

白藜芦醇对青光眼大鼠视神经损伤的保护作用及其机制

贺琳¹, 焦云娟², 马高恩¹, 李艳华¹, 李晓鹏¹

引用: 贺琳, 焦云娟, 马高恩, 等. 白藜芦醇对青光眼大鼠视神经损伤的保护作用及其机制. 国际眼科杂志 2021; 21(1): 27-31

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (No.16B320017)
作者单位: ¹(453000) 中国河南省新乡市, 新乡医学院第三附属医院眼科; ²(453003) 中国河南省新乡市, 新乡医学院基础医学院
作者简介: 贺琳, 毕业于新乡医学院, 本科, 主治医师, 研究方向: 白内障、青光眼。
通讯作者: 马高恩, 毕业于中南大学, 博士, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜膜疾病. mge2345@163.com
收稿日期: 2019-12-17 修回日期: 2020-12-03

摘要

目的: 分析白藜芦醇对青光眼大鼠视神经的保护作用及对磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路及其相关因子的影响。

方法: SPF 级 SD 大鼠以烧灼巩膜表面静脉法制作右眼青光眼模型, 建模成功后以不同剂量 (10、20、40mg/kg 腹腔注射) 白藜芦醇干预, 末次给药后 2h 检测各组大鼠眼压, 进行视网膜铺片观察视网膜神经节细胞 (RGC) 存活情况, 采用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测视网膜 PI3K、Akt、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、脑源性神经营养因子 (BDNF) mRNA 及蛋白表达情况。

结果: 模型组眼压 (30.25 ± 4.25 mmHg) 高于低剂量组 (26.30 ± 4.05 mmHg)、中剂量组 (22.31 ± 3.68 mmHg) 和高剂量组 (18.32 ± 3.21 mmHg), 模型组 RGC 标识率 ($48.25\% \pm 4.50\%$) 低于低剂量组 ($56.32\% \pm 5.05\%$)、中剂量组 ($66.03\% \pm 6.68\%$) 和高剂量组 ($78.56\% \pm 7.82\%$) (均 $P < 0.05$), 且低、中、高剂量组眼压呈剂量依赖性下降, RGC 标识率呈剂量依赖性升高。模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白比值及 bFGF、BDNF mRNA 和蛋白相对表达量低于低剂量组、中剂量组和高剂量组 (均 $P < 0.05$), 且低剂量组、中剂量组、高剂量组呈剂量依赖性升高。

结论: 白藜芦醇能抑制青光眼大鼠 RGC 的凋亡, 减轻视神经损伤, 其机制可能与上调 PI3K/Akt 信号通路中相关蛋白的磷酸化及视神经保护作用因子基因与蛋白的表达有关。

关键词: 白藜芦醇; 青光眼; 视神经损伤; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 蛋白激酶 B

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.1.05

Protective effect and mechanism of resveratrol on optic nerve injury in glaucoma rats

Lin He¹, Yun-Juan Jiao², Gao-En Ma¹, Yan-Hua Li¹, Xiao-Peng Li¹

Foundation item: Key Scientific Research Projects of Colleges and

Universities in Henan Province (No.16B320017)

¹Department of Ophthalmology, the Third Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan Province, China;

²Basic Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Correspondence to: Gao-En Ma. Department of Ophthalmology, the Third Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan Province, China. mge2345@163.com

Received: 2019-12-17 Accepted: 2020-12-03

Abstract

• AIM: To analyze the protective effect of resveratrol on the optic nerve of glaucoma rats and its effect on the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signal pathway and its related factors.

