

牡荆苷对大鼠视网膜缺血-再灌注损伤模型中神经节细胞的保护作用

李漫丽 范珂 崔红培

河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所, 郑州 450003

通信作者: 范珂, 邮箱: fanke1972@126.com

【摘要】 目的 探讨牡荆苷对大鼠视网膜缺血-再灌注(RIR)引起的视网膜神经节细胞(RGCs)氧化应激损伤的保护作用及其可能的作用机制。**方法** 将 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠按照随机数字表法随机分为正常对照组、模型组和牡荆苷组,均以右眼为实验眼。模型组和牡荆苷组大鼠采用前房灌注方法建立 RIR 模型,牡荆苷组大鼠建模后每日按照 25 mg/kg 剂量腹腔内注射牡荆苷生理盐水溶液,模型组大鼠腹腔内注射相同剂量的生理盐水,连续给药 7 d。正常对照组大鼠右眼仅行前房穿刺而不升高眼压,同时腹腔内注射相同剂量的生理盐水。造模后 7 d 过量麻醉法处死大鼠,采用组织病理学染色法检测大鼠视网膜厚度和 RGCs 数量,采用逆行荧光金染色标记法检测 RGCs 密度,采用 TUNEL 染色法检测 RGCs 凋亡情况,采用比色法检测视网膜组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)浓度,采用 Western blot 法检测大鼠视网膜组织细胞质 Nrf2、血红素加氧酶-1(HO-1)、NQO1、细胞核 Nrf2 蛋白表达。**结果** 模型组大鼠视网膜厚度为(90.21±3.55) μm,明显低于正常对照组的(128.20±5.31) μm 和牡荆苷组的(119.65±6.14) μm,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。模型组单位面积 RGCs 数量为(1300.85±14.00)个/mm²,明显低于正常对照组的(2330.12±15.05)个/mm² 和牡荆苷组的(1921.64±11.78)个/mm²,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。模型组 TUNEL 阳性 RGCs 比率为(68.34±5.04)%,明显高于正常对照组的(3.01±0.18)%和牡荆苷组的(35.51±2.04)%,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。模型组大鼠视网膜组织中 SOD 活性明显低于正常对照组和牡荆苷组,MDA、NO 摩尔浓度明显高于正常对照组和牡荆苷组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。模型组大鼠视网膜组织中细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量明显低于正常对照组,HO-1、NQO1 和细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);牡荆苷组大鼠视网膜组织中细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量明显低于模型组和正常对照组,HO-1、NQO1 和细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量明显高于模型组和正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 牡荆苷能减少 RGCs 凋亡,缓解 RIR 引起的大鼠视网膜氧化应激损伤,这一作用可能是通过活化 Nrf2 相关信号通路而实现的。

【关键词】 视网膜缺血-再灌注; 牡荆苷; 氧化应激; Nrf2 信号通路; 大鼠

基金项目: 河南省科技研发专项项目(172102310094)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200509-00319

Protective effect of vitexin on retinal ganglion cells in rat retinal ischemia-reperfusion injury model

Li Manli, Fan Ke, Cui Hongpei

Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Institute, Henan Eye Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Fan Ke, Email: fanke1972@126.com

[Abstract] Objective To explore the protective effect of vitexin on retinal ganglion stem cells (RGCs) from oxidative stress caused by retinal ischemia-reperfusion (RIR) in rats and its possible mechanism. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into the model group, vitexin group and normal control group by random number table, with 20 rats in each group. The right eyes were taken as experimental eyes. Rats in the model group and the vitexin group were treated with anterior chamber perfusion to establish RIR models. Rats in the vitexin group were given intraperitoneal injection of vitexin at a dose of 25 mg/(kg · d) for 7 days. Rats in the model group were intraperitoneally injected with the same volume of normal saline. For the normal control group, the experimental eyes underwent anterior chamber puncture without increasing the intraocular pressure, and were intraperitoneally injected with the same volume of normal saline. On the 7th day following modeling, the rats were sacrificed by overdose anesthesia. Histopathology staining was used to detect the thickness of retina and the number of RGCs. Retrograde

tracing with Fluoro-Gold was used to detect the density of RGCs. TUNEL staining was used to detect the apoptosis of RGCs. Colorimetric method was used to detect superoxide dismutase (SOD) activity and concentration of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO). Western blot method was used to detect the relative expression levels of cytoplasmic Nrf2, HO-1, NQO1, nuclear Nrf2 proteins in rat retina. The use and care of animals followed the ARVO Statement. This study protocol was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Henan Eye Hospital (No. HNEECA-2019-04). **Results** The retinal thickness was $(90.21 \pm 3.55) \mu\text{m}$ in the model group, which was significantly lower than $(128.20 \pm 5.31) \mu\text{m}$ in the normal control group and $(119.65 \pm 6.14) \mu\text{m}$ in the vitexin group, and the differences were statistically significant (both at $P < 0.05$). The average density of RGCs was $(1\ 300.85 \pm 14.00)/\text{mm}^2$ in the model group, which was significantly lower than $(2\ 330.12 \pm 15.05)/\text{mm}^2$ in the normal control group and $(1\ 921.64 \pm 11.78)/\text{mm}^2$ in the vitexin group, and the differences were statistically significant (both at $P < 0.05$). The rate of TUNEL positive RGCs was $(68.34 \pm 5.04)\%$ in the model group, which was significantly higher than $(3.01 \pm 0.18)\%$ in the normal control group and $(35.51 \pm 2.04)\%$ in the vitexin group, and the differences were statistically significant (both at $P < 0.05$). Compared with the normal control group and the vitexin group, the SOD activity in the retinal tissue of the rats was lower and the concentrations of MDA and NO were higher in the model group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The expression level of cytoplasmic Nrf2 protein was the lowest in the vitexin group, then following the model group and the normal control group, and the relative expression levels of HO-1, NQO1 and nuclear Nrf2 protein were the highest in the vitexin group, then followed the model group and normal control group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Vitexin can reduce the apoptosis of RGCs and alleviate oxidative stress damage of retina in RIR rat model. This protective effect may be achieved by activating Nrf2-related signaling pathway.

