

7,8-二羟基黄酮对 NMDA 诱导视网膜神经节细胞凋亡的作用

朱敬 黄珂珂 郭娟

成都市第三人民医院眼科 西南交通大学附属医学院 重庆医科大学附属成都第二临床
医院,成都 610031

通信作者:郭娟,Email:929523051@qq.com

【摘要】 目的 探讨玻璃体腔注射 7,8-二羟基黄酮(DHF)对 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)诱导视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡的作用。方法 选取 6~8 周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠 138 只,采用随机数字表法将大鼠随机分为正常对照组 30 只、模型对照组 36 只、DHF 治疗组 36 只和脑源性神经生长因子(BDNF)对照组 36 只,以右眼为实验眼,分别接受玻璃体腔注射 5 μ l 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液、10 mmol/L NMDA、10 mmol/L NMDA + 100 mmol/L DHF、10 mmol/L NMDA + 100 mmol/L BDNF。于造模后 12 h、1 d、3 d、7 d、14 d、28 d,采用免疫荧光染色法观察并计数 RGCs,采用 TUNEL 染色法检测视盘周围细胞凋亡率。于给药后 12 h、3 d、14 d、28 d,采用实时荧光定量 PCR 法检测 caspase-3、B 淋巴细胞瘤-2(bcl-2)、bcl-2 相关 X 蛋白(bax)、酪氨酸激酶受体 B(TrkB)mRNA 相对表达量。结果 正常对照组、DHF 治疗组和 BDNF 对照组给药后不同时间点 RGCs 数量明显高于模型对照组,细胞凋亡率明显低于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。DHF 治疗组与 BDNF 对照组各时间点视盘周围细胞凋亡率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与模型对照组相比,DHF 治疗组给药后 12 h、3 d 和 14 d TrkB mRNA 相对表达量显著增加,BDNF 对照组给药后 3、14 和 28 d TrkB mRNA 相对表达量显著增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与模型对照组相比,DHF 治疗组和 BDNF 对照组给药后 12 h 和 3 d caspase-3 mRNA 相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与正常对照组相比,DHF 治疗组给药后 12 h bax 和 bcl-2 mRNA 相对表达量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与正常对照组相比,BDNF 对照组给药后 12 h 和 3 d bcl-2 mRNA 相对表达量显著升高,给药后 14 d bax mRNA 相对表达量显著增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 DHF 玻璃体腔注射有效减轻了大鼠模型中 NMDA 诱导的 RGCs 损伤,其神经保护机制可能是通过促进 TrkB 表达和抑制相关凋亡因子实现。

【关键词】 视网膜神经节细胞; 细胞凋亡; 脑源性神经生长因子; N-甲基-D-天冬氨酸; 7,8-二羟基黄酮

基金项目: 四川省自然科学基金(2022NSFSC1400); 四川省医学会青年基金(Q15045); 成都市科技局基金(2022519); 成都市第三人民医院内科研项目(CSY-YN-03-2024-034)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240201-00030

Effect of 7,8-dihydroxyflavone on NMDA-induced apoptosis of retinal ganglion cells

Zhu Jing, Huang Keke, Guo Juan

Department of Ophthalmology, The Third People's Hospital of Chengdu, Affiliated Hospital of Southwest Jiao Tong University, Chongqing Medical University Affiliated Chengdu Second Clinical Hospital, Chengdu 610031, China

Corresponding author: Guo Juan, Email: 929523051@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of intravitreal injection of 7,8-dihydroxyflavone (DHF) on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs). **Methods** A total of 138 male Sprague-Dawley rats aged 6–8 weeks were randomly divided into normal control group (30 rats), model control group (36 rats), DHF treatment group (36 rats), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) control group (36 rats) using the random number table method, which received intravitreal injections of 5 μ l 0.1 mmol/L phosphate buffered saline, 10 mmol/L NMDA, 10 mmol/L NMDA + 100 mmol/L DHF, and 10 mmol/L NMDA + 100 mmol/L BDNF, according to the group. The right eye was taken as the experimental eye. At 12 hours, 1 day, 3 days, 7 days, 14 days, and 28 days after modeling, RGCs were observed and counted by immunofluorescence staining. The apoptosis rate of peripapillary cells was assessed by TUNEL staining. At 12 hours, 3 days, 14 days, and 28 days after treatment, the expression of caspase-3, B-cell lymphoma-2 (bcl-2), bcl-2 associated X protein (bax), and tyrosine kinase receptor B (TrkB) were detected by real-time quantitative fluorescence PCR. The use and feeding of experimental animals in this study followed the Regulations on the Management of Laboratory Animals issued by the Ministry of Science and

Technology. This research protocol was reviewed and approved by the Medical Ethics Committee of Southwest Jiaotong University (No. SWJTU-2303-NSFC[066]). **Results** The RGCs count and the apoptosis rates in the normal control group, DHF treatment group, and BDNF control group were significantly higher than those in the model control group at each time point after treatment (all $P < 0.05$). There was no significant difference in the apoptosis rate of peripapillary cells between the DHF treatment group and the BDNF control group at different time points after treatment (all $P > 0.05$). Compared with the model control group, the TrkB mRNA expressions were significantly increased in the DHF treatment group at 12 hours, 3 days, and 14 days after treatment and in the BDNF control group at 3, 14, and 28 days after treatment (all $P < 0.05$). At 12 hours and 3 days after treatment, the expression of caspase-3 mRNA was significantly decreased in the DHF treatment group and BDNF control group compared with the model control group (all $P < 0.05$). At 12 hours after treatment, the relative expressions of bax and bcl-2 mRNA were significantly higher in the DHF treatment group than in the normal control group (both $P < 0.05$). Compared with normal control group, the relative expression of bax mRNA at 14 days after treatment and the relative expression of bcl-2 mRNA in the BDNF control group were significantly increased at 12 hours and 3 days (all $P < 0.05$). **Conclusions** Intravitreal injection of DHF effectively alleviates NMDA-induced RGCs damage in the rat model. Its neuroprotective mechanism may be achieved by promoting TrkB expression and inhibiting related apoptotic factors.