• METHODS: SPF grade SD rats were used to cauterize the scleral surface veins to make a right eye glaucoma model. After successful modeling, different doses (10, 20, 40 mg/kg intraperitoneal injection) of resveratrol were used to intervene. Intraocular pressure was measured 2h after the last administration, and retinal slices were made to observe the survival of retinal ganglion cells (RGC). Retinal plaque to observe the survival of retinal ganglion cells (RGC). Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of retinal PI3K, Akt, basic fibroblast growth factor (bFGF), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

• RESULTS: The intraocular pressure (30.25 ± 4.25) mmHg in the model group was higher than that in the low-dose group (26.30 ± 4.05) mmHg, the middle dose group (22.31 ± 3.68) mmHg and the high dose group (18.32 ± 3.21) mmHg, and the model group RGC labeling rate (48.25 ± 4.50)% was lower than the low dose group (56.32 ± 5.05)%, middle dose group (66.03 ± 6.68)% and high dose group (78.56 ± 7.82)% ($P < 0.05$). The intraocular pressure in the low, middle and high dose groups decreased in a dose-dependent manner, and the RGC labeling rate increased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt protein ratio, bFGF, BDNF mRNA and protein relative expression in the model group were lower than those in the low dose group, middle dose group, and high dose group ($P < 0.05$), and the low-dose group, middle dose group and high-dose group increased in a dose-dependent manner.

• CONCLUSION: Resveratrol can inhibit the apoptosis of RGC in glaucoma rats and reduce optic nerve damage, which may be related to the up regulation expression of phosphorylated of related proteins in PI3K/Akt signal pathway and the expression of protective gene and protein of optic nerve.

• KEYWORDS: resveratrol; glaucoma; optic nerve injury; phosphatidylinositol 3 kinase; protein kinase B

Citation: He L, Jiao YJ, Ma GE, *et al.* Protective effect and mechanism of resveratrol on optic nerve injury in glaucoma rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2021;21(1):27-31

0 引言

青光眼是继白内障之后的第二大致盲性眼病,以视神经乳头凹陷性萎缩和视野特征性缺损性缩小为主要表现,不仅影响患者的视力健康和生活质量,也造成了一定的社会负担^[1]。多项研究表明,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)凋亡和神经轴突的退变是青光眼的主要病变特点^[2-4],因此减少或抑制 RGC 凋亡与轴突的退变成为青光眼治疗的研究热点。传统青光眼的治疗方式为手术或药物降压,但部分患者在眼压正常后仍存在继发性视神经损伤。白藜芦醇是一种非黄酮类多酚化合物,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗细胞凋亡、神经保护等多种作用。既往研究证实,白藜芦醇可减轻青光眼视网膜的氧化应激损伤,但未具体阐述对 RGC 凋亡的影响及相关调控机制^[5]。故此,本研究通过建立青光眼大鼠模型,分析白藜芦醇对青光眼大鼠视神经损伤的保护作用以及对凋亡相关信号通路磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)及其相关因子的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康无眼疾 SPF 级 SD 大鼠,8 周龄,60 只,雌雄各半,体质量 180~220g,购自河北医科大学动物实验中心,许可证号 SCXK(冀)2018-003。自由进食饮水,适应性饲养 1wk。饲养环境室温 23℃~25℃,湿度 45%~55%,12h 明/暗交替光照。本研究经实验动物伦理委员会批准(批准号:2018-085)。

1.1.2 主要仪器及试剂 白藜芦醇(美国 Sigma 公司),荧光金(美国 Biotium 公司),0.25% 氯霉素眼液(山东省人民医院有限公司,国药准字 H20063685),0.5% 盐酸丙美卡因眼液(比利时爱尔康医药公司,批准文号 H20090082),超纯 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、BCA 蛋白定量分析试剂盒(广州迈博生物科技有限公司),兔抗大鼠 PI3K、磷酸化(phosphorylation, p)-PI3K、Akt、p-Akt、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)多克隆抗体(北京 Jackson 公司);7500 实时荧光定量 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司),全段酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 荧光金染料逆行标记追踪 RGC 取 60 只大鼠,0.3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,固定于脑立体定位仪上,以 Paxinos 图谱为标准,定位器调整至零后,后移 6.0mm,在两侧旁开中线 1.5mm 处对称点,制作大小约 1mm 的骨孔,撕开骨孔处硬脑膜, Bregma 点为零点后移 4.3、6.3mm 的骨孔内,分别旁开 4.4、1.4mm,于背侧膝状核和上丘内分别以玻璃微管缓慢注入 3% 荧光金 0.5 μ L,注射深度分别为 4.5、3.5mm,于 5min 内注射完毕,针头留置 10min。对侧背外侧膝状核和上丘操作同上,术毕分层缝

