

引文格式:汪伟,李翔,刘红信,牟琳,张丹.补肾活血中药血清对加压纯化培养视网膜神经节细胞PI3K/AKT信号转导通路的影响[J].眼科新进展,2017,37(9):805-809. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0204

【实验研究】

补肾活血中药血清对加压纯化培养视网膜神经节细胞PI3K/AKT信号转导通路的影响[△]

汪伟 李翔 刘红信 牟琳 张丹

作者简介:汪伟,男,1982年10月出生,重庆人,博士,副主任医师。联系电话:0830-3161239;E-mail:wangjiawei13@163.com;ORCID:0000-0002-8139-0455

About WANG Wei: Male, born in October, 1982. Medical doctor, associate chief physician. Tel: +86-830-3161239; E-mail: wangjiawei13@163.com; ORCID: 0000-0002-8139-0455

收稿日期:2017-04-25

修回日期:2017-07-07

本文编辑:方红玲

[△]基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81373695)

作者单位:646000 四川省泸州市西南医科大学附属中医医院(汪伟,牟琳,张丹);610072 四川省成都市成都中医药大学附属医院(汪伟,李翔,刘红信)

通讯作者:李翔, E-mail: jeannelxiang@126.com; ORCID: 0000-0001-5656-8840

Received date: Apr 25 2017

Accepted date: Jul 7 2017

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81373695)

From the *Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Southwest Medical University* (WANG Wei, MOU Lin, ZHANG Dan), Luzhou 646000, Sichuan Province, China; *Hospital Affiliated to Chengdu University of TCM* (WANG Wei, LI Xiang, LIU Hong-Ji), Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Responsible author: LI Xiang, E-mail: jeannelxiang@126.com; ORCID: 0000-0001-5656-8840

Effects of Chinese medicine bushenhuoxue on PI3K/Akt signal transduction pathway of pressurized and cultured retinal ganglion cells *in vitro*

WANG Wei, LI Xiang, LIU Hong-Ji, MOU Lin, ZHANG Dan

【Key words】 retinal ganglion cells; traditional Chinese medicine/bushenhuoxue; PI3K; Akt; pressurized and purified culture; signal transduction pathway

【Abstract】 Objective To investigate the influence of bushenhuoxue drug-containing serum on PI3K and Akt signaling pathway in purified retinal ganglion cell (RGCs) *in vitro* of Sprague-Dawley (SD) rats, and to explore the protective mechanisms of bushenhuoxue recipe on RGCs. **Methods** At first, bushenhuoxue drug-containing serum was prepared, and the RGCs of SD rats were purified; after the apoptotic model of pressurized and purified RGCs was established successfully *in vitro* using open pressure control system, RGCs were dealt with 50 g · L⁻¹, 100 g · L⁻¹, 200 g · L⁻¹ concentration gradient of bushenhuoxue drug-containing serum. Then the subjected cells were divided into normal culture group (N group), control group (C group), 50 g · L⁻¹ bushenhuoxue group (50 g · L⁻¹ BSHX group), 100 g · L⁻¹ bushenhuoxue group (100 g · L⁻¹ BSHX group), 200 g · L⁻¹ bushenhuoxue group (200 g · L⁻¹ BSHX group). Finally, cell apoptotic rate was detected by Annexin V-FITC/PI staining, while real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of PI3K and Akt in each group respectively. **Results** The results of qRT-PCR detection showed that PI3K, Akt mRNA expression level in C group (0.04 ± 0.01) was decreased compared with N group (1.00 ± 0.04), and the difference was statistically significant (all *P* < 0.05), while PI3K, Akt mRNA levels in 50 g · L⁻¹, 100 g · L⁻¹ and 200 g · L⁻¹ BSHX group (0.18 ± 0.01, 0.21 ± 0.02, 0.22 ± 0.01, 0.36 ± 0.01, 0.84 ± 0.10, 1.07 ± 0.17) were increased compared with the C group, and the difference was statistically significant (all *P* < 0.05). The Western blot results of each group showed that PI3K, Akt protein expression level in C group was decreased compared with N group, with statistical difference (all *P* < 0.05), while PI3K, Akt protein expression levels in 50 g · L⁻¹, 100 g · L⁻¹ and 200 g · L⁻¹ BSHX group were increased compared with C group, with statistical difference (all *P* < 0.05). **Conclusion** Bushenhuoxue drug-containing serum may inhibit the RGCs apoptosis induced by pressure, which may be related to the activation of PI3K/Akt signal transduction pathway.