[Key words] Retinal ganglion cells; Apoptosis; Brain-derived neurotrophic factor; N-methyl-D-aspartate; 7, 8-dihydroxyflavone

Fund program: Sichuan Provincial Natural Science Foundation (2022NSFC1400); Sichuan Provincial Medical Association Youth Fund (Q15045); Chengdu Science and Technology Bureau Fund (2022519); Research Project of Chengdu Third People's Hospital (CSY-YN-03-2024-034)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240201-00030

青光眼是首位不可逆致盲眼病,是以视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)不可逆损伤为特点的一种神经退行性疾病^[1]。RGCs 需要神经营养因子来维持分化、存活以及神经生长等功能^[1-4]。这些神经营养因子包括脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子、神经营养因子-3 等。其中 BDNF 调控神经元的生长、分化和存活^[5-6]。BDNF 与酪氨酸蛋白激酶 B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB)受体相互作用后刺激细胞内酪氨酸残基的磷酸化,TrkB 受体信号通路被激活,从而能够激活细胞外信号通路以及丝裂原活化蛋白激酶。BDNF/TrkB 信号通路在 RGCs 的存活中起到至关重要的作用^[7-10]。7, 8-二羟基黄酮(7, 8-dihydroxyflavone, DHF)是一种类黄酮化合物,对 TrkB 受体具有高亲和性及选择性^[11-13]。已有报道证明,DHF 对于实验性青光眼诱导的视网膜内层损伤具有修复作用^[14-15]。在小鼠脑组织中,DHF 能够激活 TrkB 受体,降低谷氨酸毒性反应所产生的抗氧化应激作用,并且发挥神经保护功能^[16]。DHF 在 RGCs 损伤中的作用机制和有效性仍需进一步探讨,本研究旨在探讨玻璃体腔注射 DHF 对 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)诱导 RGCs 损害的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 138 只 6~8 周龄雄性

Sprague-Dawley 大鼠,体质量 180~220 g,查体无明显歪颈,角膜透明,虹膜血管清晰,瞳孔等大等圆、对光反射灵敏。实验动物由四川大学华西医学院基础动物实验室提供。实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术部颁布的《实验动物管理条例》,研究方案经西南交通大学医学伦理委员会审核批准[批文号:SWJTU-2303-NSFC(066)]。

1.1.2 主要试剂及仪器 BDNF (B3795)、DHF (506300)、NMDA (M3262)、兔抗 Brn3a 抗体 (AB5945) (美国 Sigma 公司); TUNEL 凋亡试剂盒 (No11684817910)、蛋白酶 K (11175529) (德国 Roche Applied Science 公司); 羊抗兔 IgG (A11034, 英国 Invitrogen 公司); 罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG (111-035-003, 美国 Jackson 公司); 0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液 (美国爱尔康公司); 氯霉素滴眼液 (山东博士伦福瑞达制药有限公司); RNA 提取试剂盒、Rneasy Mini Kit (美国 Qiagen Sciences 公司); SuperScript III First-strand Synthesis System 试剂盒 (18080-051, 美国 Invitrogen 公司)。10 μ l 微量注射器 (美国 Hamilton 公司); 啮齿动物眼压计 (芬兰 Tono-Lab tonometer 公司); 手术显微镜 (德国 ZEISS 公司); 荧光显微镜 (BX51)、显微数码照相机 (DP50) (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 采用随机数字表法将大鼠随机分为正常对照组 30 只、模型对照组 36 只、DHF 治疗组 36 只和 BDNF 对照组 36 只。按照

0.1 ml/20 g 给予大鼠甲苯噻嗪及氯胺酮(1:10)混合液腹腔内注射,行全身麻醉后,复方托吡卡胺滴眼液点双眼扩瞳,0.3%妥布霉素滴眼液滴入结膜囊3次,0.4%盐酸奥布卡因滴眼液点眼行角膜表面麻醉;消毒手术区,手术显微镜下,于角膜缘后1 mm处经睫状体平坦部,用30 G B-D针头刺穿眼球壁后立即出针。微量注射器以50°左右的斜角进入眼内,针尖始终向后朝向视神经,经瞳孔区可见针尖,避免损伤晶状体和视网膜,缓慢注入5 μ l药液,其中正常对照组、模型对照组、DHF治疗组和BDNF对照组大鼠分别接受玻璃体腔注射0.1 mmol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH7.4)、10 mmol/L NMDA、10 mmol/L NMDA+100 mmol/L DHF、10 mmol/L NMDA+100 mmol/L BDNF;推注完毕针头至少停留20 s后缓慢抽出,红霉素眼膏涂术眼。

1.2.2 免疫荧光染色观察 RGCs 丢失情况 分别于注射后12 h、1 d、3 d、7 d、14 d和28 d,从各组任意选择3只大鼠,通过心脏灌注4%多聚甲醛处死,并迅速摘除右侧眼球。行视网膜全层铺片,视网膜在距视盘1/2~2/3处被剪成4个象限,每个象限分为中央、中间和外周区域。加入封闭液室温下孵育40 min;加入Brn3a抗体(1:1 000),4℃孵育过夜,PBS漂洗;加入荧光标记羊抗兔IgG二抗(1:200),室温下避光孵育30 min;DAPI染细胞核后封片。荧光显微镜下将视网膜分成4个象限,每个象限分为中央、中间和外周区域,分别在400倍视野下取3个区域照相,即每张视网膜铺片取12张照片,每个图像代表 $4.7 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ 的区域,对RGCs层进行扫描拍照,采用ImageJ软件对Brn3a阳性RGCs进行计数。