[Key words] Retinal ischemia-reperfusion; Vitexin; Oxidative stress; Nrf2 signaling pathway; Rats

Fund program: Henan Province Science and Technology R&D Special Project (172102310094)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200509-00319

视网膜缺血-再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIR) 是一种复杂的病理过程, 多见于糖尿病视网膜病变、急性闭角型青光眼、视网膜中央动静脉阻塞等缺血性眼部疾病^[1]。研究表明, 视网膜缺血-再灌注过程中, 由于机体抗氧化系统的不平衡, 如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性的降低, 导致细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 过度堆积, 诱发视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 凋亡, 导致大鼠视力不可逆丧失^[3-4]。牡荆苷是金莲花、红草等毛茛科植物的有效成分, 属于黄酮碳苷类化合物, 难溶于水。研究证实, 牡荆苷对脑缺血-再灌注大鼠神经功能具有保护作用, 可能与调节辅助性 T 淋巴 (helper T lymphocyte, Th) 1/Th2 细胞平衡向 Th2 漂移、减轻脑细胞 DNA 损伤有关^[5]。牡荆苷还可减轻急性脑缺血再灌注大鼠氧化应激反应, 推测与调控核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 信号通路, 上调 Nrf2 的基因和蛋白表达, 增强机体的抗氧化应激反应能力有关^[6]。然而, 牡荆苷对 RIR 引起的氧化应激损伤是否有保护作用, 目前尚未见报道。本研究探讨牡荆苷对 RIR 模型大鼠视网膜的保护作用及其抗氧化机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 3 月龄, 体质量 $(220 \pm 10) \text{g}$, 购于北京维通利华公司, 饲养于郑州大学动物实验中心, 室温 $20 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 $50\% \sim 65\%$, 12 h 明暗交替。动物饲养及实验过程遵循 ARVO 要求, 本研究经河南省立眼科医院实验动物伦理委员会审核批准 (批文号: HNEECA-2019-04)。

1.1.2 主要试剂及仪器 牡荆苷标准品 (质量分数 $\geq 99\%$, 中国国家药品生物制品研究所); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、SOD 检测试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); TUNEL 检测试剂盒、苏木精-伊红检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 核蛋白提取试剂盒 (美国 Sigma 公司); 托吡卡胺滴眼液 (北京华润双鹤药业股份有限公司); 荧光金 (美国 Fluorochrome 公司); 兔抗大鼠 Nrf2 多克隆抗体 (PA5-68817)、兔抗大鼠血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 单克隆抗体 (PA5-77833)、兔抗大鼠醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1) 单克隆抗体 (39-3700) (美国 Invitrogen 公司); 荧光标记山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (ab205719, 英国 Abcam 公司)。Tono-penXL 眼压计

(美国 Reichert 公司); 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 RIR 模型建立 实验大鼠腹腔内注射质量分数 10% 的水合氯醛(400 mg/kg)行全身麻醉,均取右眼造模,质量分数 1% 地卡因点眼行表面麻醉,托吡卡胺滴眼液扩瞳,固定头部,将输液器一端连接含无菌生理盐水的输液瓶,另一端连接 32G 胰岛素针头,取胰岛素针头平行于大鼠身体纵轴,沿眼眶侧角膜缘穿刺进入前房,打开输液器开关,将输液瓶缓慢升高 150 cm,用 Tono-penXL 眼压计测量眼压为 110 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),此压力与大鼠体循环收缩压接近;维持此高压 1 h 后将输液瓶缓慢降低至与动物眼球高度平齐,拔出针头,恢复视网膜供血。术后眼表涂抹红霉素软膏 1 次。

1.2.2 实验分组及处理 将 60 只实验大鼠按照随机数字表法随机分为正常对照组、模型组和牡荆苷组,每组 20 只,均以右眼为实验眼。取模型组和牡荆苷组大鼠按照 1.2.1 方法建立 RIR 模型。将牡荆苷标准品用 N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)生理盐水溶液(DMF:生理盐水 = 1:20)溶解配制成质量浓度为 5.0 mg/ml 的牡荆苷溶液。取牡荆苷组大鼠于造模后按照 25 mg/kg 剂量腹腔内注射牡荆苷溶液,每日注射 1 次,连续给药 7 d^[7]。取模型组大鼠腹腔内注射相同剂量的 DMF 生理盐水溶液。取正常对照组大鼠右眼行前房穿刺而不升高眼压,同时腹腔内注射相同剂量的 DMF 生理盐水溶液。

