

DHA 玻璃体注射对 ARMD 大鼠模型光感受器细胞凋亡和 PI3K/Akt 通路的影响

王辉, 沈玲, 姬翔

引用:王辉,沈玲,姬翔. DHA 玻璃体注射对 ARMD 大鼠模型光感受器细胞凋亡和 PI3K/Akt 通路的影响. 国际眼科杂志 2019; 19(12):2012-2016

作者单位:(454150)中国河南省焦作市人民医院眼科
作者简介:王辉,男,毕业于俄罗斯莫斯科谢东诺夫国立第一医科大学,硕士,主治医师,教学秘书,研究方向:眼底病、白内障、眼肿瘤、眼眶病。
通讯作者:王辉. feiko369@163.com
收稿日期:2019-03-25 修回日期:2019-11-07

摘要

目的:探讨二十二碳六烯酸(DHA)玻璃体注射对年龄相关性黄斑变性(ARMD)大鼠光感受器细胞凋亡和磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)通路的影响。

方法:大鼠随机分为空白对照组、模型组、低剂量 DHA 组(L-DHA 组)、中剂量 DHA 组(M-DHA 组)和高剂量 DHA 组(H-DHA 组)。采用光损伤法建立干性 ARMD 大鼠模型。HE 染色观察视网膜病理变化, TUNEL 法检测视网膜细胞凋亡情况,透射电镜观察视网膜神经节细胞超微结构,酶联免疫吸附法测定视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 水平, Western Blot 检测视网膜组织 p-PI3K、p-Akt、Bax、Bcl-2、p-NF- κ Bp65 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达。

结果:与空白对照组比较,模型组大鼠视网膜总厚度、外核层和内核层厚度、视网膜组织 p-PI3K、p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达均降低($P < 0.05$),神经节细胞层和外核层细胞凋亡指数、视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 水平、Bax、p-NF- κ Bp65 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达均升高($P < 0.05$)。与模型组比较,M-DHA 组和 H-DHA 组大鼠视网膜总厚度、外核层和内核层厚度、视网膜组织 p-PI3K、p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达均升高($P < 0.05$),神经节细胞层和外核层细胞凋亡指数、视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 水平、Bax、p-NF- κ Bp65 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达均降低($P < 0.05$)。

结论:DHA 可能通过激活 PI3K/Akt 通路抑制 ARMD 大鼠光感受器细胞凋亡。

关键词:年龄相关性黄斑变性;二十二碳六烯酸;光感受器;凋亡;磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.12.03

Effects of DHA vitrectomy on photoreceptor apoptosis and PI3K/Akt pathway in age-related macular degeneration rats

Hui Wang, Ling Shen, Xiang Ji

Department of Ophthalmology, Jiaozuo People's Hospital of Henan

Province, Jiaozuo 454150, Henan Province, China

Correspondence to: Hui Wang. Department of Ophthalmology, Jiaozuo People's Hospital of Henan Province, Jiaozuo 454150, Henan Province, China. feiko369@163.com

Received:2019-03-25 Accepted:2019-11-07

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of docosahexaenoic acid (DHA) on photoreceptor apoptosis and phosphatidylinositol-3-kinase/threonine protein kinase (PI3K/Akt) pathway in age-related macular degeneration (ARMD) rats.

• **METHODS:** The rats were randomly divided into blank control group, model group, low dose DHA group (L-DHA group), medium dose DHA group (M-DHA group) and high dose DHA group (H-DHA group). The rat model of dry ARMD was established by light injury. He staining was used to observe the pathological changes of retina, TUNEL method to detect the apoptosis of retinal cells, transmission electron microscopy to observe the ultrastructure of retinal ganglion cells, enzyme-linked immunosorbent assay to detect the levels of TNF- α and IL-6 in retina, Western blot to detect the expression of p-PI3K, p-Akt, Bax, Bcl-2, p-NF- κ Bp65 and cleaved-caspase-3 protein in retina.

• **RESULTS:** Compared with the blank control group, the total thickness of retina, the thickness of outer nuclear layer and inner nuclear layer, the expression of p-PI3K, p-Akt and Bcl-2 protein in the retina of the model group decreased ($P < 0.05$), the apoptosis index in the ganglion cell layer and outer nuclear layer, the level of TNF- α and IL-6 in the retina, the expression of Bax, p-NF- κ Bp65 and cleaved caspase-3 protein increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the total thickness of retina, the thickness of outer nuclear layer and inner nuclear layer, the expression of p-PI3K, p-Akt and Bcl-2 protein in retina increased in M-DHA group and H-DHA group ($P < 0.05$), the apoptosis index in ganglion cell layer and outer nuclear layer, TNF- α and IL-6 levels in retina, Bax, p-NF- κ Bp65 and cleaved caspase-3 protein expression decreased ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** DHA may inhibit photoreceptor apoptosis by activating PI3K/Akt pathway.