1.2.3 TUNEL染色法检测 RGCs 凋亡率 每组于不同时间点各任意选取3只大鼠,采用上述方法处理后行视网膜组织铺片,并采用TUNEL凋亡试剂盒行TUNEL染色。视网膜铺片先后以0.1%PBS和蛋白酶K于室温下孵育30 min;置入1.1 mol/L、pH=6.1的柠檬酸缓冲液中,微波(40℃)处理8 min;置于3%山羊血清中室温下孵育30 min;将TUNEL I液和II液按1:9混合,滴于铺片上,37℃恒温箱内避光孵育2 h;滴加DAPI染色液,室温避光孵育5 min,0.01 mol/L PBS冲洗,用缓冲甘油封片,使用荧光显微镜在200倍视野下拍摄荧光图像。凋亡细胞计数方法与RGCs计数方法相同。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测视网膜中 TrkB、casepase-3、bax 和 bcl-2 基因相对表达量 给药后12 h、3 d、14 d、28 d,采用戊巴比妥钠过量麻醉法处死

各组3只大鼠,快速摘除右侧眼球并置于冰块上的生理盐水中,解剖显微镜下沿睫状体平坦部冠状面切开眼球,小心完整分离视网膜,避免混有其他组织,滤纸吸干表面水分后放入EP管中-80℃保存备用;用RNA提取试剂盒以及Rneasy Mini Kit提取各组视网膜总RNA。采用SuperScript III First-strand Synthesis System试剂盒(SYBR-Green I嵌合荧光法)进行PCR反应。各基因引物序列见表1。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火及延伸30 s,共计40个循环。以GAPDH为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因相对表达量。每个样本设3个复孔,取平均值。

表1 各基因引物序列
Table 1 Primer sequences of genes

基因		引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
TrkB	正向	CGGAATTCATGTCGCCCTGGCCG	175
	反向	CGGGATCCAGCCTTGTCTTTCTCT	
casepase-3	正向	AGCCGAAACTCTTCATCATTCA	133
	反向	CCATATCATCGTCAGTTCCACT	
bax	正向	AGGATCGCTCCACCAAGAAGCT	155
	反向	TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA	
bcl-2	正向	GCCACCTATCTGAATGACCACC	133
	反向	AGGAACCAGCGGTTGAAGCCG	
GAPDH	正向	AGTACCCGTCGCTGCACTCCA	147
	反向	GACACCGCGATGTCCACGGC	

注:bax;bcl-2相关X蛋白;bcl-2:B淋巴细胞瘤-2;TrkB:酪氨酸激酶受体B;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Note: bax: bcl-2 associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma-2; TrkB: tyrosine kinase receptor B; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件进行统计分析。计量资料经Shapiro-Wilk检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组给药后不同时间点RGCs凋亡率、RGCs数量和TrkB、casepase-3、bax、bcl-2 mRNA相对表达量差异总体比较采用两因素方差分析,多重比较采用LSD-t检验。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 RGCs 计数情况比较

免疫荧光染色结果显示,给药后28 d,模型对照组Brn3a阳性细胞密度明显降低,DHF治疗组与BDNF对照组Brn3a阳性细胞密度明显高于模型对照组(图1)。视网膜铺片RGCs计数结果显示,正常对照组、DHF治疗组、BDNF对照组和模型对照组RGCs

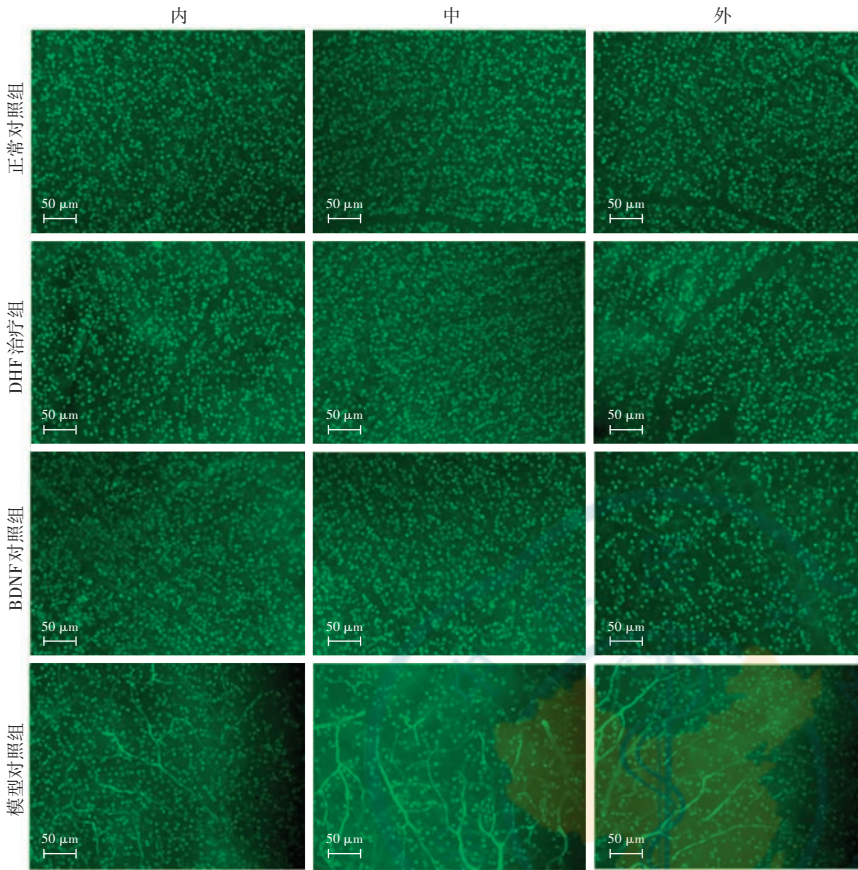


图 1 给药 28 d 时各组视网膜铺片内、中、外侧 Brn3a 荧光染色图 (FITC × 200, 标尺 = 50 μm) 模型对照组各区域 Brn3a 阳性细胞数明显少于其他组 DHF: 7, 8-二羟基黄酮; BDNF: 脑源性神经生长因子