1.2.3 视网膜组织病理学观察 造模后第 7 天,各组中任意选取 5 只大鼠,用质量分数 10% 的水合氯醛(400 mg/kg)腹腔内注射行全身麻醉,摘除实验眼并置于质量分数 10% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,去除眼前节组织及晶状体后,常规脱水、透明,石蜡包埋,行视网膜矢状面 5 μm 厚石蜡切片,常规苏木精-伊红染色,倒置显微镜下观察视网膜组织结构,采用图像分析系统采集图像,应用 Image-Pro-Plus 6.0 分析系统测定大鼠视网膜厚度。每组随机选取 5 只大鼠的切片观察 RGCs 形态和 RGCs 层至外核层视网膜厚度,每张切片随机选取 5 个视野,取平均值。

1.2.4 逆行荧光金染色标记法检测视网膜 RGCs 密度 造模后第 7 天,各组中任意选取 5 只大鼠,将大鼠麻醉后剪开颞侧球结膜,剪断外直肌,充分暴露视神经,于球后 2 mm 处剪断视神经,将有荧光金染料的明胶海绵置于视神经断端。标记 40 h 后,用水合氯醛腹腔内注射处死大鼠,取出眼球,剥离视网膜,制备视网

膜铺片,将视网膜进行 4 个象限的放射状切开,荧光倒置显微镜绿色光源下观察荧光金标记的 RGCs 并采集图像。用 Image-Pro-Plus 6.0 分析系统计算 RGCs 密度(个/mm²)。每个视网膜标本选取中心 1、2 和 3 mm 处 4 个象限共 12 个 200 倍视野进行 RGCs 密度计算,取平均值。

1.2.5 TUNEL 染色法检测视网膜 RGCs 凋亡情况 取 1.2.3 部分制作的各组 5 只大鼠视网膜石蜡切片常规方法脱水,每张切片滴加 50 μl 体积分数 3% 过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min,去离子水冲洗 3 遍,蛋白酶 K 于湿盒中室温孵育 30 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)漂洗 2 次,每次 3 min;滴加 50 μl TUNEL 反应液,湿盒中室温孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;滴加 50 μl conberter-POD,湿盒中室温孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。滴加 100 μl BAD 溶液,室温孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。正常 RGCs 核染色呈蓝色,凋亡 RGCs 核染色呈棕黄色。于光学显微镜下观察并拍照,每张切片中任意选取 5 个 200 倍视野,应用 Image-Pro-Plus 6.0 分析系统计数 TUNEL 阳性细胞和正常细胞,取平均值,计算 RGCs 凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数/正常细胞数 × 100%。

1.2.6 大鼠视网膜组织中 SOD 活性、MDA 和 NO 浓度检测 于造模后第 7 天,各组中任意选取 5 只大鼠,过量麻醉法处死后,摘取实验眼并分离出视网膜组织。取视网膜组织,加入视网膜组织质量 5~10 倍体积提取液进行冰浴匀浆制成细胞悬液,离心半径为 3 cm, 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液。(1) SOD 活性测定 取 3 μl 视网膜组织上清液用 PBS 稀释至 150 μl,参照 SOD 活性检测试剂盒说明书配制试剂,将试剂与待测样本混匀,37 °C 孵育 20 min, BCA 法测定蛋白质含量,应用酶标仪于 589 nm 波长处测吸光度(A)值,计算 SOD 活性(U/L, U 为商品单位), SOD 活性 = [(A_{待测样本} - A_{空白对照}) × 标准品浓度 × 24] / [(A_{标准品} - A_{空白对照}) × 待测样本蛋白浓度 × 50]。(2) MDA 摩尔浓度测定 取 5 μl 视网膜组织上清液用 PBS 稀释到 10 μl,按照 MDA 试剂盒说明书配置试剂,将试剂与待测样本混匀,95 °C 水浴 40 min,流水冷却,离心半径为 3 cm, 3 000 r/min 离心 10 min 取上清液, BCA 法测定蛋白质含量,应用酶标仪于 530 nm 波长处检测 A 值,计算 MDA 摩尔浓度(μmol/L), MDA 摩尔浓度 = [(A_{待测样本} - A_{空白对照}) × 标准品摩尔浓度 × 2] / [(A_{标准品} - A_{空白对照}) × 待测样本蛋白浓度]。(3) NO 摩尔浓度测定 取 5 μl 视网膜组织上清

液,按照 NO 试剂盒说明书配置试剂,将试剂与待测样本混匀,检测 589 nm 波长处 A 值,计算 NO 含量 ($\mu\text{mol/L}$),NO 摩尔浓度 = $140 \times (A_{589} + 0.0103)$ 。

