 比值
模型组	11	0.4640 ± 0.0775 ^{◆▲▼★}	0.672 ± 0.0545 ^{◆▲▼★}	0.69 ± 0.1535 ^{◆▲▼★}
高剂量组	9	0.6864 ± 0.1519 ^{▲◆◆}	0.529 ± 0.0683 ^{◆◆◆}	1.30 ± 0.2945 ^{◆◆◆}
中剂量组	10	0.6524 ± 0.0866 ^{◆◆}	0.569 ± 0.0806 ^{◆◆}	1.16 ± 0.2255 ^{◆◆}
低剂量组	11	0.5607 ± 0.0772 ^{◆◆}	0.601 ± 0.0529 ^{◆◆}	0.93 ± 0.1509 ^{◆◆}
空白对照组	11	0.5865 ± 0.0878 ^{◆◆}	0.440 ± 0.0914 ^{◆◆}	1.38 ± 0.3301 ^{◆◆}

注:与空白组比较,◆*P* < 0.05 与模型组比较,●*P* < 0.05 与低剂量组比较,▲*P* < 0.05 与中剂量组比较,▼*P* < 0.05 与高剂量组比较,★*P* < 0.05

由上表可见:① Bcl-2 IOD 值:补肾活血中药各剂量组对 Bcl-2 有表达增加的作用 (*P* < 0.05)。② Bax IOD 值:补肾活血中药各剂量组对 Bax 有表达减低的作用 (*P* < 0.05),尤以高、中剂量组明显。③ Bcl-2/Bax 比值比较:补肾活血中药各剂量组对 Bcl-

-2/Bax 比值的影响有统计学意义 (*P* < 0.05),表明补肾活血中药可使慢性高眼压大鼠 RGCs Bcl-2/Bax 比值升高,具有抑制 RGCs 凋亡的作用,尤以高、中剂量组明显。

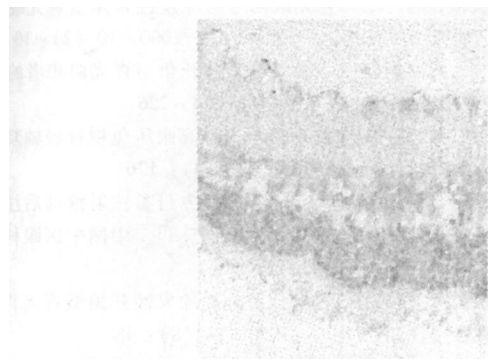


图 1 模型组 RGCs Bcl-2 阳性染色 (400×)

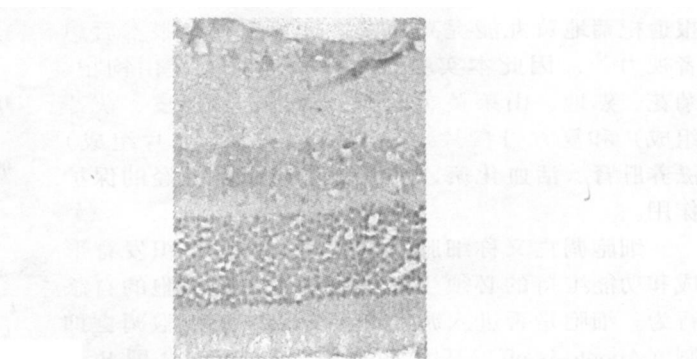


图 2 高剂量组 RGCs Bcl-2 阳性染色 (400×)

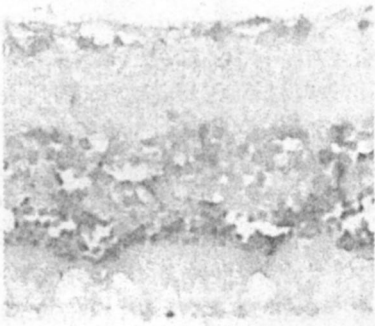


图3 模型组 RGCs Bax 阳性染色 (400×)

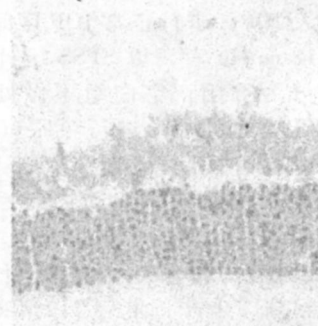


图4 高剂量组 RGCs Bax 阳性染色 (400×)

5 讨论

青光眼属祖国医学“五风内障”范畴,其造成的视神经损害类似于“青盲”,视神经相当于“目系”,肝脉以本经直接连“目系”,目系“上属于脑”,脑为髓海,直接受肾精之充养,目系得肝肾精血之濡养,方能维持正常的生理功能,故本病与肝肾关系密切。而“五风内障”多由于气血失和、经脉不利、气滞血瘀,目中玄府闭塞、神水淤积而致,病久则肝肾两亏,目系失养,神光渐微甚至泯灭、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、活血化瘀是防治青光眼视神经损害的基本方法。

