

大豆黄酮玻璃体腔注射对大鼠视神经损伤的影响

唐中俊¹, 黄振平², 杨文静³, 邹勇象⁴, 蔡季平¹

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81200719)

作者单位:¹(200003)中国上海市,第二军医大学长征医院眼科;²(210000)中国江苏省南京市,南京军区南京总医院眼科;³(200003)中国上海市,第二军医大学基础医学部神经生物教研室;⁴(200003)中国上海市,第二军医大学长征医院神经外科

作者简介:唐中俊,毕业于第二军医大学,硕士研究生,住院医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:蔡季平,教授,硕士研究生导师,主任医师,研究方向:视网膜脱离、眼底病。netpard@163.com

收稿日期:2014-05-28 修回日期:2014-07-09

Effect of Daidzein intravitreal injection on optic nerve injury in rats

Zhong-Jun Tang¹, Zhen-Ping Huang², Wen-Jing Yang³, Yong-Xiang Zou⁴, Ji-Ping Cai¹

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81200719)

¹Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; ²Department of Ophthalmology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China; ³Teaching and Research Office of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; ⁴Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Correspondence to: Ji-Ping Cai. Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China. netpard@163.com

Received:2014-05-28 Accepted:2014-07-09

Abstract

• **AIM:** To discuss Daidzein intravitreal injection whether has protective and recovery effects on acute nerve damages.

• **METHODS:** After the crush models of acute optic nerve were set up, 72 males SD rats were divided into 4 groups randomly as common group without surgery, FBS negative control group, Daidzein treatment group (10 μ mol/L, 100 μ mol/L, 1000 μ mol/L) and positive control group using rats nerve growth factor (mNGF, 100ng/mL). Three days after interference, all experimental animals were executed. HE staining was used to evaluate morphologic change of the retina, immunohistochemical staining and western-blot tests for identifying and quantifying the distinct expression of Caspase-3 and GAP-43 among the groups.

• **RESULTS:** Compared with the normal group and negative control group, retinal morphology of different concentrations of each Daidzein treatment group and positive control group was more complete, the expression of Caspase-3 protein was relatively lower, the expression of GAP-43 protein was relatively higher, the differences have statistically significance ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Daidzein injection in the vitreous cavity has the capacity of protection and restoration in rat's acute nerve damages.

• **KEYWORDS:** Daidzein; optic nerve damage; Caspase-3; GAP-43

Citation: Tang ZJ, Huang ZP, Yang WJ. Effect of Daidzein intravitreal injection on optic nerve injury in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(8):1378-1381

摘要

目的: 大豆黄酮(Daidzein)玻璃体腔内注射是否对视神经急性损伤有保护和修复作用。

方法: SD 雄性大鼠 72 只,建立大鼠急性视神经钳夹损伤模型,随机分为正常组、PBS 阴性对照组、大豆黄酮治疗组(10 μ mol/L, 100 μ mol/L, 1000 μ mol/L)、鼠神经生长因子(mNGF, 100ng/mL)阳性对照组;玻璃体内注射 3d 后处死各组大鼠,用组织病理(HE)、免疫组化检测以及 Western Blot 分析来观察和评价视网膜形态变化及进行各组间视网膜 Caspase-3 蛋白和 GAP-43 蛋白表达的比较。

结果: 与正常组和阴性对照组相比,不同浓度的大豆黄酮各治疗组和阳性对照组的视网膜形态结构较完整, Caspase-3 蛋白的表达相对降低, GAP-43 蛋白的表达相对较高,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 大豆黄酮玻璃体腔注射对大鼠急性视神经损伤具有修复和保护作用。

关键词: 大豆黄酮;视神经损伤;Caspase-3;GAP-43

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.08.03

引用: 唐中俊,黄振平,杨文静,等.大豆黄酮玻璃体腔注射对大鼠视神经损伤的影响.国际眼科杂志 2014;14(8):1378-1381

0 引言

视神经损伤也称为外伤性视神经病变(tramatic optic neuropathy, TON),是头面部和眼眶外伤的严重并发症或伴随损伤,也是导致患者失明的重要原因之一^[1]。近年来,由于交通事故等原因,外伤性视神经病变发生有增多趋势。视神经损伤多导致严重的视力损害,许多患者视力仅存光感甚至无光感。相关研究显示^[2],植物雌激素对不同的神经变性、损伤均具有神经保护功能。本