【中图分类号】 R774

【关键词】 视网膜神经节细胞; 中药/补肾活血; PI3K; Akt; 加压纯化培养; 信号转导通路

【摘要】 目的 研究补肾活血中药血清对加压纯化培养视网膜神经节细胞 (retinal gangli-

[40] CHEN CL, BOJKIAN KD, XIN C, WEN JC, GUPTA D, ZHANG Q *et al.* Repeatability and reproducibility of optic nerve head perfusion measurements using optical coherence tomography angiography [J]. *J Biomed Opt* 2016 21(6):65002.

[41] WANG X, JIA Y, SPAIN R, POTSAID B, LIU JJ, BAUMANN B *et al.* Optical coherence tomography angiography of optic nerve head and parafovea in multiple sclerosis [J]. *Brit J Ophthalmol* 2014, 98(10):1368.

[42] BULUT M, KURTULUS F, GOZKAYA O, EROL MK, CENGIZ A, AKIDAN M *et al.* Evaluation of optical coherence tomography angiographic findings in Alzheimer's type dementia [J]. *Br J Ophthalmol* 2017 Jun 9.

[43] SRINIVASAN VJ, RADHAKRISHNAN H. Optical Coherence Tomography angiography reveals laminar microvascular hemodynamics in the rat somatosensory cortex during activation [J]. *Neuroimage* 2014, 102:393-406.

[44] GONG P, ES' HAGHIAN S, WOOD FM, SAMPSON DD, MCLAUGHLIN RA. Optical coherence tomography angiography for longitudinal monitoring of vascular changes in human cutaneous burns [J]. *Exp Dermatol* 2016 25(9):722-724.

[45] NAGIEL A, SADDI SR, SARRAF D. A Promising Future for Optical Coherence Tomography Angiography [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2015, 133(6):629-630.

on cells, RGCs) 凋亡模型 PI3K/Akt 信号转导通路主要成员 PI3K 及 Akt 表达的影响, 探索补肾活血法保护 RGCs 的机制。方法制备补肾活血中药含药血清, 体外纯化 SD 大鼠 RGCs, 采取开放式压力控制培养系统建立体外加压培养 RGCs 凋亡模型, 以 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 血清浓度梯度补肾活血中药血清分别处理。将 RGCs 分为 5 组, 分别为正常培养组 (N 组)、对照组 (C 组)、 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 补肾活血中药血清组 ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组)、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 补肾活血中药血清组 ($100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组)、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 补肾活血中药血清组 ($200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组), Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡率, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测补肾活血中药血清对 RGCs PI3K 及 Akt mRNA 表达水平的影响, Western blot 检测各组 PI3K、Akt 蛋白表达量。结果 q-PCR 检测各组 mRNA 结果: C 组 (0.04 ± 0.01) 与 N 组 (1.00 ± 0.04) 相比, RGCs 中 PI3K、Akt 的 mRNA 表达水平下降, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$), 而 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组 (0.18 ± 0.01 、 0.21 ± 0.02 、 0.22 ± 0.01 、 0.36 ± 0.01 、 0.84 ± 0.10 、 1.07 ± 0.17) 与 C 组相比, PI3K、Akt mRNA 含量逐渐升高, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。Western blot 检测各组蛋白表达, C 组与 N 组相比, 细胞 PI3K、Akt 的蛋白表达水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组与 C 组相比, PI3K、Akt 蛋白表达量逐渐升高, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。结论 补肾活血中药血清抑制加压诱导的 RGCs 凋亡, 其机制可能与激活 PI3K/Akt 信号转导通路有关。