1.2.7 Western blot 法检测大鼠视网膜组织细胞质 Nrf2、HO-1、NQO1 以及细胞核 Nrf2 蛋白表达 取 1.2.6 部分收集的视网膜组织,用预冷去离子水冲洗,滤纸吸干水分,置于液氮中迅速冷冻,后转移至超低温冰箱冻存。取冻存的大鼠视网膜组织标本,加入 5~10 倍体积的提取液进行冰浴匀浆, $10\,000 \times g$, 4°C 离心 15 min,取上清,置冰上待测。 $3\,000\text{ r/min}$ 离心 3 min(离心半径为 3 cm),收集沉淀,加入 200 μl 蛋白抽提试剂,高速涡旋使细胞沉淀分散成单细胞悬液, $3\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min(离心半径 3 cm),上清液中即为细胞质蛋白,采用冻干仪对上清液蛋白进行浓缩,按照核蛋白提取试剂盒说明书步骤,加入 200 μl 核蛋白提取试剂,高速涡旋 30 s, $3\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min(离心半径为 3 cm),上清液中即为核蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,再电转移至 PVDF 膜上,用质量分数 0.5% 的脱脂乳粉 PBS 溶液室温封闭 1 h,充分洗涤后分别加入 Nrf2 (1:1 000)、HO-1 (1:1 000)、NQO1 (1:1 000) 一抗 4°C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;加入相应二抗 (1:5 000) 常温孵育 30 min, ECL 显色,细胞质蛋白以 GAPDH 为内参,细胞核蛋白以 H3 为内参,采用 ImageJ 软件分析各蛋白条带灰度,计算各目的蛋白相对表达量。每组实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,组间资料经 Levene 检验证实方差齐性。各组间不同指标总体差异比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠视网膜组织病理学表现

正常对照组大鼠视网膜组织中 RGCs 排列紧密,核边界清晰;模型组大鼠 RGCs 排列疏松不规则,部分细胞核出现溶解或破碎样;牡荆苷组大鼠视网膜中 RGCs 异常程度较模型组减轻(图 1)。正常对照组、模型组和牡荆苷组视网膜厚度分别为 (128.20 ± 5.31)、

(90.21 ± 3.55) 和 (119.65 ± 6.14) μm ,各组视网膜厚度总体比较,差异有统计学意义 ($F = 8.344, P = 0.011$);其中模型组大鼠视网膜厚度明显低于正常对照组和牡荆苷组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

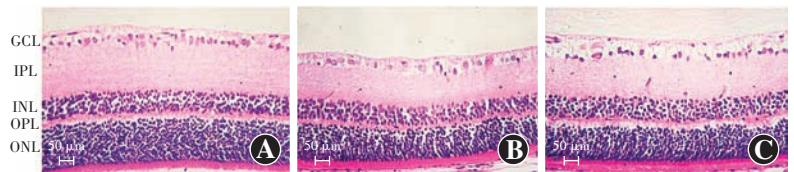


图 1 各组大鼠造模后 7 d 视网膜组织病理学表现 (HE $\times 200$, 标尺 = 50 μm) 正常对照组大鼠视网膜组织中 RGCs 排列紧密,核边界清晰,模型组大鼠 RGCs 排列疏松不规则,部分细胞核出现溶解或破碎样,牡荆苷组大鼠视网膜中 RGCs 异常程度较模型组减轻 A:正常对照组 B:模型组 C:牡荆苷组 GCL:神经节细胞层; IPL:内丛状层; INL:内核层; OPL:外网状层; ONL:外核层

Figure 1 Histopathological manifestations of rat retina in each group at 7 days after modeling (HE $\times 200$, scale bar = 50 μm) RGCs in the normal control group were tightly arranged with clear nuclear boundaries, while the RGCs in the model group were arranged loosely and irregularly, and some of the nuclei were dissolved or broken, and the abnormality of RGCs in the vitexin group was alleviated A: normal control group B: model group C: vitexin group GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; ONL: outer nuclear layer

2.2 各组大鼠视网膜 RGCs 数量比较

视网膜逆行荧光金标记结果显示,在造模后 7 d,正常对照组、模型组和牡荆苷组大鼠视网膜单位面积 RGCs 数量分别为 ($2\,330.12 \pm 15.05$)、($1\,300.85 \pm 14.00$) 和 ($1\,921.64 \pm 11.78$) 个/ mm^2 ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 21.034, P < 0.001$);模型组单位面积 RGCs 数量低于正常对照组和牡荆苷组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);牡荆苷组大鼠视网膜 RGCs 单位面积数量与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。

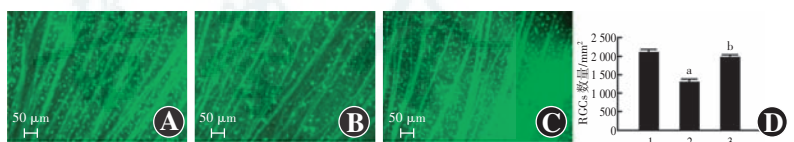


图 2 各组大鼠造模后 7 d 视网膜 RGCs 数量 (荧光金 $\times 200$, 标尺 = 50 μm) A:正常对照组大鼠 RGCs 分布密集 B:模型组大鼠 RGCs 分布稀疏 C:牡荆苷组大鼠 RGCs 数量较模型组有所增加 D:各组大鼠 RGCs 数量量化比较 $F = 21.034, P < 0.001$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.05$;与模型组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 5$) 1:正常对照组;2:模型组;3:牡荆苷组 RGCs:视网膜神经节细胞