研究用植物激素大豆黄酮直接注射在视神经钳夹伤的大鼠玻璃体腔内进行干预,通过眼病理(HE染色)、免疫组织化学和 Western Blotting 方法评估大豆黄酮对视神经损伤的神经保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 SD(Sprague-Dawley)大鼠 72 只(雄性,体质量 200~250g,第二军医大学实验动物中心),所有 SD 大鼠眼部经裂隙灯和检眼镜检查屈光间质清晰,眼底无病变。大豆黄酮(Daidzein)购于国药集团化学试剂有限公司;注射用鼠神经生长因子(mNGF)购于厦门北大之路生物工程有限公司;兔抗鼠单克隆 caspase-3 抗体购于 Bioworld 公司;兔抗鼠单克隆 GAP-43 抗体购于 Sigma 公司;羊抗兔 GAPDH 抗体购于 Sigma 公司;兔来源 Ig-FITC 购于碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠视神经损伤模型的制作 本实验采用国外最常用和被公认为较精确的视神经夹挫伤模型^[3],所有大鼠眼部经裂隙灯和检眼镜检查屈光间质清晰,眼底无病变。100g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉,乙醇消毒,垂直于上睑睑缘方向剪开。上方巩膜缘处剪开球结膜,钝性分离。向下牵拉眼球,肌锥内钝性分离暴露视神经,避免伤及血管。动脉瘤夹于球后 2.5mm 处夹持视神经 6s。观察术眼瞳孔散大,且无眼底视网膜出血,进行大豆黄酮玻璃体腔内注射(具体操作见下文)。缝合球结膜和上眼睑,结膜囊内及上眼睑涂氧氟沙星眼膏。待麻醉苏醒后,观察大鼠术眼瞳孔散大,无眼睑闭合不全和眼球突出,且眼底检查无视网膜血管出血为成功模型,可纳入实验。所有 SD 大鼠右眼为实验损伤眼,左眼不损伤。

1.2.2 玻璃体腔内注射 SD 大鼠术眼视神经动脉瘤夹后,调整眼球方向,使 10 μ L 微量注射器针尖在眼球上方赤道部角巩膜缘后 1.5mm 处用斜向后下方进针(约 45°斜角向视网膜方向进针),避开晶状体到达眼球后极部视网膜中央,无眼底异常后自动连续注射器向玻璃体内注射,速度 3 μ L/min,注射量为 5 μ L,完毕后留针 30s 后按下退针,速度仍为 3 μ L/min。观察眼底无出血,眼球触碰眼压正常,为注射成功。

1.2.3 动物分组 随机分为 6 组:正常对照组 12 只(A 组),PBS 对照组 12 只(B 组),10 μ mol/L 大豆黄酮治疗组 12 只(C 组),100 μ mol/L 大豆黄酮治疗组 12 只(D 组),1000 μ mol/L 大豆黄酮治疗组 12 只(E 组),100ng/mL 鼠神经生长因子治疗组 12 只(F 组)。SD 大鼠右眼视神经损伤后,立即大豆黄酮玻璃体腔注射干预,并于干预后的第 3d 灌注取材。

1.2.4 HE 视网膜病理形态检测 各模型于建立后 3d,将 SD 大鼠水合氯醛腹腔注射麻醉后灌注,取材,之后将大鼠眼球石蜡包埋、切片。将切片组织行苏木精-伊红(HE)染色,普通显微镜下观察检测。

1.2.5 免疫组织化学检测 Caspase-3 蛋白的表达 将载玻片脱蜡、复水,用抗原修复液修复,5%~10%山羊血清(PBS 稀释)室温封闭 10min。滴加兔抗鼠单克隆 caspase-3 抗体稀释液(1:500),室温 4 $^{\circ}$ C 过夜。过夜后滴加荧光素兔来源 Ig-FITC 室温孵育。滴加 hoechst 染液染核,最后滴加 60% 缓冲甘油封片。置于显微荧光镜下观察拍照。