青光眼是一组由多重因素导致的, 以视神经结构性破坏、视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 凋亡、视野缺损缩小为特征的一组退行性、致盲性视神经病变^[1], 是全世界第二位导致视力丧失的眼病^[2]。尽管高眼压被认为是青光眼病情进展的最重要的危险因素, 但单纯控制眼压并不能完全阻止 RGCs 的凋亡与视神经的萎缩^[3], RGCs 的凋亡、视神经的损害仍旧向前发展^[4], 因此在控制眼压同时, 阻断或降低 RGCs 的凋亡和增加 RGCs 的存活能力成为青光眼治疗的研究方向^[5]。近年 PI3K/Akt 信号通路已成为凋亡基因调控热点, 该通路对神经元存活的促进作用已得到较多研究证实^[6-8]。补肾活血法对大鼠慢性高眼压模型 RGCs 凋亡过程的干预在前期工作中已经得到证实^[9-10], 因此本研究将补肾活血法应用于体外加压培养大鼠 RGCs PI3K/Akt 信号通路的干预, 采用补肾活血中药含药血清干预体外加压培养大鼠 RGCs, 并检测 PI3K 及 Akt 的表达及酶活性, 以进一步明确其在 RGCs 凋亡过程中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 新生 0~24 h 的 SD 乳大鼠 20 只, 体质量 5~7 g, 8~12 周龄清洁级 SD 大鼠 60 只, 雌雄各 30 只, 体质量 200~250 g, 均由成都中医药大学动物实验中心 (动物许可证号: XK 川 2014-11) 提供, 饲养于室温 18~24 °C, 昼夜各 12 h, 适应性喂养 1 周。SD 大鼠用于灌胃后提取补肾活血中药血清组及空白对照组鼠血清。

1.2 主要试剂及仪器 HRP-山羊抗兔 IgG、HRP-山羊抗鼠 IgG (Jackson); Neurobasal 培养基、胰蛋白酶 (Invitrogen); 小鼠抗大鼠 Thy1.1 单克隆抗体、 β -actin、兔抗大鼠 PI3K 多克隆抗体、兔抗大鼠 Akt 多克隆抗体 (Abcam); ECL 发光液、蛋白酶抑制剂 (Merck); BSA 蛋白定量试剂盒 (Thermo); FITC-Annexin V/PI 凋亡试剂盒 (凯基生物); Trizol Reagent (Thermo); GoScriptTM Reverse Transcription System (Promega); ACCURI C6 流式细胞仪 (BD); 电泳仪、转膜仪 (Bio-rad); 多功能酶标仪 (Thermo)。

1.3 方法

1.3.1 RGCs 的原代培养及纯化 新生 24 h 内的 SD 乳大鼠处死, 取眼球后分离视网膜组织, 剪碎组

织, $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶及 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 透明质酸酶消化, 离心后将细胞悬液孵育在兔抗巨噬细胞抗体 (1:75) 中, 并置于经山羊抗兔 IgG 抗体 (1:400) 包被的培养皿中行小神经胶质细胞的排除, 将未贴壁细胞转移至经山羊抗鼠 IgM 抗体 (1:300) 和抗 Thy 1.1 抗体 (1:100) 共同包被的培养皿中孵育 30 min, 弃未贴壁细胞, 将贴壁 RGCs 胰蛋白酶 37 °C 消化 8 min, 离心后接种于多聚左旋赖氨酸和层粘连蛋白包被的 96 孔板中, 培养 24 h 后用维持培养液 (含体积分数 97.5% Neurobasal 培养基, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ B27 及 $200 \text{ mm} \cdot \text{L}^{-1}$ L-谷氨酰胺) 换液 1 次。每 2 d 更换培养液一次, 换液时仅换半量, 倒置相差显微镜观察细胞生长过程及形态变化。用双免疫筛选技术^[11-12] 分离纯化的原代 RGCs 培养 24 h 后, 用标签细胞定量检测, 获得的纯度至少为 98%。

1.3.2 加压培养模型的建立 参照文献制作改良开放压力控制培养系统^[11-12], 细胞培养 48 h 后, 半量换液后放入压力控制培养系统, 压力设定为 80 mmHg (1 kPa = 7.5 mmHg), 培养 24 h 后取出培养瓶或收集细胞进行检测, 每组实验重复 3 次。