Figure 1 Brn3a fluorescence staining images of the inner, middle and outer retinal flat mounts in each group at 28 days after administration (FITC × 200, scale bar = 50 μm) The number of Brn3a positive cells in each region of the model control group was lower than that of other groups DHF: 7, 8-dihydroxyflavone; BDNF: brain-derived neurotrophic factor

数量总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 266.400, P < 0.001, F_{\text{时间}} = 5.523, P < 0.001$); 正常对照组、DHF 治疗组和 BDNF 对照组给药后不同时间点 RGCs 数量均明显多于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); DHF 治疗组给药后 14 和 28 d, RGCs 数量多于 BDNF 对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

2.2 各组视盘周围 RGCs 凋亡率比较

TUNEL 染色结果显示, 给药后 28 d, 模型对照组视盘周围凋亡细胞数明显多于其他组 (图 2)。正常对照组、DHF 治疗组、BDNF 对照组和模型对照组各时间点细胞凋亡率总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 234.900, P = 0.004, F_{\text{时间}} = 279.800, P = 0.002$); 模型对照组各时间点细胞凋亡率均明显高于其他组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); DHF 治疗组与 BDNF 对照组各时间点细胞凋亡率比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 3)。

2.3 各组大鼠视网膜组织中凋亡相关因子 mRNA 相对表达量比较

各组 TrkB mRNA 相对表达量总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 272.000, P = 0.001$); 给药后 12 h, 正常对照组 TrkB mRNA 相对表达量明显高于其他组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 给药后 3 d, DHF 治疗组、BDNF 对照组 TrkB mRNA 相对表达量较正常对照组升高, DHF 治疗组 TrkB mRNA 相对表达量较模型对照组明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 给药后 14 d, DHF 治疗组和 BDNF 对照组 TrkB mRNA 相对表达量较正常对照组和模型对照组均升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 给药后 28 d, BDNF 对照组 TrkB mRNA 相对表达量较正常对照组和模型对照组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (表 4)。

表 2 各组不同时间点视网膜铺片 RGCs 数量比较 ($\bar{x} \pm s$, 个)

Table 2 Comparison of the RGCs count at different time points among various groups ($\bar{x} \pm s$, cells)

组别	样本量	给药后不同时间点 RGCs 数量					
		12 h	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
正常对照组	3	2 158 ± 311 ^a	2 213 ± 196 ^a	2 160 ± 183 ^a	2 221 ± 205 ^a	2 195 ± 208 ^a	2 215 ± 160 ^a
DHF 治疗组	3	1 935 ± 127 ^a	1 980 ± 280 ^a	1 926 ± 123 ^a	1 904 ± 169 ^a	1 965 ± 80 ^{ab}	1 702 ± 149 ^{ab}
BDNF 对照组	3	1 919 ± 149 ^a	1 739 ± 213 ^a	1 815 ± 143 ^a	1 721 ± 162 ^a	1 618 ± 149 ^a	1 398 ± 219 ^a
模型对照组	3	953 ± 15	895 ± 57	893 ± 59	777 ± 31	522 ± 26	453 ± 39

注: $F_{\text{组别}} = 266.400, P < 0.001, F_{\text{时间}} = 5.523, P = 0.001$. 与模型对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 BDNF 对照组对比, 差异有统计学意义, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) RGCs: 视网膜神经节细胞; DHF: 7, 8-二羟基黄酮; BDNF: 脑源性神经生长因子
 Note: $F_{\text{group}} = 266.400, P < 0.001, F_{\text{time}} = 5.523, P = 0.001$. Compared with the model control group, ^a $P < 0.05$; compared with the BDNF control group, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) RGCs: retinal ganglion cells; DHF: 7, 8-dihydroxyflavone; BDNF: brain-derived neurotrophic factor