1.2.6 Western Blotting 检测视网膜 GAP-43 蛋白的表达 将提取的眼球视网膜蛋白置于沸水中煮沸 5min 后上样。10% SDS-PAGE 分离,含 150mL/L 甲醇的转膜缓冲液转膜,恒电流 0.3A 转膜 2h。丽春红预染观察,10% 脱脂奶粉室温封闭 2h,加入一抗兔抗鼠单克隆 GAP-43 抗体(1:1000)于 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。TBST 洗 3 遍,每次 15min,加入二抗(1:5000)室温 2h, TBST 洗 3 遍,每次 15min。ECL 液显影,压片。用 ImageJ 进行灰度扫描分析。实验结果重复 3 次。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 软件进行处理,组间比较用 *t* 检验;检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HE 染色 正常 SD 大鼠视网膜结构各层组织层次清楚,细胞排列整齐。内界膜清楚可见,神经纤维层排列规整,神经节细胞层单层排列,胞核较大,内核层由 3~5 层细胞紧密排列而成,胞核大,外核层由 8~10 层细胞构成,排列规整紧凑。正常对照组神经节细胞层单层排列,胞核较大,其余各层组织层次清楚,细胞排列整齐。PBS 对照组与正常对照组相比较,视网膜各层结构区分模糊,且层间松散,细胞核密度不均。10 μ mol/L 大豆黄酮治疗组视网膜各层结构区分较模糊,神经节细胞胞核缩小,外丛状层、外核层出现层间断裂。100 μ mol/L 大豆黄酮治疗组与正常对照组相比较,神经节细胞数量有所减少,但各层组织结构能明显区分,内核层、外丛状层、外核层结构依然紧密。1000 μ mol/L 大豆黄酮治疗组,视网膜各层组织结构明显松散,神经节细胞层分层不清。mNGF(100ng/mL)组与正常对照组相比较,内核层间组织稍显疏松,神经节细胞数量有所减少,但各层组织结构区分明显(图 1)。

2.2 免疫组织化学检测 Caspase-3 蛋白的表达 SD 大鼠干预后 3d,灌注、取材后石蜡切片,进行免疫组织化学检测 Caspase-3 蛋白在视网膜各层中的表达以及分布情况。从免疫荧光的图片来看,A 组中视网膜 Caspase-3 蛋白表达极少,只在内核层有少量表达,而 B 组与正常组相比,视网膜各层 Caspase-3 蛋白表达明显增加,其中神经节细胞层、内核层、外核层都呈现高表达;C 组、D 组、E 组三组与正常组比较视网膜 Caspase-3 蛋白的表达量都相应增加,而与 PBS 对照组相比,D 组表达明显减少;F 组与 PBS 对照组相比较,视网膜 Caspase-3 蛋白的表达明显减少,在神经节细胞层和内核层减少尤为明显;D 组与 mNGF 阳性对照组相比,内外核层表达相当,但 D 组的神经节细胞层的表达量相对较多(图 2)。

2.3 Western Blotting 检测视网膜 GAP-43 蛋白的表达

SD 大鼠干预 3d 后,灌注、取材后提取蛋白,之后进行 WB 技术检测 SD 大鼠视网膜 GAP-43 蛋白的相对表达量。每组 GAP-43 蛋白的相对表达量用 GAP-43/GAPDH 的积分光密度(IOD)值来表达。A 组 0.158 \pm 0.03、B 组 0.298 \pm 0.05、C 组 0.643 \pm 0.07、D 组 1.383 \pm 0.11、E 组 0.986 \pm 0.09、F 组 2.093 \pm 0.15。与正常组相比较,各组的 GAP-43 蛋白的相对表达量均有升高;大豆黄酮干预后,D 组中视网膜 GAP-43 蛋白的相对表达量与 PBS 对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$,图 3);F 组中视网膜 GAP-43 蛋白的相对表达量与 PBS 对照组比较,差异有统计学意义(图 3, $P<0.05$);但 D 组和 F 组相比较,两者差异无统计学意义(图 3, $P>0.05$)。