1.3.3 血清制备 将体质量 200~250 g 的 SD 大鼠 60 只按随机数字表法随机抽取 12 只大鼠为空白对照组, 其余 48 只大鼠为补肾活血中药血清组。补肾活血中药血清组大鼠, 每天给予补肾活血中药 ($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 复方丹参片 0.96 g 和 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 杞菊地黄丸 3.0 g) 灌胃 1 次 (每天上午 9:00), 连续 7 d。空白对照组每天相同时间给予等剂量的纯化水 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在末次给药后 1 h 腹主动脉采血, 分离血清, 血清经 56 °C、30 min 灭活, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌、分装, -20 °C 保存备用。补肾活血中药含药血清经 UPLC-ESI-MS/MS 法测定含药血清主要成分含量。

1.3.4 实验分组 将 RGCs 分为五组, 分别为正常培养组 (N 组)、对照组 (C 组)、 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 补肾活血中药血清组 ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组)、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 补肾活血中药血清组 ($100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组)、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 补肾活血中药血清组 ($200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组)。将 C 组置于 80 mmHg 压力下培养 24 h 后加入不含药空白血清再培养 24 h, BSHX 组于 80 mmHg 加压培养

24 h 后分别加入 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 补肾活血中药含药血清,继续培养 24 h。

1.3.5 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡率

将加压培养后的 RGCs 用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞,室温下 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集细胞。用预冷 $1 \times \text{PBS}$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) 重悬细胞一次, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5~10 min,洗涤细胞。加入 $300 \mu\text{L}$ 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 悬浮细胞。加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 混匀后,避光,室温孵育 15 min。上机前 5 min 再加入 $5 \mu\text{L}$ PI 染色。上机前补加 $200 \mu\text{L}$ 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 。

1.3.6 Western blot 检测

RIPA 细胞裂解液裂解细胞提取蛋白质,利用 BSA 试剂盒测定蛋白浓度,取 $25 \mu\text{g}$ 蛋白质行蛋白质凝胶电泳,将电泳后的蛋白质电转移至 PVDF 膜, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h,相应一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, β -actin、兔抗大鼠 PI3K 多克隆抗体、兔抗大鼠 Akt 多克隆抗体,二抗室温孵育 30 min, β -actin 作为内参, Image J 软件测定条带灰度值,计算蛋白相对表达量,实验重复 3 次。

1.3.7 实时荧光定量 PCR 检测

收集各组细胞, Trizol 法提取总 RNA,利用随机引物进行逆转录反应得到 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 定量检测, PI3K 引物:上游引物: $5' \text{-ATACCGTCAGCAGTTT-GTCTCC-3'}$,下游引物: $5' \text{-GCATCCAAGGGTCCAGT-TAGT-3'}$,扩增长度 212 bp。Akt 引物:上游引物: $5' \text{-CCTGAAGCTACTGGGCAAGGG-3'}$;下游引物: $5' \text{-ACAAAGCAGAGCGGTCGTG-3'}$,扩增长度 222

bp。GAPDH 引物:上游引物: $5' \text{-ACCCGCGAGTA-CAACCTTCTT-3'}$;下游引物: $5' \text{-TATCGTCATCCAT-GGC GAACT-3'}$,扩增长度 76 bp。反应程序为:预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s,共 45 个循环;后延伸 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s。反应体系 $20 \mu\text{L}$,其中 SYBR Premix Ex Taq II $10 \mu\text{L}$ 。 β -actin 作为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量,每个样品设置 3 个重复。

1.4 统计学处理

将实验所获得计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 19.0 软件对数据行统计分析,检验水准选取 0.05。实验数据均采用重复测量数据的方差分析,多组别的比较采用 One-Way ANOVA 进行分析,多组间两两比较用 q 检验,经 Levene 检验数据满足方差齐性以 Bonferroni 方法为准,方差不齐的数据以近似方法 Dunnett3 分析结果为准。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RGCs 形态学观察