有报道糖尿病大鼠应用补肾活血制剂可以通过调节 RGCs 凋亡调控基因,抑制 RGCs 凋亡和促使 RGCs 神经营养因子增多,使 RGCs 存活能力提高,减少 RGCs 死亡^[4]。另外,前期研究显示:补肾活血中药可以抑制 EDP 大鼠视网膜神经纤维层 (retinal nerve fiber layer; RNFL) 和视网膜神经节细胞层 (retinal ganglion cells layer; RGCL) 变薄,改善 RGCs 超微结构,从而防止 RGCs 和 RNFL 损害^[5]。近年研究显示,活血化瘀中药具有改善微循环,降低血液粘滞度,提高机体抗氧化能力等多方面的药理作用,在改善青光眼视神经轴浆流、视盘微循环状况等方面有明显优势^[6-9]。复方丹参注射液可改善轴浆流、增强视网膜血管和视神经的耐缺氧能力、对视网膜缺血再灌注损伤有一定的保护作用^[10,11]。王幼生等^[12]在常规降眼压的基础上给予丹参等治疗青光眼患者,结果显示患者视力有明显提高,毕氏报道杞菊地黄丸能提高原发性开角型青光眼术后患者视力^[13]。因此本实验选用杞菊地黄丸 (由枸杞、菊花、熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓组成) 和复方丹参片 (由丹参、三七、冰片组成) 滋养肝肾、活血化瘀,观察对青光眼视神经的保护作用。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是组织发育形成和功能维持的必须生理现象,是一种细胞的自杀行为。细胞是否进入凋亡通路,取决于细胞凋亡抑制 (Apoptosis off) 基因之间的比例。Bcl-2 即 B 淋巴细胞瘤/白血病-2 基因 (B-cell lymphoma/leukemia 2 基因) 的简称,可保护细胞,抑制凋亡, Bax

即 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 基因 (bcl-2 associated X protein 基因), Bax 的过度表达可以诱发细胞凋亡,并可拮抗 Bcl-2 的抑制细胞凋亡作用。Bcl-2 作为细胞生存基因的代表, Bax 作为细胞凋亡基因的代表,两者之间表达水平的平衡结果,决定了细胞是生存还是凋亡。

本实验中,免疫组化检测结果显示,补肾活血中药可上调慢性高眼压大鼠视网膜神经节细胞凋亡抑制基因 Bcl-2,抑制凋亡促进基因 Bax,使 RGCs Bcl-2/Bax 比值升高,具有抑制 RGCs 凋亡的作用。其机理可能与增加眼血流量,改善轴浆流,增强视网膜血管、神经的耐缺氧能力,激活视细胞,复苏视纤维有关。其确切的作用机理,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 杨新光主编. 疑难青光眼的诊断与治疗 [M]. 人民军医出版社, 2005: 1
- [2] Nickells RW. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe [J]. J Glaucoma, 1996, 5: 345
- [3] Akira S, Arthur H. Neufeld. Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure [J]. Exp Eye Res, 1999, 69: 525~531
- [4] 韩冰. 中医药治疗糖尿病视网膜病变的临床与实验研究近况 [J]. 中国中医眼科杂志, 2003, 13 (1): 59~61
- [5] 毛欣. 补肾活血对大鼠慢性高眼压模型视功能损害的干预及作用机制研究. 成都中医药大学 2008 年硕士论文
- [6] 张宗端, 段俊国. 优视胶囊对急性高眼压家兔眼压及神经节细胞的影响 [J]. 视光学杂志, 2001, 3 (2): 99
- [7] 韦企平, 张守康. 灯盏花注射液为主治疗眼底病临床观察 [J]. 中国中医眼科杂志, 1999, 9 (1): 9
- [8] 贺义恒, 唐由之. 青光眼四号对原发性开角型青光眼视功能影响的临床研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 2000, 10 (2): 10
- [9] 刘杏, 周文炳. 川芎嗪对原发性开角型青光眼患者的治疗作用 [J]. 眼科新进展, 1999, 19 (4): 224~226
- [10] 祝枚东. 复方丹参注射液对慢性高眼压兔视神经轴浆流的影响研究 [J]. 中华眼科杂志, 1991, 27 (3): 176
- [11] 李岱, 陈长征, 易明望, 等. 复方丹参注射液球后注射对大鼠视网膜缺血再灌注损伤防护的实验研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 2000, 10 (4): 191
- [12] 毕留彬, 毕泗松. 杞菊地黄丸对原发性开角型青光眼术后增视效果的观察 [J]. 四川中医, 1996, 14 (8): 48
- [13] 王幼生. 活血化瘀中药对原发性青光眼患者视力的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2001, 18 (4): 304

(收稿日期 2009-10-24)