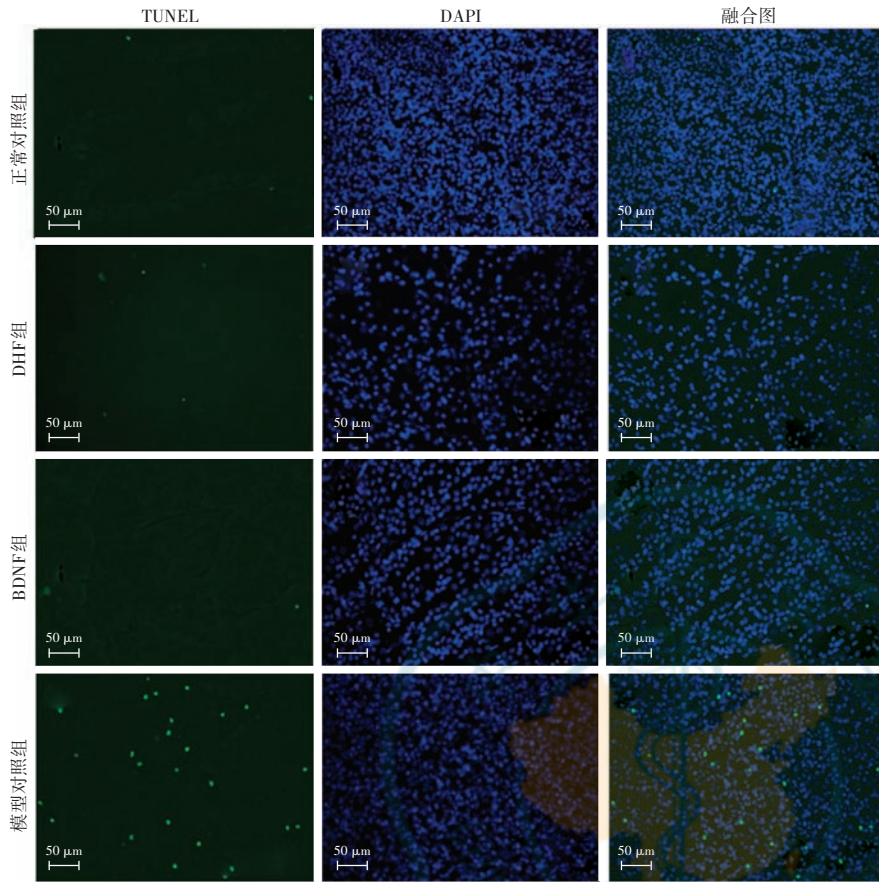


图 2 给药后 28 d 各组视网膜铺片视盘周围 RGCs 凋亡情况 (×200, 标尺 = 50 μm) 凋亡细胞呈绿色荧光, 细胞核呈蓝色荧光, 模型对照组可见大量绿色荧光着色, DHF 治疗组和 BDNF 对照组并未见明显绿色荧光着色细胞 DHF: 7, 8-二羟基黄酮; BDNF: 脑源性神经生长因子

Figure 2 RGCs apoptosis of retinal flat mounts in each group at 28 days after administration (×200, scale bar = 50 μm) Apoptotic cells showed green fluorescence, while cell nuclei showed blue fluorescence. The model control group had a large amount of green fluorescence staining, while the DHF treatment group and BDNF control group did not show significant green fluorescence staining cells DHF: 7, 8-dihydroxyflavone; BDNF: brain-derived neurotrophic factor

各组 caspase-3 mRNA 相对表达量总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 16.740, P = 0.049$)。给药后 12 h、3 d, 正常对照组 caspase-3 mRNA 相对表达量明显高于其他组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 6)。

各组 bcl-2 mRNA 相对表达量总体比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 78.070, P = 0.010$)。给药后 12 h, DHF 治疗组、BDNF 对照组、模型对照组 bcl-2 mRNA

给药后 3 d, 与模型对照组相比, DHF 治疗组和 BDNF 对照组 caspase-3 mRNA 相对表达量降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。给药后 14 d, 模型对照组 caspase-3 mRNA 相对表达量较正常对照组和 DHF 治疗组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。给药后 28 d, 模型对照组 caspase-3 mRNA 表达量较正常对照组和 BDNF 对照组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 5)。

各组 bax mRNA 相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 80.160, P = 0.012$)。给药后 12 h, DHF 治疗组、BDNF 对照组 bax mRNA 相对表达量较正常对照组升高, BDNF 治疗组较模型对照组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。给药后 3 d, 模型对照组 bax mRNA 相对表达量较其他 3 组明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。给药后 14 d, 模型对照组 bax mRNA 相对表达量较其他 3 组明显升高, BDNF 对照组较正常对照组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。给药后 28 d, 模型对照组 bax mRNA 相对表达量较其他 3 组明显

表 3 各组不同时间点视盘周围细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 3 Comparison of apoptosis rate of cells around the optic disc at different time points among various groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	给药后不同时间点视盘周围细胞凋亡率					
		12 h	24 h	3 d	7 d	14 d	28 d
正常对照组	3	1.12±0.43 ^a	1.57±0.21 ^a	1.52±0.70 ^a	1.25±0.13 ^a	0.59±0.11 ^a	0.66±0.13 ^a
DHF 治疗组	3	2.63±0.17 ^a	3.26±0.79 ^a	2.20±0.26 ^a	1.42±0.18 ^a	0.81±0.15 ^a	0.90±0.13 ^a
BDNF 对照组	3	3.02±0.18 ^a	5.93±0.55 ^a	2.35±0.21 ^a	1.57±0.19 ^a	1.79±0.17 ^a	1.52±0.18 ^a
模型对照组	3	10.32±1.54	12.85±1.92	8.04±0.27	7.03±0.16	3.05±0.21	2.27±0.28

注: $F_{\text{组别}} = 234.900, P = 0.004, F_{\text{时间}} = 279.800, P = 0.002$ 。与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) DHF: 7, 8-二羟基黄酮; BDNF: 脑源性神经生长因子

Note: $F_{\text{group}} = 234.900, P = 0.004, F_{\text{time}} = 279.800, P = 0.002$. Compared with the model control group, ^a $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) DHF: 7, 8-dihydroxyflavone; BDNF: brain-derived neurotrophic factor

表 4 各组不同时间点 TrkB mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Comparison of the relative expression of TrkB mRNA at different time points among various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	给药后不同时间点 TrkB mRNA 相对表达量			
		12 h	3 d	14 d	28 d
正常对照组	3	1.14±0.10	1.13±0.15	1.29±0.28	1.19±0.17
DHF 治疗组	3	3.39±0.23 ^a	3.19±0.18 ^{ab}	3.15±0.23 ^{ab}	2.97±0.83
BDNF 对照组	3	2.24±0.22 ^a	3.45±0.40 ^a	4.33±0.22 ^{ab}	4.15±0.25 ^{ab}
模型对照组	3	2.15±0.18 ^a	1.88±0.16	1.30±0.16	1.16±0.17