流式细胞仪检测 RGCs 特异性标记物 Thy1.1, iba1 为小神经胶质细胞的特异性标记物,GFAP 为活化的星形胶质细胞的特异性标记物,结果表明,纯化的 RGCs 培养液中发现 Thy1.1 阳性细胞为 $(99.15 \pm 4.238)\%$, iba1 及 GFAP 阳性细胞分别为 $(0.33 \pm 0.367)\%$ 和 $(0.48 \pm 0.102)\%$ 。表明 RGCs 的纯化率较高 ($>98\%$)。倒置显微镜下观察显示:分离纯化后的 RGCs 胞体表面光滑、轴突明显,细胞状态良好见图 1A;培养 RGCs Thy1.1 免疫荧光鉴定结果见图 1B。

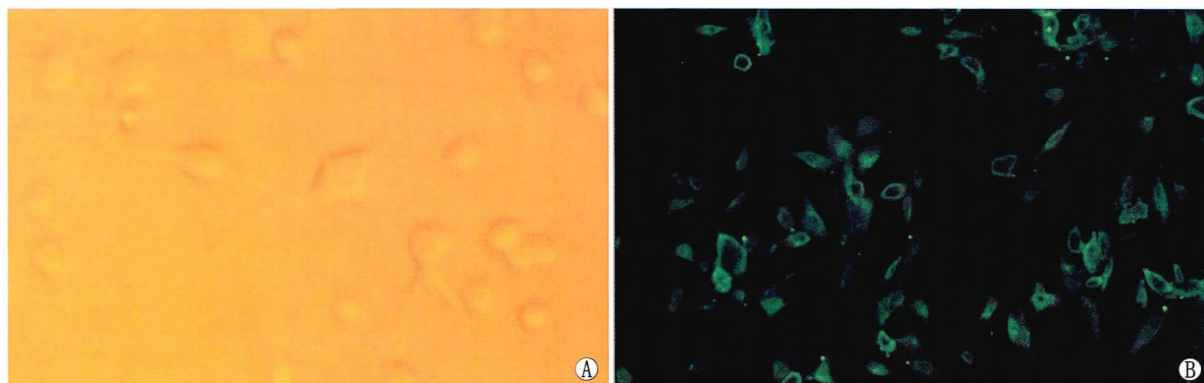


图1 纯化培养 RGCs 形态学及 Thy1.1 免疫荧光鉴定结果。A:纯化培养 48 h RGCs;B:培养 RGCs Thy1.1 免疫荧光鉴定结果

2.2 补肾活血中药血清对加压纯化培养大鼠 RGCs 凋亡的影响

流式细胞仪的检测结果表明,C 组 RGCs 细胞凋亡率 $(49.87 \pm 2.46\%)$ 较 N 组 $(3.70 \pm 0.90\%)$ 明显增加 ($P < 0.05$),而 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组细胞凋亡率分别为 $(34.13 \pm 2.80)\%$ 、 $(24.03 \pm 1.72)\%$ 和 $(9.30 \pm 1.44)\%$,均低于无含药血清的 C 组 ($P < 0.05$)。 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组与 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX

组相比细胞凋亡率有所减低,差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$),提示补肾活血中药含药血清对细胞凋亡起到了部分抑制作用(图 2)。

2.3 各组 RGCs 中 PI3K mRNA 表达比较

各组 RGCs 相对表达定量值比较,C 组 (0.04 ± 0.01) 与 N 组 (1.00 ± 0.04) 相比,细胞 PI3K mRNA 表达水平下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组 (0.18 ± 0.01) 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组

(0.22 ± 0.01)、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组(0.84 ± 0.10)与 C 组相比,PI3K mRNA 含量逐渐升高,差异均有