Figure 2 The number of RGCs in different groups at 7 days after modeling (Fluoro-Gold $\times 200$, scale bar = 50 μm) A: The distribution of RGCs in the retina of rats in the control group was dense B: The distribution of RGCs in the model group was sparse C: The number of RGCs was increased in the vitexin group in comparison with the model group D: Quantitative comparison of the number of RGCs among different groups $F = 21.034, P < 0.001$. Compared with the normal control group, $^a P < 0.05$; compared with the model group, $^b P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 5$) 1: normal control group; 2: model group; 3: vitexin group RGCs: retinal ganlion cells

2.3 各组大鼠 TUNEL 阳性 RGCs 比率比较

造模后 7 d, 正常对照组大鼠视网膜组织 TUNEL 阳性细胞数量较少, 模型组存在大量 TUNEL 阳性细胞, 牡荆苷组 TUNEL 阳性细胞数较模型组有所减少。正常对照组、模型组和牡荆苷组 TUNEL 阳性 RGCs 比率分别为 (3.01 ± 0.18)%、(68.34 ± 5.04)% 和 (35.51 ± 2.04)%, 总体比较差异有统计学意义 (F = 30.205, P < 0.001)。模型组 TUNEL 阳性 RGCs 比率明显高于正常对照组和牡荆苷组, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05) (图 3)。

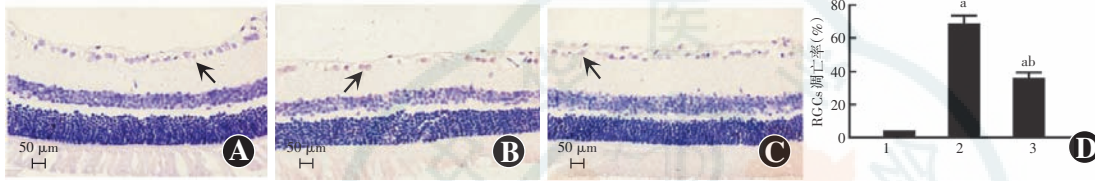


图 3 各组大鼠造模后 7 d RGCs 凋亡情况 (TUNEL × 200, 标尺 = 50 μm) A: 正常对照组大鼠视网膜组织 TUNEL 阳性细胞 (箭头) 数量较少 B: 模型组大鼠视网膜组织中存在大量 TUNEL 阳性细胞 (箭头) C: 牡荆苷组大鼠视网膜组织 TUNEL 阳性细胞 (箭头) 数量较模型组有所减少 D: 各组大鼠 RGCs 凋亡率量化比较 F = 30.205, P < 0.001。与正常对照组比较, ^aP < 0.05; 与模型组比较, ^bP < 0.05 (单因素方差分析, LSD-t 检验, n = 5) 1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 牡荆苷组 RGCs: 视网膜神经节细胞

Figure 3 The TUNEL positive RGCs among different groups at 7 days after modeling (TUNEL × 200, scale bar = 50 μm)

A: The number of TUNEL positive cells (arrow) in retina of the control group was small B: The number of TUNEL positive cells (arrow) in the retina of model group was large C: The number of TUNEL positive cells (arrow) in the vitexin group was smaller than that in the model group D: Quantitative comparison of rat RGCs apoptosis rate among different groups F = 30.205, P < 0.001. Compared with the normal control group, ^aP < 0.05; compared with the model group, ^bP < 0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test, n = 5) 1: normal control group; 2: model group; 3: vitexin group RGCs: retinal ganglion cells

2.4 各组大鼠视网膜组织中氧化应激反应指标表达比较

造模后 7 d, 正常对照组、模型组和牡荆苷组大鼠视网膜中 SOD 活性及 MDA、NO 摩尔浓度总体比较差异均有统计学意义 (F = 11.054、5.347、15.021, 均 P < 0.001)。模型组大鼠视网膜组织中 SOD 活性低于正

常对照组和牡荆苷组, MDA 和 NO 摩尔浓度高于正常对照组和牡荆苷组, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05) (表 1)。

2.5 各组大鼠视网膜组织中 Nrf2 信号通路相关蛋白表达比较

造模后 7 d, 正常对照组大鼠视网膜组织细胞质 Nrf2 蛋白条带灰度在 3 个组中最强, HO-1、NQO1 和细胞核 Nrf2 蛋白条带灰度在 3 个组中最弱; 牡荆苷组细胞质 Nrf2 蛋白条带灰度在 3 个组中最弱, HO-1、NQO1 和细胞核 Nrf2 蛋白条带灰度在 3 个组中最强。正常

对照组、模型组和牡荆苷组大鼠视网膜中细胞质 Nrf2、HO-1、NQO1 和细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (F = 8.579、6.347、10.523、12.021, 均 P < 0.001)。模型组大鼠视网膜组织中细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量明显低于正常对照组, HO-1、NQO1 和细胞核

Nrf2 蛋白相对表达量高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05); 牡荆苷组大鼠视网膜组织中细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量明显低于模型组和正常对照组, HO-1、NQO1 和细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量明显高于模型组和正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05) (图 4, 表 2)。

表 1 各组大鼠视网膜 SOD 活性、MDA 和 NO 浓度比较 (mean ± SD)
Table 1 Comparison of SOD activity, MDA and NO concentration among different groups (mean ± SD)