合筋膜和皮肤,大鼠分笼饲养,自由饮食、饮水,保持垫料干燥。

1.2.2 青光眼大鼠模型制备 60 只大鼠行荧光金染料逆行标记追踪 RGC 4d 后以 0.25% 氯霉素眼液滴注右眼,1 滴/次,2 次/天,连续 3d。荧光金染料逆行标记追踪 RGC 7d 后,随机取 40 只大鼠,采用烧灼巩膜表面静脉法均选取右眼制作青光眼模型^[6]:建模当天大鼠称重,仰卧于手术台后固定,以 0.3% 戊巴比妥钠腹腔注射,并以 0.5% 盐酸丙美卡因眼液滴注术眼 3 次,常规消毒铺巾,暴露右眼。在眼科显微镜下,距角巩膜缘 12:00 方向剪开上方球结膜,约 1mm,钝性分离球结膜及筋膜,暴露巩膜静脉,分离 3 支上巩膜静脉,以手术烧灼器轻轻烙闭,以近角膜端血管扩张充盈,远角膜端血管血流消失为宜。后整复术眼球结膜及筋膜,涂抹金霉素软膏,术后第 2d 以 0.25% 氯霉素眼液滴眼,1 滴/次,2 次/天,连续 7d。左眼不做处理。余 20 只大鼠除未烧灼上巩膜静脉外,其余步骤相同。

1.2.3 分组及干预 取建模成功(烧灼巩膜表面静脉术后 7d 检测眼压大于 21mmHg 或术眼眼压高于非手术眼 5mmHg 视为建模成功)大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别为模型组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,20 只未烧灼上巩膜静脉大鼠随机分为对照组(10 只)和实验对照组(10 只)。根据预实验结果确定白藜芦醇浓度,低、中、高剂量组分别以白藜芦醇 10、20、40mg/kg 腹腔注射(10mL/kg),药物注射剂量按照《实验动物与动物实验方法学》^[7]人与大鼠体表面积的药物等效剂量换算,注射间隔依据白藜芦醇给药后药代动力学参数^[8],1 次/天,连续 8d。模型组、对照组在相同时间注射等量生理盐水,实验对照组则给予白藜芦醇 10mg/kg 腹腔注射。

1.2.4 眼压测量 末次给药后 2h,以毛巾包裹大鼠并固定于手术台,0.5% 盐酸丙美卡因眼液滴眼表面麻醉,将眼压计笔头垂直接触大鼠右侧角膜正中,测量大鼠右侧眼压,连续测量 3 次,计算平均值。

1.2.5 视网膜铺片与 RGC 计数 眼压测量后,以颈椎脱臼法迅速处死大鼠,显微剪开大鼠球结膜,分离结膜和巩膜,断开眼外肌,取出眼球钝性分离视神经约 5mm,取 1/2 以 4% 多聚甲醛固定 2h,显微镜下去除眼前节,分离视网膜,将视网膜平铺于载玻片,自然干燥后以 75% 缓冲甘油封片,于 3h 内在荧光显微镜下观察。以距视乳沟 2mm 的上、下、左、右各 4 个视野各留 1 张照片,Image-Pro Plus 图像分析系统计数被标记的 RGC,计算 RGC 标识率, RGC 标识率(%)=每只大鼠右眼 RGC/左眼 RGC \times 100%。

1.2.6 视网膜组织相关 mRNA 相对表达量 剩余视网膜保存于-80℃ 冰箱,用时取出以超纯 RNA 提取试剂盒提出总 RNA,逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。qRT-PCR 法检测相关基因表达情况,配制 20 μ L PCR 反应体系,反应条件:95℃ 10min,95℃ 15s,58℃ 50s,58℃ 50s,45 个循环, β -actin 为内参基因,2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算目的基因相对表达量。所有样本重复检测 3 次,取平均值。引物序列见表 1。