统计学意义(均为 $P < 0.05$),提示补肾活血中药含药血清可提升 PI3K 在 RGCs 中的转录水平。

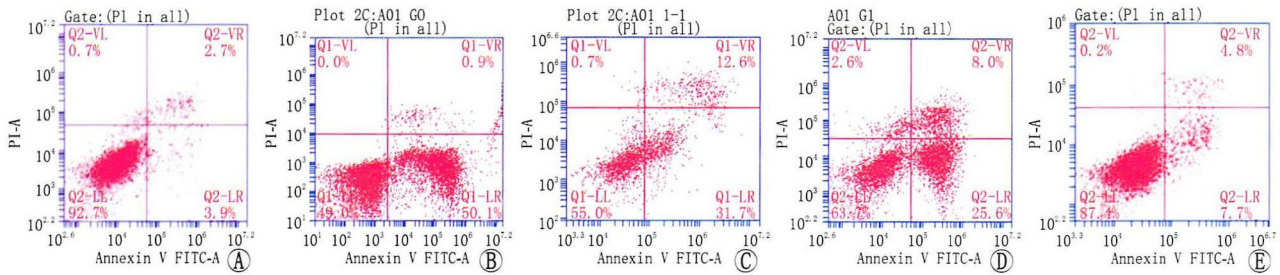


图2 补肾活血中药血清对加压纯化培养大鼠 RGCs 凋亡的影响。A: N 组; B: C 组; C: $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组; D: $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组; E: $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组

2.4 各组 RGCs 中 Akt mRNA 表达比较 各组 RGCs 相对表达定量值结果表明, C 组细胞 Akt mRNA(0.04 ± 0.01)表达较 N 组(1.00 ± 0.04)明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组(0.21 ± 0.02)、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组(0.36 ± 0.01)、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组(1.07 ± 0.17)细胞 Akt mRNA 表达均高于无含药血清的 C 组,且与 C 组相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),提示补肾活血中药含药血清可提升 Akt 在 RGCs 中的转录水平。

2.5 各组 RGCs 的 PI3K 及 Akt 蛋白表达比较 与 N 组比较, C 组 PI3K 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组与 C 组相比,PI3K 蛋白表达量逐渐升高,且 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组与 C 组相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$,见图 3、表 1)。C 组 Akt 蛋白表达与 N 组相比显著降低($P < 0.05$),而 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组与 C 组相比, Akt 蛋白表达量逐渐升高,且差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$,见图 3、表 1)。

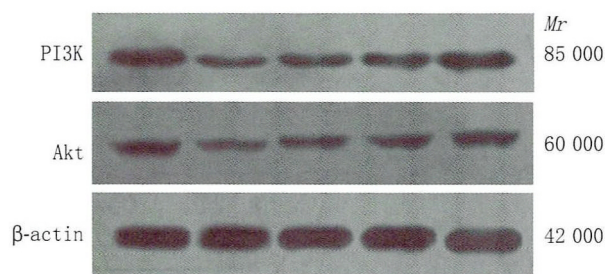


图3 各组体外培养大鼠 RGC 中的 PI3K、Akt 蛋白表达条带图

3 讨论

高眼压是青光眼 RGCs 凋亡的重要因素,是青光眼性视神经病变的基础,压力是青光眼的重要致病因素之一,其直接作用于 RGCs 的细胞膜,膜的通透性及跨膜物质转运受到影响而致细胞死亡,实验证

表1 各组体外培养大鼠 RGCs 中的 PI3K、Akt 蛋白表达

组别	PI3K 蛋白	Akt 蛋白
N 组	0.57 ± 0.04	0.60 ± 0.05
C 组	$0.37 \pm 0.03^*$	$0.33 \pm 0.04^*$
$50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组	0.43 ± 0.03	$0.42 \pm 0.04^{\#}$
$100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组	$0.53 \pm 0.04^{\#}$	$0.46 \pm 0.04^{\#}$
$200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSHX 组	$0.80 \pm 0.06^{\#}$	$0.64 \pm 0.04^{\#}$

注: * $P < 0.05$ vs N 组, $^{\#}P < 0.05$ vs C 组

明高眼压引起的筛板层间变形移位产生的剪切力阻滞视神经轴浆流于筛板水平,引起来源于上级神经元的营养物质不能顺利到达神经细胞,轴突膜不能利用线粒体产生 ATP 影响轴突蛋白的生成和转运,细胞正常代谢受到损害而死亡^[13]。国外已有研究证实压力可导致 RGCs 的凋亡^[14],体外加压培养 RGCs 的目的是模拟眼球在高压状态下 RGCs 的损伤情况。