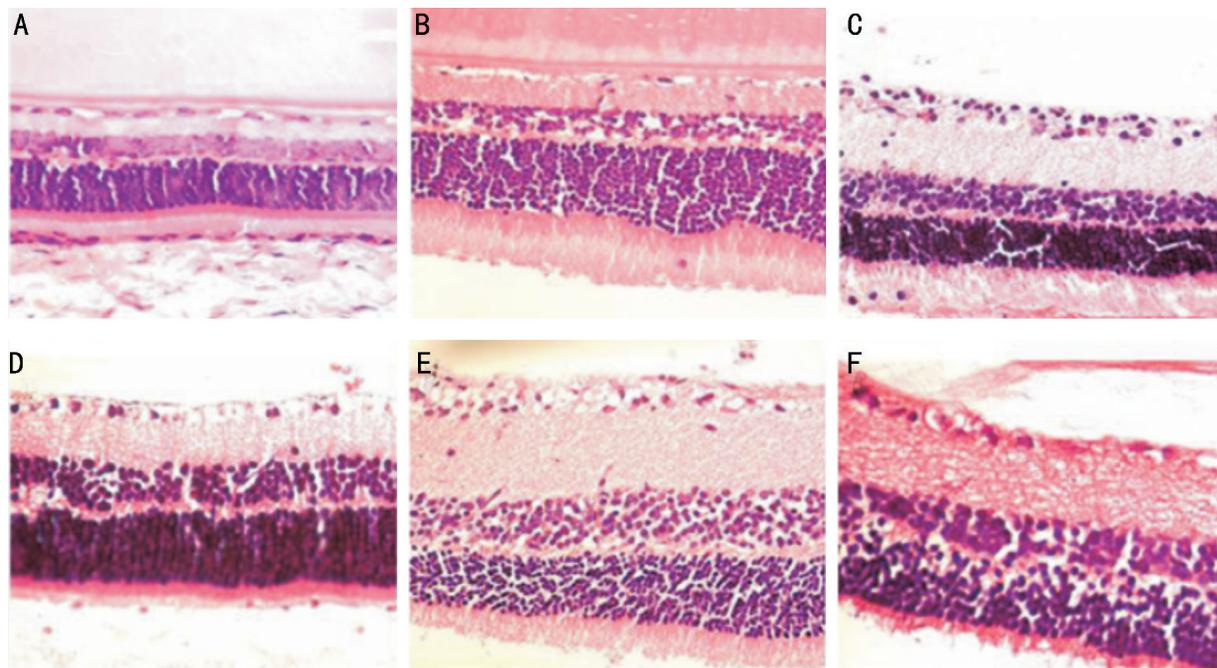


图1 各组视网膜的HE染色($\times 400$) A:正常对照组;B:PBS对照组;C:10 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;D:100 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;E:1 000 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;F:mNGF(100ng/mL)组。