1.2.7 视网膜组织相关蛋白相对表达量 取-80℃ 保存的视网膜组织,裂解提取蛋白,BCA 蛋白质检测进行蛋白定量,35 μ g 样本蛋白混合等体积上样,电泳后转移至 PVDF 膜,封闭液封闭,室温孵育 2h,加入 PI3K(1:800)、Akt(1:500)、bFGF(1:500)、BDNF(1:800)一抗,4℃ 过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10min,加入二抗(1:10 000),室温孵

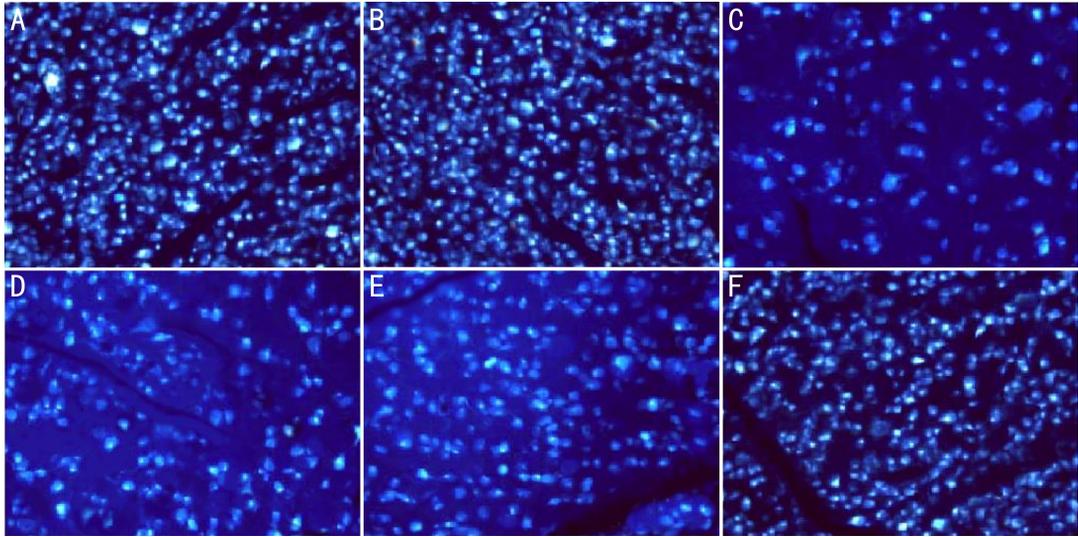


图1 荧光金逆行标记神经节细胞存活情况($\times 200$) A:对照组;B:实验对照组;C:模型组;D:低剂量组;E:中剂量组;F:高剂量组。

表1 引物序列

引物名称	引物序列
PI3K	5'-GAATTCGTAATCCTACTAGATA-3'(F);5'-TCGTTAGTGAGTCATCGAAGT-3'(R)
Akt	5'-AAGTCGATCTATGTGTATGCT-3'(F);5'-GTATCCGATGTACGTTAGAAG-3(R)
bFGF	5'-TAGCGGATATGAGCTAAGTA-3'(F);5'-AGAGATGTTATCATGTAGCC-3'(R)
BDNF	5'-TGTCACAGTTGATAATGCT-3'(F);5'-TTAAGATCTGGACGTGACTT-3'(R)
β -actin	5'-CTATATCATTCGATGCCAATGC-3'(F);5'-GTAGACATGGTTGAACTAGGC-3'(R)

育45min,加入底物显色,LabWorks软件分析蛋白条带灰度值,以目的条带与内参条带 β -actin比值表示目的蛋白的表达水平,计算p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白比值及bFGF、p-BDNF蛋白相对表达量。