注: $F_{\text{组别}} = 272.000, P = 0.001; F_{\text{时间}} = 1.657, P = 0.320$ 。与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) TrkB: 酪氨酸激酶受体 B; DHF: 7, 8-二羟基黄酮; BDNF: 脑源性神经生长因子

Note: $F_{\text{group}} = 272.000, P = 0.001; F_{\text{time}} = 1.657, P = 0.320$. Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with the model control group, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) TrkB: tyrosine kinase receptor B; DHF: 7, 8-dihydroxyflavone; BDNF: brain-derived neurotrophic factor

表 5 各组不同时间点 caspase-3 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 5 Comparison of the relative expression of caspase-3 mRNA at different time points among various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	给药后不同时间点 caspase-3 mRNA 相对表达量			
		12 h	3 d	14 d	28 d
正常对照组	3	1.45±0.20	1.21±0.23	1.08±0.08	1.23±0.20
DHF 治疗组	3	2.30±0.35 ^a	1.16±0.17 ^{ab}	1.07±0.10 ^b	1.24±0.25
BDNF 对照组	3	2.69±0.33 ^a	1.17±0.17 ^{ab}	1.46±0.32	1.16±0.21 ^b
模型对照组	3	3.08±0.29 ^a	2.17±0.25 ^a	1.66±0.33 ^a	0.99±0.26 ^a

注: $F_{\text{组别}} = 16.740, P = 0.049; F_{\text{时间}} = 56.700, P = 0.016$ 。与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) caspase-3: 半胱天冬酶-3; DHF: 7, 8-二羟基黄酮; BDNF: 脑源性神经生长因子

Note: $F_{\text{group}} = 16.740, P = 0.049; F_{\text{time}} = 56.700, P = 0.016$. Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with the model control group, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) caspase-3: cysteine aspartic acid protease-3; DHF: 7, 8-dihydroxyflavone; BDNF: brain-derived neurotrophic factor

表 6 各组不同时间点 bax mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Comparison of the relative expression of bax mRNA at different time points among various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	给药后不同时间点 bax mRNA 相对表达量			
		12 h	3 d	14 d	28 d
正常对照组	3	1.47±0.20	1.12±0.23	1.08±0.21	1.25±0.17
DHF 治疗组	3	1.24±0.23 ^a	1.13±0.21 ^b	1.31±0.32 ^b	1.14±0.13 ^b
BDNF 对照组	3	2.44±0.35 ^{ab}	1.18±0.40 ^b	1.45±0.23 ^{ab}	1.30±0.28 ^b
模型对照组	3	2.19±0.35	6.71±0.99 ^a	2.25±0.32 ^a	3.13±0.25 ^a

注: $F_{\text{组别}} = 80.160, P = 0.012; F_{\text{时间}} = 32.720, P = 0.028$ 。与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) bax: bcl-2 相关 X 蛋白; DHF: 7, 8-二羟基黄酮; BDNF: 脑源性神经生长因子

Note: $F_{\text{group}} = 80.160, P = 0.012; F_{\text{time}} = 32.720, P = 0.028$. Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with the model control group, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) bax: bcl-2 associated X protein; DHF: 7, 8-dihydroxyflavone; BDNF: brain-derived neurotrophic factor

相对表达量较正常对照组升高, DHF 治疗组、BDNF 对照组较模型对照组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P <$

0.05); 给药后 3 d, BDNF 对照组、模型对照组 bcl-2 mRNA 相对表达量较正常对照组升高, DHF 治疗组 bcl-2 mRNA 相对表达量较模型对照组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 给药后 14 d, 模型对照组 bcl-2 mRNA 相对表达量较其他 3 组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 给药后 28 d, 模型对照组 bcl-2 mRNA 相对表达量较正常对照组和 BDNF 组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 7)。

3 讨论

兴奋性毒性、营养因子缺乏被认为是青光眼中导致 RGCs 凋亡的可能原因^[17-18]。本研究通过 NMDA 玻璃体注射成功诱导 RGCs 凋亡, 并发现 DHF 可有效逆转 NMDA 诱导的 RGCs 凋亡, 其效果与 BDNF 相似。

已有研究表明, Brn3a 能够特异标记 RGCs, 其作用效果与逆行性荧光标记效果相似^[19]。本研究通过 Brn3a 特异抗体对视网膜铺片中 RGCs 进行染色, 结果显示模型对照组 RGCs 数量逐渐减少, 给药后 28 d 时数量降低最多; 而 DHF 治疗组在给药 3 d 内 RGCs 数量与正常对照组相比差异无统计学意义, 给药后 7 d RGCs 数量明显低于正常对照组, 说明 DHF 能够早期阻断 NMDA 诱导的 RGCs 凋亡发生。

本研究结果显示, 模型对照组视盘周围能够明显见到大量凋亡细胞, 进一步说明 NMDA 能够诱导大量 RGCs 凋亡。与正常对照组相比, BDNF 对照组在给药后各时间点细胞凋亡率均明显升高, 差异均有统计学意义, 说明 BDNF 早期不能及时阻断凋亡过程; 而 DHF 治疗组在给药后 7 d 内细胞凋亡率与正常对照组相比差异均无统计学意义, 说明 DHF 能够及时阻断凋亡过程的发生, 也对 RGCs 起到了保护作用。

研究表明, RGCs、视盘和筛板结构中有大量 BDNF 和 TrkB 表达^[20-21]。小鼠模型中, 通过腺病毒感染的 Müller 细胞长期递送 BDNF 能够有效