我们的前期研究显示,补肾活血法用于大鼠慢性高血压模型可抑制视网膜神经纤维层和视网膜神经节细胞层变薄、改善 RGCs 超微结构;并可上调慢性高血压大鼠 RGCs 抗凋亡基因 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2、抑制凋亡促进基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 x 基因、上调 PI3K/Akt 信号转导通路中 p-Akt 的表达^[10]。将补肾活血中药运用于临床,发现其可改善眼压已控制青光眼患者的视野、VEP 及 RNFL 等指标^[15]。

PI3K/Akt 信号转导通路是一条可调节神经细胞和其他细胞存活的通路,这条通路激活主要依赖细胞因子和生长因子及其受体的激活,由 PI3K 激活诱导 Akt 磷酸化调节对视网膜和中枢神经损害的神经保护作用已有报道^[16]。有研究在实验性青光眼模型中发现当眼压升高后 1 d, Akt 即出现明显的磷酸化^[17], MANABE 等^[18]也发现 PI3K/Akt 信号通路可抑制由 NMDA 诱导的 RGCs 凋亡。而 KIM 等^[19]采用巩膜静脉烧灼制作的大鼠青光眼模型发现激活的 p-Akt 有促进 RGCs 存活的作用。有研究发现 β -雌二醇可激活 PI3K/Akt 信号通路而抑制 Bax 参与的

线粒体凋亡途径而保护视网膜神经细胞^[20]。

同样介导细胞存活的蛋白激酶 Akt 也取决于 PI3K 通路的激活,磷酸化 Akt 保护神经细胞,抑制其凋亡通过磷酸化 Bad 通过干扰线粒体细胞色素 C 释放,抑制 caspase-9 通过阻断 caspase 凋亡信号, Akt 也调节转录因子成员 Forkhead 家族 FKHL1 的激活。目前对视网膜 PI3K/Akt 信号通路的作用尚不完全清楚,之前有研究报道 BDNF 在视神经横断模型中有神经保护作用, PI3K/Akt 信号通路是一主要途径^[21]。

有研究报道证实视神经钳夹伤模型中视网膜 Akt 被激活, Akt 可被 PI3K 抑制剂明显抑制,但 Akt 并不完全依赖于 PI3K/Akt 信号通路,可能还有其他信号转导通路参与。血管内皮生长因子和相关信号转导通路包括 PI3K 可能通过 Akt 内源性神经保护途径参与大脑缺血模型中神经保护,在新生乳鼠心肌细胞, Akt 被激活在缺血再灌注损伤模型中经 PI3K 和 SRC 酪氨酸激酶依赖通路^[22],这些细胞缺血损伤激发 PI3K/Akt 通路进一步支持 RGCs 损伤后的神经保护是由激活 PI3K/Akt 信号通路所引起的。

本实验结果显示,补肾活血中药血清可提升体外加压培养 RGCs 中 PI3K 及 Akt 的表达,提示补肾活血中药血清可能激活了 PI3K/Akt 信号转导通路,这可能是补肾活血中药血清抑制体外加压培养大鼠 RGCs 凋亡的原因之一。结合以上分析,我们推断补肾活血法可能通过 PI3K/Akt 信号通路对 RGCs 起保护作用,为中药治疗青光眼、保护 RGCs 提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] GUPTA N, WEINREB RN. New definitions of glaucoma [J]. *Curr Opin Ophthalmol* 1997 8(2):38-41.
[2] QUIGLEY HA, BROMAN AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol* 2006 90(3):262-267.
[3] BRUBAKER RF. Delayed functional loss in glaucoma [J]. *Am J Ophthalmol* 1996 121(5):473-483.
[4] YANG J, TEZEL G, PATIL RV, WAX MB. Serum auto antibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 42(6):1273-1276.
[5] WAX B, TEZEL G, EDUARD PD. Clinical and ocular histopathological findings in a patient with normal-pressure glaucoma [J]. *Arch Ophthalmol* 1998 116(5):993-1001.
[6] 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.
[7] YANG X, HUO F, LIU B, LIU J, CHEN T, LI J *et al.* Crocin inhibits oxidative stress and pro-inflammatory response of microglial cells associated with diabetic retinopathy through the activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Mol Neurosci* 2017 61(4):581-589.
[8] SONG M, DU Z, LU G, LI P, WANG L. Syringic acid protects retinal ganglion cells against H₂O₂-induced apoptosis through the activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Mol Biol* 2016 62