统计学分析:以SPSS 25.0软件分析数据。计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-*q*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠眼压比较 末次给药后2h,各组大鼠眼压比较,差异有统计学意义($P<0.01$);与对照组及实验对照组比较,模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组眼压更高(均 $P<0.05$);与模型组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组眼压更低(均 $P<0.05$);与低剂量组比较,中剂量组与高剂量组眼压更低(均 $P<0.05$);与中剂量组比较,高剂量组眼压更低($P<0.05$);对照组与实验对照组眼压比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

2.2 各组大鼠RGC存活情况比较 各组大鼠的RGC标识率比较,差异有统计学意义($P<0.01$);与对照组及实验对照组比较,模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组RGC标识率更低(均 $P<0.05$);与模型组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组RGC标识率更高(均 $P<0.05$);与低剂量组比较,中剂量组、高剂量组RGC标识率更高(均 $P<0.05$);与中低剂量组比较,高剂量组RGC标识率更高($P<0.05$);对照组与实验对照组RGC标识率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图1,表2。

2.3 各组大鼠视网膜组织相关mRNA相对表达量比较 各组大鼠视网膜PI3K、Akt mRNA相对表达量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠视网膜bFGF、

表2 各组大鼠眼压和RGC存活情况 $\bar{x}\pm s$

组别	眼压(mmHg)	RGC标识率(%)
对照组	15.35 \pm 2.80	85.33 \pm 6.30
实验对照组	15.56 \pm 3.01	86.01 \pm 6.17
模型组	30.25 \pm 4.25 ^{a,c}	48.25 \pm 4.50 ^{a,c}
低剂量组	26.30 \pm 4.05 ^{a,c,e}	56.32 \pm 5.05 ^{a,c,e}
中剂量组	22.31 \pm 3.68 ^{a,c,e,g}	66.03 \pm 6.68 ^{a,c,e,g}
高剂量组	18.32 \pm 3.21 ^{a,c,e,g,i}	78.56 \pm 7.82 ^{a,c,e,g,i}
<i>F</i>	27.046	61.196
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:^a $P<0.05$ vs 对照组;^c $P<0.05$ vs 实验对照组;^e $P<0.05$ vs 模型组;^g $P<0.05$ vs 低剂量组;ⁱ $P<0.05$ vs 中剂量组。

BDNF mRNA相对表达量比较,差异均有统计学意义($P<0.01$);与对照组及实验对照组比较,模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组bFGF、BDNF mRNA相对表达量更低(均 $P<0.05$);与模型组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组bFGF、BDNF mRNA相对表达量更高(均 $P<0.05$);与低剂量组比较,中剂量组、高剂量组bFGF、BDNF mRNA相对表达量更高(均 $P<0.05$);与中剂量组比较,高剂量组bFGF、BDNF mRNA相对表达量更高(均 $P<0.05$),见表3。

2.4 各组大鼠视网膜组织相关蛋白相对表达量比较 各组大鼠视网膜p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白比值及bFGF、BDNF蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P<0.01$);与对照组及实验对照组比较,模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白比值及bFGF、BDNF蛋白相对表达量更低(均 $P<0.05$);与模型组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组p-PI3K/PI3K、

表3 各组大鼠视网膜组织相关 mRNA 相对表达量

组别	PI3K	Akt	bFGF	BDNF
对照组	0.70±0.12	0.75±0.15	0.60±0.10	0.66±0.10
实验对照组	0.72±0.13	0.76±0.14	0.62±0.11	0.67±0.12
模型组	0.78±0.15	0.80±0.12	0.18±0.05 ^{a,c}	0.25±0.06 ^{a,c}
低剂量组	0.74±0.12	0.83±0.15	0.25±0.05 ^{a,c,e}	0.32±0.07 ^{a,c,e}
中剂量组	0.76±0.13	0.81±0.14	0.40±0.08 ^{a,c,e,g}	0.45±0.08 ^{a,c,e,g}
高剂量组	0.74±0.14	0.79±0.13	0.50±0.07 ^{a,c,e,g,i}	0.54±0.09 ^{a,c,e,g,i}
<i>F</i>	0.501	0.459	56.996	41.258
<i>P</i>	0.735	0.765	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05 vs 对照组;^c*P*<0.05 vs 实验对照组;^e*P*<0.05 vs 模型组;^g*P*<0.05 vs 低剂量组;ⁱ*P*<0.05 vs 中剂量组。