组别	样本量	SOD 活性 (U/L)	MDA 浓度 (μmol/L)	NO 浓度 (μmol/L)
正常对照组	5	152.35 ± 13.24	5.11 ± 0.54	14.34 ± 1.61
模型组	5	106.44 ± 11.32 ^a	8.69 ± 0.76 ^a	35.68 ± 1.95 ^a
牡荆苷组	5	133.25 ± 10.36 ^{ab}	6.08 ± 0.52 ^{ab}	18.36 ± 1.02 ^{ab}
F 值		11.054	5.347	15.021
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与正常对照组比较, ^aP < 0.05; 与模型组比较, ^bP < 0.05 (单因素方差分析, LSD-t 检验) SOD: 超氧化物歧化酶; MDA: 丙二醛; NO: 一氧化氮
Note: Compared with the normal control group, ^aP < 0.05; compared with the model group, ^bP < 0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test) SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde; NO: nitric oxide

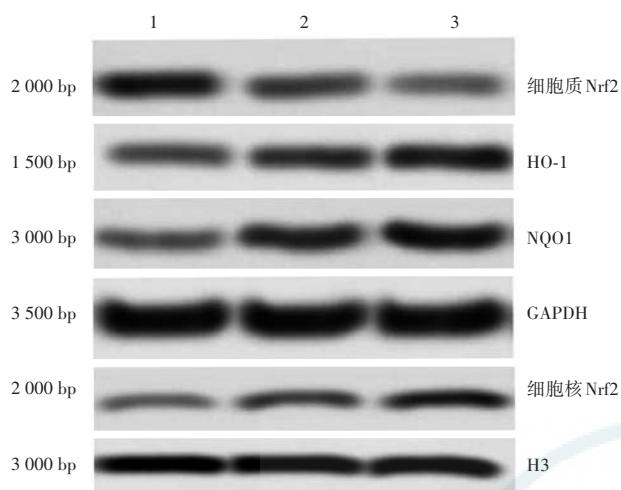


图 4 Western blot 检测各组大鼠视网膜细胞质 Nrf2、HO-1、NQO1 及细胞核 Nrf2 蛋白表达 1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 牡荆苷组 Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2; HO-1: 血红素加氧酶-1; NQO1: 醌氧化还原酶 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 4 The expression of cytoplasm Nrf2, HO-1, NQO1 and nucleus Nrf2 protein in the retina of rats in three groups by Western blot 1: normal control group; 2: model group; 3: vitexin group Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2; HO-1: heme oxygenase-1; NQO1: quinone oxidoreductase 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 2 各组大鼠视网膜 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白相对表达量比较 (mean±SD)
Table 2 Comparison of Nrf2, HO-1 and NQO1 protein relative expression in the retina of rats among the three groups (mean±SD)

组别	样本量	细胞质 Nrf2	HO-1	NQO1	细胞核 Nrf2
正常对照组	5	0.85±0.11	0.38±0.08	0.28±0.05	0.21±0.05
模型组	5	0.59±0.07 ^a	0.62±0.10 ^a	0.68±0.08 ^a	0.52±0.09 ^a
牡荆苷组	5	0.24±0.04 ^{ab}	0.91±0.12 ^{ab}	0.86±0.09 ^{ab}	0.83±0.14 ^{ab}
F 值		8.579	6.347	10.523	12.021
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与正常对照组比较, ^aP<0.05; 与模型组比较, ^bP<0.05 (单因素方差分析, LSD-t 检验); Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2; HO-1: 血红素加氧酶-1; NQO1: 醌氧化还原酶 1

Note: Compared with the normal control group, ^aP<0.05; compared with the model group, ^bP<0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test); Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2; HO-1: heme oxygenase-1; NQO1: quinone oxidoreductase 1

3 讨论

视网膜是一种高度分化的神经组织, 其内层组织供血来自视网膜中央动脉, 对缺氧、缺血非常敏感。视网膜富含不饱和脂肪酸, 易受自由基攻击, 当视网膜缺血时, 氧自由基大量积聚, 过量的自由基使组织内不饱和脂肪酸过氧化, 形成脂质过氧化产物, 继而破坏线粒体功能, 导致 RGCs 的变性和凋亡, 损害视网膜组织结构和功能^[8-9]。SOD 是机体抗氧化防御体系中最重要自由基清除酶之一, 可缓解机体氧化应激损伤^[10]。MDA 作为自由基与不饱和脂肪酸发生脂质过氧化时

的主要代谢产物, 其浓度反映了机体遭受自由基攻击的严重程度^[11]。NO 是精氨酸在一氧化氮合酶催化下生成的内源性产物, 过量的 NO 和组织中超氧化阴离子反应, 生成氧化能力强的 ONOO⁻, 进而损伤 DNA, 诱导 RGCs 凋亡^[12]。本研究应用前房灌注方法建立大鼠 RIR 动物模型, 模型组大鼠视网膜内层厚度和 RGCs 数量较正常对照组减少, RGCs 凋亡率增加, SOD 活性下降, MDA 和 NO 浓度较正常对照组增加, 说明大鼠 RIR 动物模型建立成功。