(6):50-54.
[9] 李翔, 谢钊, 郭红建, 谢学军, 路雪婧, 王毅, 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.
LI X, XIE Z, GUO HJ, XIE XJ, LU XJ, WANG Y *et al.* Effects of traditional Chinese medicine of BuShenHuoXue on pathological changes of lateral geniculate in rat model of chronic elevated intraocular pressure [J]. *Rec Adv Ophthalmol* 2012 32(1):20-23.
[10] 汪伟, 李翔, 王桃, 柯欣怡, 刘红信, 贾正品, 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 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.
WANG W, LI X, WANG T, KE XY, LIU HJ, JIA ZP *et al.* Effects of Bushenhuoxue on expression of p-Akt of PI3K/Akt signal transduction pathway in RGC in rat model of chronic elevated intraocular pressure [J]. *Rec Adv Ophthalmol* 2015 35(9):816-820.
[11] 张虹, 李贵刚, 汪学方, 胡维琨, 谢二娟, 陈莲一, 等. 用于青光眼基础研究的开放式压力控制培养系统的研制 [J]. *中华眼科杂志* 2006 42(6):513-516.
ZHANG H, LI G, WANG X, HU WK, XIE EJ, CHEN LY *et al.* Development of open cycling air pressure control system used for glaucoma research [J]. *Chin J Ophthalmol* 2006 42(6):513-516.
[12] LIU Q, JU WK, CROWSTON JG, XIE F, PERRY G, SMITH MA, *et al.* Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 48(10):4580-4589.
[13] NUCCI C, TARTAGLIONE R, ROMBOLÀ L, MORRONE LA, FAZZI E, BAGETTA G. Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat [J]. *Neurotoxicology* 2005 26(5):935-941.
[14] KIM CI, LEE SH, SEONG GJ, KIM YH, LEE MY. Nuclear translocation and overexpression of GAPDH by the hyper-pressure in retinal ganglion cell [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 341(4):1237-1243.
[15] 汪伟, 李妍, 刘红信. 补肾活血中药对原发性青光眼术后视神经保护作用的临床研究 [J]. *北京中医药大学学报* 2016 39(2):132-135.
WANG W, LI Y, LIU HJ. Neuroprotective effects of kidney-tonifying and blood-activating medicinal on optical nerve in glaucomatous eyes after filtering surgery [J]. *J Beijing Univ TCM* 2016 39(2):132-135.
[16] WEISHAUP T, ROHDE G, PÖLCKING E, SIREN AL, EHRENREICH H, BÄHR M. Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 45(5):1514-1522.
[17] LEVKOVITCH-VERBIN H, HARIZMAN N, DARDIK R, NISGAV Y, VANDER S, MELAMED S. Regulation of cell death and survival pathways in experimental glaucoma [J]. *Exp Eye Res* 2007 85(2):250-258.
[18] MANABE S, LIPTON SA. Divergent NMDA signals leading to pro-apoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 44(1):385-392.
[19] KIM HS, PARK CK. Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program [J]. *Brain Res* 2005 1057(1/2):17-28.
[20] LI H, WANG B, ZHU C, FENG Y, WANG S, SHAHZAD M *et al.* 17 β -estradiol impedes Bax-involved mitochondrial apoptosis of retinal nerve cells induced by oxidative damage via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway [J]. *J Mol Neurosci* 2013 50(3):482-493.
[21] 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.
[22] MOCKRIDGE JW, MARBER MS, HEADS RJ. Activation of Akt during simulated ischemia/reperfusion in cardiac myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 270(3):947-952.