表4 各组大鼠视网膜组织相关蛋白相对表达量

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	bFGF	BDNF
对照组	0.95±0.05	0.92±0.06	0.85±0.09	0.83±0.07
实验对照组	0.96±0.04	0.93±0.05	0.84±0.10	0.85±0.08
模型组	0.20±0.03 ^{a,c}	0.08±0.02 ^{a,c}	0.09±0.03 ^{a,c}	0.15±0.05 ^{a,c}
低剂量组	0.30±0.04 ^{a,c,e}	0.23±0.05 ^{a,c,e}	0.15±0.05 ^{a,c,e}	0.22±0.06 ^{a,c,e}
中剂量组	0.55±0.04 ^{a,c,e,g}	0.40±0.06 ^{a,c,e,g}	0.32±0.06 ^{a,c,e,g}	0.46±0.05 ^{a,c,e,g}
高剂量组	0.80±0.04 ^{a,c,e,g,i}	0.71±0.04 ^{a,c,e,g,i}	0.60±0.08 ^{a,c,e,g,i}	0.72±0.06 ^{a,c,e,g,i}
<i>F</i>	884.245	715.696	236.907	260.906
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05 vs 对照组;^c*P*<0.05 vs 实验对照组;^e*P*<0.05 vs 模型组;^g*P*<0.05 vs 低剂量组;ⁱ*P*<0.05 vs 中剂量组。

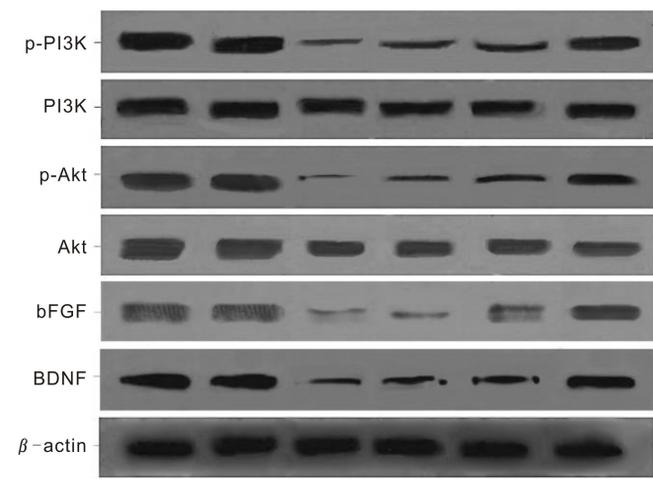


图2 各组大鼠视网膜组织相关蛋白检测结果。

p-Akt/Akt 蛋白比值及 bFGF、BDNF 蛋白相对表达量更高 (均 *P*<0.05); 与低剂量组比较, 中剂量组、高剂量组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白比值及 bFGF、BDNF 蛋白相对表达量更高 (均 *P*<0.05); 与中剂量组比较, 高剂量组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白比值及 bFGF、BDNF 蛋白相对表达量更高 (均 *P*<0.05), 见图 2, 表 4。

3 讨论

眼压升高是导致青光眼的主要危险因素, 可引起 RGC 凋亡, 视功能损害, 视野变窄, 最终导致不可逆的视觉功能丧失^[9]。目前临床对于青光眼的治疗多采用降低眼压的措施, 虽可获得一定的效果, 但不足以防治 RGC 损伤和凋亡。RGC 的损伤、凋亡与氧化应激、生长因子、凋亡因子水平失衡等多种因素有关。研究证实, 调节相关因子可抑制

RGC 凋亡, 改善视神经功能^[10], 但尚未出现疗效确切稳定的视神经保护药物抑制 RGC 损伤, 防止视力进一步下降。因此, 寻求一种有效的 RGC 保护药物, 对于青光眼的治疗具有重要意义。