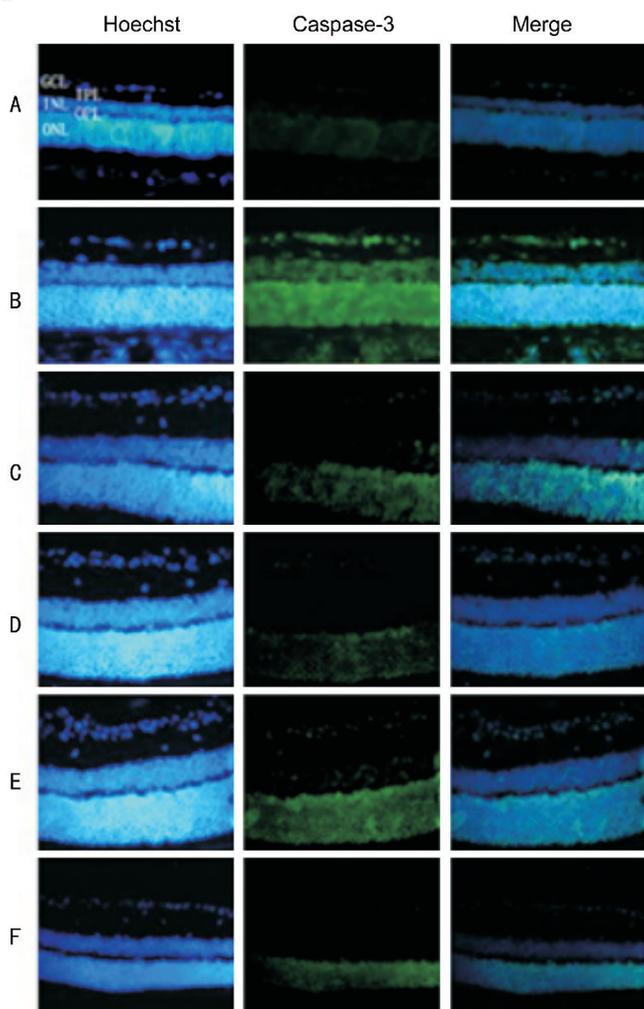


图2 各组视网膜中Caspase-3蛋白的表达 A:正常对照组;B:PBS对照组;C:10 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;D:100 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;E:1 000 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;F:mNGF(100ng/mL)组。

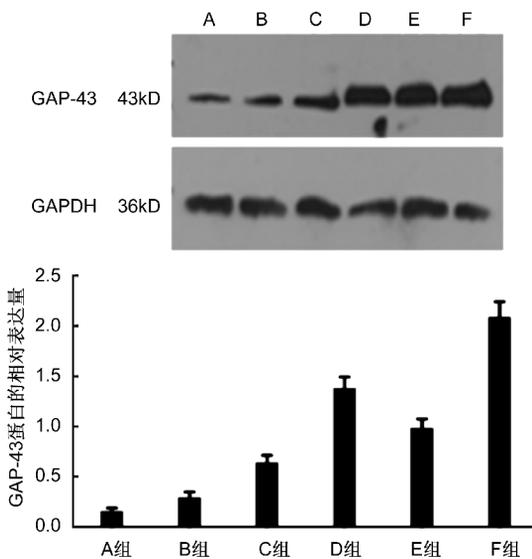


图3 各组视网膜组织GAP-43蛋白的表达 A:正常对照组;B:PBS对照组;C:10 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;D:100 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;E:1 000 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮治疗组;F:mNGF(100ng/mL)组。

3 讨论

我们的研究旨在探讨玻璃体腔内注射一定浓度的大豆黄酮后对大鼠急性视神经损伤的神经修复和保护作用。研究结果显示:(1)HE染色显示能改善视网膜的结构形态;(2)免疫组织化学提示能够抑制视网膜组织中凋亡蛋白Caspase-3的表达;(3)Western Blotting检测显示在视网膜组织中,能够使促进神经生长GAP-43的蛋白表达量增加,但表达量不及mNGF阳性对照组。

最新的研究表明:大豆黄酮对多种神经元有保护、修复和促进轴突再生功能,如海马神经元、皮质神经元和背根神经节神经元^[4-6]。同时也有研究发现大豆黄酮和异黄酮等对外周神经系统神经元轴突的再生及抗凋亡均有

明显作用^[7]。而大豆黄酮对视神经的损伤是否有修复和保护作用至今未见报道,所以我们对 SD 大鼠采取一次性玻璃体腔给药的方式观察其作用,并从视网膜病理形态、促凋亡蛋白 Caspase-3 和促进神经生蛋白 GAP-43 的表达三个方面评判其效应。

本实验结果表明,大鼠玻璃体腔内注射不同浓度的大豆黄酮对视网膜形态产生了不同影响,注射浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 组,对视网膜形态与正常组相比稍模糊,但出现神经节细胞层的松散和出血;注射浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 组,虽然神经节细胞数量有所减少,但其形态大体正常,而且各层组织结构能明显区分,内核层、外丛状层、外核层结构依然紧密;而注射浓度为 1000 $\mu\text{mol/L}$ 组,视网膜各层形态松散断裂,可能与其浓度过高产生毒副反应有关。