表 7 各组不同时间点 bcl-2 mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)
Table 7 Comparison of the relative expression of bcl-2 mRNA at different time points among various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	给药后不同时间点 bcl-2 mRNA 相对表达量			
		12 h	3 d	14 d	28 d
正常对照组	3	1.45±0.20	1.21±0.23	1.08±0.08	1.23±0.20
DHF 治疗组	3	2.30±0.35 ^{ab}	1.16±0.17 ^b	1.07±0.10 ^b	1.24±0.25
BDNF 对照组	3	2.69±0.33 ^{ab}	2.17±0.17 ^a	1.46±0.32 ^b	1.16±0.21 ^b
模型对照组	3	3.08±0.29 ^a	2.22±0.21 ^a	2.66±0.33 ^a	1.99±0.26 ^a

注: $F_{\text{组别}} = 78.070, P = 0.010, F_{\text{时间}} = 88.890, P = 0.010$ 。与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) Bcl-2: B 淋巴瘤细胞瘤-2; DHF: 7, 8-二羟基黄酮; BDNF: 脑源性神经生长因子

Note: $F_{\text{group}} = 78.070, P = 0.010, F_{\text{time}} = 88.890, P = 0.010$. Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with the model control group, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) Bcl-2: B cell lymphoma-2; DHF: 7, 8-dihydroxyflavone; BDNF: brain-derived neurotrophic factor

保护受损的 RGCs, 并促进其功能恢复^[22]。有研究报道, BDNF 分子量较大, 作用时间相对较短, 导致无法有效防止 RGCs 凋亡^[12]。多次重复给药或者高剂量给予 BDNF 无法长期维持 RGCs 的存活, 同时 BDNF 还存在半衰期较短、给药方式局限以及增加剂量后不良反应加重等缺点, 导致其在临床上的应用相对受限^[23]。一些小分子化合物, 如 DHF 的作用类似于 TrkB 受体激动剂, 具有促进神经元生存和功能的潜力^[24]。本研究结果显示, 给药后 12 h, DHF 治疗组、BDNF 对照组和模型对照组 TrkB mRNA 相对表达量均较正常对照组显著提高。DHF 是一种类黄酮化合物, 可能通过类似 BDNF 的机制影响 TrkB 表达。给药后早期, BDNF 或 DHF 的存在可能刺激 TrkB 的表达, 从而增强其信号传导作用。在模型对照组中, 给药后早期由于应激反应, TrkB 的表达可能会升高。DHF 给药后 3 d, TrkB 表达升高, 说明 DHF 早期能够激活 TrkB 信号通路, 起到保护 RGCs 的作用。而 BDNF 对照组在给药后第 14 天 TrkB 表达量才逐渐开始增加。与 BDNF 相比, DHF 能更早刺激 TrkB 的表达, 从而实现更早的视神经保护。视网膜铺片 RGCs 计数和细胞凋亡结果也验证了该结论。

Caspase-3、bcl-2 和 bax 能够通过调控线粒体外膜通透性, 控制体内相关凋亡因子和细胞色素 C 等的释放, 从而调控细胞的凋亡^[25]。本研究结果显示, 模型对照组给药 12 h, bcl-2 和 bax mRNA 相对表达量较正常对照组明显升高; 给药后 12 h, bcl-2 mRNA 表达开始下降, bax mRNA 相对表达量继续升高, 并于给药后 3 d 时达到高峰, 表明细胞可能开始向凋亡的方向发展。而 DHF 治疗组和 BDNF 对照组中, 除了注射 12 h 时反应性升高, 给药 3~28 d, bax mRNA 相对表达量均

未见明显升高, 表明 BDNF 和 DHF 可能在一定程度上阻止凋亡的进展。模型对照组在给药后 12 h~28 d, caspase-3 mRNA 相对表达量持续升高, 表明 NMDA 能持续诱导相关凋亡通路。DHF 治疗组和 BDNF 对照组中, 给药后 14 d, caspase-3 mRNA 相对表达量明显降低, 表明 DHF 和 BDNF 均可能阻断相关凋亡因子的表达。

综上所述, 本研究结果显示, 玻璃体腔注射 DHF 改善了兴奋性氨基酸引起的视网膜损伤。

DHF 可能可以作为视神经保护类药物, 未来可进一步开发其给药途径, 实现 DHF 的眼内递送。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 朱敬: 设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据, 文章撰写; 黄珂珂: 实施研究、采集数据、分析/解释数据; 郭娟: 数据分析、统计分析及指导、对文章的知识性内容作批评性审阅

参考文献

- [1] Yang Y, Sun X. Retinal ganglion cell death in glaucoma: advances and caveats[J]. *Curr Eye Res*, 2023, 48(1): 1-10. DOI: 10.1080/02713683.2022.2068182.
- [2] Shen WC, Huang BQ, Yang J. Regulatory mechanisms of retinal ganglion cell death in normal tension glaucoma and potential therapies[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(1): 87-93. DOI: 10.4103/1673-5374.344831.
- [3] Colafrancesco V, Parisi V, Sposato V, et al. Ocular application of nerve growth factor protects degenerating retinal ganglion cells in a rat model of glaucoma[J]. *J Glaucoma*, 2011, 20(2): 100-108. DOI: 10.1097/IJG.0b013e3181d787e5.
- [4] Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, et al. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(2): 152-181. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.002.
- [5] Li Y, Li F, Qin D, et al. The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system [J/OL]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 986443[2024-09-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36158555>. DOI: 10.3389/fnagi.2022.986443.
- [6] Xiao J, Wong AW, Willingham MM, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes[J]. *Neurosignals*, 2010, 18(3): 186-202. DOI: 10.1159/000323170.
- [7] Harada C, Azuchi Y, Noro T, et al. TrkB signaling in retinal glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(12): 3238-3247. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.08.005.
- [8] Van Hook MJ. Brain-derived neurotrophic factor is a regulator of synaptic transmission in the adult visual thalamus[J]. *J Neurophysiol*, 2022, 128(5): 1267-1277. DOI: 10.1152/jn.00540.2021.
- [9] Dahlmann-Noor AH, Vijay S, Limb GA, et al. Strategies for optic nerve rescue and regeneration in glaucoma and other optic neuropathies[J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15(7-8): 287-299. DOI: 10.1016/j.drudis.2010.02.007.
- [10] 闫博婧, 李根林. 脑源性神经生长因子治疗视网膜色素变性的研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(3): 267-271. DOI: 10.