白藜芦醇是葡萄、蓝莓、蔓越莓等植物在受刺激时产生的抗毒素, 为非黄酮类多酚化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗癌、免疫调节、抗菌及保护心血管的作用。研究发现, 白藜芦醇能逆转癌细胞的多重耐药, 增加癌细胞对标准化疗药物的敏感性, 发挥抗癌作用^[11]。陈欢等^[12]研究证实, 白藜芦醇能减轻氧化应激造成的神经细胞凋亡, 发挥神经保护作用。庞博等^[13]认为, 白藜芦醇可减轻丙泊酚所致大鼠神经元损伤。以上研究说明, 白藜芦醇具有神经功能保护作用。本研究结果中, 与模型组比较, 低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠眼压更低, RGC 标识率更高; 与低剂量组比较, 中剂量组与高剂量组眼压更低, RGC 标识率更高; 与中剂量组比较, 高剂量组眼压更低, RGC 标识率更高, 提示白藜芦醇能降低青光眼大鼠眼压, 抑制 RGC 凋亡, 与既往研究观点一致。

细胞凋亡涉及 DNA 片段的断裂与蛋白的表达, 此过程受细胞内信号转导通路的影响。PI3K/Akt 信号通路是细胞存活的重要信号通路, 对于维持细胞生长和存活、诱导细胞凋亡、促进血管新生具有重要作用^[14]。PI3K 为 T 淋巴细胞内重要的信号转导因子, 能经催化底物磷脂酰肌醇被磷酸化激活, 将活化的信号传入细胞内^[15]。Akt 不仅是 PI3K 的下游靶蛋白, 还是细胞存活信号通路的枢纽酶, 可传递生长因子等细胞外刺激信号, 在细胞受到外界因子刺激时, Akt 被磷酸化激活后进入细胞核, 通过多种途径磷酸化其下游蛋白, 发挥抗凋亡作用^[16]。磷酸化的 Akt 能激活下游 Fas 死亡受体通路, 将细胞外死亡信号传

递至细胞内,启动细胞凋亡程序^[17]。赖文芳等^[18]研究证实,通过提高 PI3K、Akt 蛋白的表达可减轻脑卒中大鼠神经细胞凋亡。bFGF、BDNF 是神经营养因子,能促进神经细胞与其轴突的生长,增加突触的可塑性和神经发生,通过增加视网膜内 bFGF、BDNF 水平,提高 RGC 存活率^[19-20]。研究证实,提高大鼠海马 CA1 区 BDNF 和 bFGF 的蛋白表达水平能促进神经元的恢复^[21]。本研究结果中,与模型组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组视网膜 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白比值及 bFGF、BDNF 蛋白相对表达量更高;与低剂量组比较,中剂量组与高剂量组视网膜 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白比值及 bFGF、BDNF 蛋白相对表达量更高;与中剂量组比较,高剂量组视网膜 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白比值及 bFGF、BDNF 蛋白相对表达量更高。以上分析与结果说明,白藜芦醇能降低青光眼大鼠眼内压,抑制 RGC 凋亡,其机制可能与上调 PI3K、Akt 蛋白磷酸化与 bFGF、BDNF 基因及蛋白的表达有关。

综上所述,白藜芦醇能抑制青光眼大鼠 RGC 的凋亡,减轻视神经损伤,其机制可能与上调 PI3K/Akt 信号通路中相关蛋白的磷酸化及视神经保护作用因子基因与蛋白的表达有关。在今后青光眼治疗相关药物研发中,可将白藜芦醇纳入选择标准。