牡荆苷属于黄酮类化合物, 是金莲花、红草等的主要药效成分, 其在多种情况下对氧化应激损伤有调控作用。刘磊等^[6]研究证实, 牡荆苷可减轻急性脑缺血-再灌注大鼠氧化应激反应造成的脑组织损伤; Nurdiana 等^[13]报道, 牡荆苷可缓解糖尿病大鼠脑组织的氧化应激损伤; Xie 等^[14]报道, 牡荆苷能减轻骨关节炎大鼠内质网应激引发的软骨细胞凋亡和相关炎症, 并抑制软骨变性。然而牡荆苷是否对 RIR 具有调控作用, 目前报道较少。本研究采用腹腔内注射牡荆苷治疗 RIR 模型大鼠, 结果显示, 牡荆苷能显著改善模型大鼠视网膜厚度, 减少 RGCs 凋亡, 恢复 RGCs 数量, 同时, 牡荆苷能上调大鼠视网膜组织内 SOD 活性, 降低 MDA 和 NO 浓度, 提示牡荆苷能缓解 RIR 引起的 RGCs 损伤, 这种作用可能是通过上调视网膜组织抗氧化应激能力而实现的。

为了进一步探讨牡荆苷缓解 RIR 氧化应激损伤的作用机制, 本研究检测了其视网膜组织中 Nrf2 信号通路活性的影响。Nrf2 是一种与细胞自我保护相关的转录因子, 其介导的信号转导通路在抗氧化应激过程中发挥重要作用。在应激情况下, Nrf2 位于细胞质内, 与 Keap1 结合, 并介导 Nrf2 的快速泛素化和随后的降解; 在细胞受到 ROS 攻击后, Nrf2 被解偶联而转位至细胞核, 与 ARE 结合, 启动下游抗氧化相关基因 HO-1、NQO1 等的转录, 最终起到抗氧化应激损伤的作用^[15-16]。Hui 等^[17]报道, Keap1-Nrf2 小分子抑制剂能激活视网膜中 Nrf2, 对视网膜缺血性损伤有保护作用; Xu 等^[18]研究证实 Nrf2 激活剂对 RIR 视神经损伤有保护作用。已有研究证实牡荆苷对氧化应激条件下 Nrf2 通路有调控作用。Lu 等^[19]发现, 牡荆苷能通过控制 Nrf2 通路减轻脂多糖诱导的急性肺损伤; 刘磊等^[6]证实牡荆苷对急性脑缺血-再灌注大鼠氧化应激反应的减轻作用与 Nrf2 信

号通路调控有关。本研究结果显示,模型组大鼠视网膜组织中细胞质 Nrf2 蛋白表达低于正常对照组,而细胞核 Nrf2 表达高于正常对照组,下游 HO-1 和 NQO1 蛋白表达也高于正常对照组,说明在 RIR 条件下,视网膜组织中 Nrf2 通路活化,抗氧化应激系统启动;同时,牡荆苷组大鼠视网膜组织细胞核 Nrf2 表达及其下游 HO-1 和 NQO1 蛋白表达较模型组进一步增加,而细胞质 Nrf2 表达较模型组进一步降低,提示牡荆苷能活化 Nrf2 信号通路,从而增加机体抗氧化应激损伤的能力。本研究存在一些不足,如采用视网膜组织染色切片的方法来测量视网膜厚度,未严格固定测量部位,测量准确度不高,后续研究中将采用 OCT 仪器对固定部位进行视网膜厚度测量。