- 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 03. 017.
- Yan BJ, Li GL. Current advances on the brain-derived neurotrophic factor in therapy of retinitis pigmentosa [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(3): 267-271. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 03. 017.
- [11] Payá M, Ferrandiz ML, Sanz MJ, et al. Effects of phenolic compounds on bromobenzene-mediated hepatotoxicity in mice [J]. Xenobiotica, 1993, 23(3): 327-333. DOI: 10. 3109/00498259309059386.
- [12] Liu C, Chan CB, Ye K. 7, 8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders [J/OL]. Transl Neurodegener, 2016, 5: 2 [2024-09-18]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/26740873. DOI: 10. 1186/s40035-015-0048-7.
- [13] Emili M, Guidi S, Uguagliati B, et al. Treatment with the flavonoid 7, 8-dihydroxyflavone: a promising strategy for a constellation of body and brain disorders [J/OL]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(1): 13-50 [2024-09-18]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/32914634. DOI: 10. 1080/10408398. 2020. 1810625.
- [14] Gupta V, Chitranshi N, Gupta V, et al. TrkB receptor agonist 7, 8-dihydroxyflavone is protective against the inner retinal deficits induced by experimental glaucoma [J]. Neuroscience, 2022, 490: 36-48. DOI: 10. 1016/j. neuroscience. 2022. 01. 020.
- [15] Chen S, Kao YC, Laughton CA. Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997, 61(3-6): 107-115.
- [16] Choi DC, Gourley SL, Ressler KJ. Prelimbic BDNF and TrkB signaling regulates consolidation of both appetitive and aversive emotional learning [J/OL]. Transl Psychiatry, 2012, 2(12): e205 [2024-09-18]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/23250006. DOI: 10. 1038/tp. 2012. 128.
- [17] 余进海, 廖洪斐, 王耀华. 视神经损伤的保护策略研究现状 [J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40(11): 1090-1094. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20191226-00559.
- Yu JH, Liao HF, Wang YH. Research progress on protective strategies for optic nerve injury [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40(11): 1090-1094. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20191226-00559.
- [18] Bautista RD. Glaucomatous neurodegeneration and the concept of neuroprotection [J]. Int Ophthalmol Clin, 1999, 39(3): 57-70. DOI: 10. 1097/00004397-199903930-00007.
- [19] Kwong JM, Caprioli J, Piri N. RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(2): 1052-1058. DOI: 10. 1167/iovs. 09-4098.
- [20] Gupta VK, You Y, Klistorner A, et al. Shp-2 regulates the TrkB receptor activity in the retinal ganglion cells under glaucomatous stress [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(11): 1643-1649. DOI: 10. 1016/j. bbadis. 2012. 07. 016.
- [21] Iwabe S, Moreno-Mendoza NA, Trigo-Tavera F, et al. Retrograde axonal transport obstruction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor in the retina and optic nerve of American Cocker Spaniel dogs with spontaneous glaucoma [J]. Vet Ophthalmol, 2007, 10 Suppl 1: 12-19. DOI: 10. 1111/j. 1463-5224. 2007. 00504. x.
- [22] Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, et al. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(7): 3978-3983. DOI: 10. 1073/pnas. 95. 7. 3978.
- [23] Jang SW, Liu X, Chan CB, et al. Deoxygedunin, a natural product with potent neurotrophic activity in mice [J/OL]. PLoS One, 2010, 5(7): e11528 [2024-09-20]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/20644624. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0011528.
- [24] Jang SW, Liu X, Yepes M, et al. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7, 8-dihydroxyflavone [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(6): 2687-2692. DOI: 10. 1073/pnas. 0913572107.
- [25] 赵茹, 罗晋媛, 贺涛, 等. COG1410 对视网膜缺血-再灌注损伤小鼠视网膜神经节细胞的保护作用及其机制 [J]. 中华实验眼科杂志, 2023, 41(11): 1065-1075. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20221116-00534.
- Zhao R, Luo JY, He T, et al. Protective effect of COG1410 on the survival of retinal ganglion cells in mice with retinal ischemia-reperfusion injury and its mechanism [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2023, 41(11): 1065-1075. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20221116-00534.

(收稿日期: 2024-10-16 修回日期: 2025-04-13)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

读者·作者·编者

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件: (1) 参与课题的选题和实验设计, 参与实验资料的收集、分析和论证。 (2) 参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。 (3) 能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修, 能够答辩并承担责任。 (4) 对论文的诚信负责。 仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。 文中如有外籍作者, 应附外籍作者亲笔签名的在本刊发表的同意函。 集体署名的文章应于题名下列出署名单位, 于文末列出论文整理者的姓名, 并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方, 每篇论文须列出通信作者 1 名。 如无特殊约定, 则视第一作者为通信作者。 作者 (包括通信作者) 的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定, 在编排过程中不宜变更或增减, 尤其是通信作者和前三名作者, 若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。 有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音, 列于英文文题之下。

欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊和中国中文核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 核心期刊, 月刊, 96 面, 每月 10 日出版, 每期定价 26 元, 邮发代号: 36-13, 国内外公开发行, 欢迎到各地邮局订阅或直接与本刊编辑部联系订购。 联系电话: 0371-87160872。

(本刊编辑部)