研究发现,细胞凋亡的某些特征性标志,如染色体凝聚和 DNA 片段化等,均与 Caspase-3 有着直接的关系^[8,9],Caspase-3 是细胞凋亡下游死亡信号传导途径关键部位,一旦被激活,细胞凋亡的发生将不可逆转。本实验的免疫组化结果来看,正常组的视网膜 Caspase-3 蛋白表达极少;PBS 对照组视网膜各层蛋白表达明显增加,其中神经节细胞层、内核层、外核层都呈现高表达;与 PBS 对照组相比三种注射浓度的大豆黄酮中,100 $\mu\text{mol/L}$ 组视网膜 Caspase-3 蛋白的表达明显减少,在外核层有一定量的表达;100 $\mu\text{mol/L}$ 组与 mNGF 阳性对照组相比,内外核层表达相当,神经节细胞层的促凋亡蛋白 Caspase-3 表达量相对增多,这可能与视神经急性损伤后 mNGF 促进轴突方向的生长和突触形成^[10,11],进而促进神经修复抑制神经节细胞的凋亡。最后,100 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮组的神经节细胞层的 Caspase-3 蛋白的表达也相应降低是否也是因为其促轴突生长和增加突触形成,还是其对 Caspase-3 上游发生了调控,这一点需要进一步的研究证实。

神经生长相关蛋白(growth associated protein,GAP-43)是脊椎动物神经细胞膜上的一种特异性磷蛋白。神经损伤时,损伤周围的神经元通过侧枝发芽和反应性轴突再生进行功能代偿,这些区域 GAP-43 水平再次升高,且随着损伤修复时间的延长而逐步回落^[12]。正常组 GAP-43 蛋白表达水平较低,视神经损伤后 3d 其表达量增加到正常水平的 2 倍左右,启动了自身修复功能;100 $\mu\text{mol/L}$ 大豆黄酮组和 mNGF 阳性对照组分别与 PBS 对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),但三种浓度的大豆黄酮表达量均不及 mNGF 治疗组。我们预测认为大豆黄酮促进了轴突生长及突触形成,而显示出高水平 GAP-43 的合成,

进而可以推论 GAP-43 会随着轴浆的运输而抑制神经节细胞的凋亡。此外,mNGF 治疗组 GAP-43 蛋白表达水平最高,我们推断其正是通过促进 GAP-43 蛋白高表达这种方式促进了轴突的生长和突触形成。

本实验运用病理形态学、免疫组织化学和 Western Blotting 方法检测,初步证明大豆黄酮对视神经损伤的神经保护作用。但其抑制凋亡蛋白 Caspase-3 和促进 GAP-43 蛋白表达的具体机制还有待进一步研究,同时本研究期望能为视神经损伤后的治疗提供一些新的思路。

参考文献

- 1 宋国祥. 眼眶病学. 北京:人民卫生出版社 2001:466-473
- 2 Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, et al. Signaling by estrogens. *J Cell Physiol* 2007;213(3):610-617
- 3 Yoles E, Muller S, Schwartz M. NMDA-receptor antagonist protects neurons from secondary degeneration after partial optic nerve crush. *J Neurotrauma* 1997;14(9):665-675
- 4 Wang P, Jeng CJ, Chien CL, et al. Signaling mechanisms of daidzein-induced axonal outgrowth in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366(2):393-400
- 5 Ma TC, Campana A, Lange PS, et al. A large-scale chemical screen for regulators of the arginase 1 promoter identifies the soy isoflavone daidzein as a clinically approved small molecule that can promote neuronal protection or regeneration via a cAMP-independent pathway. *J Neurosci* 2010;30(2):739-748
- 6 Chen CH, Chen YJ, Jeng CJ, et al. Role of PKA in the anti-Thy-1 antibody-induced neurite outgrowth of dorsal root ganglionic neurons. *J Cell Biochem* 2007;101(3):566-575
- 7 Valeri A, Fiorenzani P, Rossi R, et al. The soy phytoestrogens genistein and daidzein as neuroprotective agents against anoxia-glucopenia and reperfusion damage in rat urinary bladder. *Pharmacol Res* 2012;66(4):309-316
- 8 Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10(6):649-655
- 9 Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15(11):269-290
- 10 Salama-Cohen P, Arevalo MA, Meier J, et al. NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch. *Mol Biol Cell* 2005;16(1):339-347
- 11 Oyesiku NM, Evans CO, Houston S, et al. Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain. *Brain Res* 1999;833(2):161-172
- 12 Kotulska K, Marcol W, Larysz-Brysz M, et al. Impaired regeneration of bcl-2-lacking peripheral nerves. *Neurol Res* 2005;27(8):843-849