参考文献

- Williams PA, Harder JM, John SWM. Glaucoma as a Metabolic Optic Neuropathy: Making the Case for Nicotinamide Treatment in Glaucoma. *J Glaucoma* 2017; 26(12): 1161-1168
- Nie XG, Fan DS, Huang YX, et al. Downregulation of microRNA-149 in retinal ganglion cells suppresses apoptosis through activation of the PI3K/Akt signaling pathway in mice with glaucoma. *Am J Physiol Cell Physiol* 2018; 315(6): C839-C849
- Chen Q, Xi X, Zeng Y, et al. Acteoside inhibits autophagic apoptosis of retinal ganglion cells to rescue glaucoma-induced optic atrophy. *J Cell Biochem* 2019; 120(8): 13133-13140
- Wan P, Su W, Zhang Y, et al. Trimetazidine protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/Ho-1 pathway. *Clin Sci (Lond)* 2017; 131(18): 2363-2375
- Seong H, Ryu J, Yoo WS, et al. Resveratrol Ameliorates Retinal Ischemia/Reperfusion Injury in C57BL/6J Mice via Downregulation of Caspase-3. *Curr Eye Res* 2017; 42(12): 1650-1658
- 蔺雪静, 王铮华, 王大博, 等. 烧灼大鼠表层巩膜静脉法诱导慢性青光眼模型的研究. *中华实验眼科杂志* 2004; 22(6): 598-600

- 李凤奎, 王纯耀. 实验动物与动物实验方法学. 郑州: 河南医科大学出版社 2007: 8-10
- 梁力. 乙酰化白藜芦醇和白藜芦醇在 SD 大鼠体内药代动力学研究. 第四军医大学 2012
- Pang JJ, Frankfort BJ, Gross RL, et al. Elevated intraocular pressure decreases response sensitivity of inner retinal neurons in experimental glaucoma mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(8): 2593-2598
- Osborne A, Sanderson J, Martin KR. Neuroprotective Effects of Human Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Derived Growth Factor on Human Retinal Ganglion Cells. *Stem Cells* 2018; 36(1): 65-78
- Wang S, Meng Q, Xie Q, et al. Effect and mechanism of resveratrol on drug resistance in human bladder cancer cells. *Mol Med Rep* 2017; 15(3): 1179-1187
- 陈欢, 李昭, 赵爽, 等. 白藜芦醇对紫杉醇诱发神经痛的影响及其与磷酸肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路的关系. *中华实验外科杂志* 2017; 34(12): 2197-2200
- 庞博, 孙雪峰. 白藜芦醇对丙泊酚所致大鼠神经元损伤的保护作用研究. *海南医学院学报* 2018; 24(3): 289-292
- Zheng H, Liu JF. Studies on the relationship between PI3K/AKT signal pathway-mediated MMP-9 gene and lung cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(4): 753-759
- Zhao Y, Wang M, Li Y, et al. Andrographolide attenuates viral myocarditis through interactions with the IL-10/STAT3 and PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathways. *Exp Ther Med* 2018; 16(3): 2138-2143
- Rocco ML, Balzamino BO, Esposito G, et al. NGF/anti-VEGF combined exposure protects RCS retinal cells and photoreceptors that underwent a local worsening of inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017; 255(3): 567-574
- 刘菊梅, 梁丽, 黄思夏, 等. 抑癌基因 PRDM1 在结外 NK/T 细胞淋巴瘤-鼻型中的表达及其与 PI3K/AKT 通路活化的关系. *中华血液学杂志* 2018; 39(12): 1010-1016
- 赖文芳, 洪海棉, 张小琴, 等. 红景天苷通过激活 PI3K/AKT/NRF2 通路减轻 MCAO 大鼠的神经细胞凋亡. *中华中医药杂志* 2016; 31(5): 1883-1886
- 熊淑毓, 马明明, 顾青, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对 N-甲基-D-天冬氨酸诱导大鼠视网膜神经节细胞层损伤的保护作用. *上海医学* 2014; 37(3): 213-216
- Uzel MM, Elgin U, Boral B, et al. The effect of trabeculectomy on serum brain-derived neurotrophic factor levels in primary open-angle glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2018; 256(6): 1173-1178
- 张晋霞, 伞云琨, 李晶, 等. 养血清脑颗粒对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 BDNF 和 bFGF 蛋白表达的影响. *世界科学技术-中医药现代化* 2015; 17(11): 2246-2251