综上所述,牡荆苷能缓解 RIR 模型大鼠 RGCs 损伤,降低 RGCs 凋亡率,这一作用可能是通过激活 Nrf2 相关通路,提高视网膜组织抗氧化应激活性而实现的。
利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨佩瑶,赵军,张娟美,等.芍药苷通过调控 NLRP3 炎症小体保护视网膜缺血性损伤[J].中华实验眼科杂志,2018,36(12):920-924. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095.0160.2018.12.006.
Yang PY,Zhao J,Zhang JM, et al. The protective effect of paeoniflorin in retina ischemia animal model through regulation of NLRP3 inflammasomes[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(12): 920-924. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095. 0160. 2018. 12. 006.
- [2] Luo J, He T, Yang J, et al. SIRT1 is required for the neuroprotection of resveratrol on retinal ganglion cells after retinal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2020, 258(2): 335-344. DOI: 10. 1007/s00417-019-04580-z.
- [3] Qin X, Li N, Zhang M, et al. Tetrahedral framework nucleic acids prevent retina ischemia-reperfusion injury from oxidative stress via activating the Akt/Nrf2 pathway[J/OL]. Nanoscale, 2019, 11(43): 20667-20675 [2020-02-16]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31642452. DOI: 10. 1039/c9nr07171g.
- [4] Zhou C, Luo D, Xia W, et al. Nuclear factor (Erythroid-Derived 2)-like 2 (Nrf2) contributes to the neuroprotective effects of histone deacetylase inhibitors in retinal ischemia-reperfusion injury[J]. Neuroscience, 2019, 418: 25-36. DOI: 10. 1016/j. neuroscience. 2019. 08. 027.
- [5] 刘磊,吴一飞.牡荆苷对急性脑缺血再灌注大鼠的神经保护作用及其对 Th1/Th2 漂移的影响[J].中草药,2019,50(11):2645-2650. DOI: 10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2019. 11. 021.
Liu L, Wu YF. Neuroprotective effect of vitexin on acute cerebral ischemia reperfusion rats and its effect on Th1/Th2 drift[J]. Chin trad herbal drugs, 2019, 50(11): 2645-2650. DOI: 10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2019. 11. 021.
- [6] 刘磊,张静文,张新玥.牡荆苷调控 Nrf2/ARE 通路减轻急性脑缺血再灌注大鼠氧化应激反应研究[J].中草药,2020,51(5):1287-1293. DOI: 10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2020. 05. 027.
Liu L, Zhang JW, Zhang XY. Effect of vitexin on Nrf2/ARE pathway in alleviating oxidative stress in rats with acute cerebral ischemia-reperfusion[J]. Chin trad herbal drugs, 2020, 51(5): 1287-1293. DOI: 10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2020. 05. 027.
- [7] 颜娟,郑茂东,崔玉环,等.牡荆苷对脑缺血再灌注损伤小鼠抗氧化酶的影响[J].中国医药导报,2016,13(33):12-15,20.
Yan J, Zheng MD, Cui YH, et al. Effects of vitexin on antioxidant enzymes in cerebral ischemia-reperfusion injury mice[J]. Chin Med Guides, 2016, 13(33): 12-15, 20.
- [8] 张雪,孙大卫.视网膜缺血-再灌注损伤干预治疗新进展[J].中华实验眼科杂志,2017,35(5):463-467. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 05. 016.
Zhang X, Sun DW. Research progress of intervention treatment on the retinal ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(5): 463-467. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 05. 016.
- [9] 李娟娟,陈晨,张利伟,等.缺血-再灌注损伤鼠模型中视网膜微循环的结构损伤[J].中华实验眼科杂志,2019,37(1):5-9. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 01. 002.
Li JJ, Chen C, Zhang LW, et al. Structural changes of retinal microcirculation in mouse model of ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(1): 5-9. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 01. 002.
- [10] Yan H, Peng Y, Huang W, et al. The protective effects of α B-crystallin on ischemia-reperfusion injury in the rat retina[J/OL]. J Ophthalmol, 2017, 2017: 7205408 [2020-04-29]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29098085. DOI: 10. 1155/2017/7205408.
- [11] 曹丽静,卢文胜.川芎嗪对高眼压大鼠氧化应激及视网膜神经节细胞损伤的影响[J].中国临床药理学杂志,2020,36(5):525-527. DOI: 10. 13699/j. cnki. 1001-6821. 2020. 05. 013.
Cao LJ, Lu WS. Effect of ligustrazine on oxidative stress and retinal ganglion cells damage of high intraocular pressure in rats[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(5): 525-527. DOI: 10. 13699/j. cnki. 1001-6821. 2020. 05. 013.
- [12] Kars ME, Toklu Y, Arkan Yorgun M, et al. Electrolyte, nitric oxide and oxidative stress levels of aqueous humor in patients with retinal detachment and silicone oil tamponade[J]. Curr Eye Res, 2020, 45(11): 1443-1450. DOI: 10. 1080/02713683. 2020. 1749668.
- [13] Nurdiana S, Goh YM, Hafandi A, et al. Improvement of spatial learning and memory, cortical gyrfication patterns and brain oxidative stress markers in diabetic rats treated with Ficus deltoidea leaf extract and vitexin[J]. J Tradit Complement Med, 2018, 8(1): 190-202. DOI: 10. 1016/j. jtcm. 2017. 05. 006.
- [14] Xie CL, Li JL, Xue EX, et al. Vitexin alleviates ER-stress-activated apoptosis and the related inflammation in chondrocytes and inhibits the degeneration of cartilage in rats[J]. Food Funct, 2018, 9(11): 5740-5749. DOI: 10. 1039/c8fo01509k.
- [15] Ma TJ, Lan DH, He SZ, et al. Nrf2 protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative and ER stress; The ATF4 may be involved[J]. Exp Eye Res, 2018, 169: 28-37. DOI: 10. 1016/j. exer. 2018. 01. 018.
- [16] Zhang D, Li M. Puerarin prevents cataract development and progression in diabetic rats through Nrf2/HO-1 signaling[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(2): 1017-1024. DOI: 10. 3892/mmr. 2019. 10320.
- [17] Hui Q, Karlstetter M, Xu Z, et al. Inhibition of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction protects retinal cells and ameliorates retinal ischemia-reperfusion injury[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 146: 181-188. DOI: 10. 1016/j. freeradbiomed. 2019. 10. 414.
- [18] Xu Z, Cho H, Hartsock MJ, et al. Neuroprotective role of Nrf2 for retinal ganglion cells in ischemia-reperfusion[J]. J Neurochem, 2015, 133(2): 233-241. DOI: 10. 1111/jnc. 13064.
- [19] Lu Y, Yu T, Liu J, et al. Vitexin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by controlling the Nrf2 pathway[J/OL]. PLoS One, 2018, 13(4): e0196405 [2020-04-23]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29694408. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0196405.

(收稿日期:2020-10-08 修回日期:2021-02-02)

(本文编辑:张宇)