• **KEYWORDS:** age-related macular degeneration; docosahexaenoic acid; photoreceptor; apoptosis; phosphatidylinositol-3-kinase/serine protein kinase

Citation: Wang H, Shen L, Ji X. Effects of DHA vitrectomy on photoreceptor apoptosis and PI3K/Akt pathway in age-related macular degeneration rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(12):2012-2016

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 多发生于 50 岁以上老年人, 又被称为老年黄斑变性。随着社会老龄化的加剧, ARMD 发病率逐年上升, 已成为第三大致盲原因, 严重威胁中老年人身体健康^[1]。ARMD 分为干性和湿性两种类型, 临床中以干性患者为主。目前, 干性 ARMD 主要应用抗氧化剂进行治疗, 缺少有效的药物缓解 ARMD 进展^[2]。磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase/serine threonine protein kinase, PI3K/Akt) 信号通路是细胞内重要的信号转导通路之一, 可调控下游多种活化因子, 参与细胞的增殖、分化和凋亡等生命过程^[3]。研究表明, PI3K/Akt 信号通路在增殖性玻璃体视网膜病、后发性白内障、青光眼等多种眼科疾病的发生和发展过程中发挥关键作用^[4]。二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 是人体必须的不饱和脂肪酸, 可促进视网膜光感受器细胞和中枢神经系统的发育。研究表明, DHA 可能通过 ROS/Nrf2 途径诱导视网膜色素上皮细胞表达 HO-1, 从而发挥对视网膜色素上皮细胞的保护作用^[5]。饮食补充 DHA 可能通过提高胰岛素敏感性, 降低血清成纤维细胞生长因子 21 显著改善非酒精性脂肪性肝病患者血脂水平^[6]。DHA 可降低人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 凋亡率, 诱导 ARPE-19 细胞 HO-1 mRNA 和蛋白表达, 对 ARPE-19 细胞发挥保护作用^[7]。目前, DHA 对 ARMD 患者光感受器影响的研究相对较少。本研究通过光损伤法建立 ARMD 大鼠模型, 研究 DHA 对 ARMD 大鼠视网膜光感受器细胞凋亡的影响, 并探讨了其可能的作用机制, 以期为该疾病的治疗提供新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 60 只, 清洁级, 8 周龄, 体质量 160~230g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物合格证号: SCXK(沪)2017-0005。大鼠自由饮水和饮食, 饲养温度 20℃~25℃, 湿度 50%~56%, 光照 12h。本研究经本院动物伦理委员会批准同意。

1.1.2 实验试剂和仪器 DHA (批号: 20171115), 美国 Sigma 公司; TUNEL 试剂盒 (批号: 20171216), 瑞士罗氏 (Roche) 公司; TNF- α (批号: 20171216) 和 IL-6 (批号: 20171329) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; BCA 试剂盒 (批号: 20180125), 上海碧云天公司; NF- κ Bp65 (批号: Bs-0467R) 和 p-NF- κ Bp65 (批号: Bs-0458R) 抗体, 北京博奥森生物技术有限公司; PI3K (批号: Sc1236) 和 p-PI3K 抗体 (批号: Sc1152), Santa Cruz 公司; Akt (批号: 9275) 和 p-Akt (批号: 9246) 抗体, 美国 Cell Signaling 公司; Bax (批号: Sc1215) 和 Bcl-2 (批号: Sc1237) 抗体, 美国 Santa Cruz 公司; cleaved-caspase-3 抗体 (批号: 20180214), 武汉博士德生物工程有限公司。珊瑚石蜡切片机, 英国; XSP-9CA 光学显微镜, 上海光学仪器一厂; H-600 型透射电镜, 日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组和模型建立 大鼠适应性饲养 7d 后, 按照随机数字表法分为空白对照组、模型组、低剂量 DHA 组 (L-DHA 组)、中剂量 DHA 组 (M-DHA 组) 和高剂量 DHA 组 (H-DHA 组), 每组 12 只。参照文献方法采用视网膜光损伤法建立干性 ARMD 大鼠模型^[8]。L-DHA 组、

M-DHA 组和 H-DHA 组分别按剂量 2.5、5.0、10 μ g/kg 玻璃体注射 DHA^[9]。空白对照组和模型组注射等量生理盐水。造模起开始治疗, 每 10d 注射一次, 注射 5 次。

1.2.2 标本采集 最后一次给药结束后, 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉, 断颈处死, 冰浴下摘取眼球, 沿赤道部剖开, 剥离视网膜组织。其中每组中 6 只大鼠右眼视网膜组织 4% 多聚甲醛固定, 制作石蜡切片, HE 染色后行病理学观察和 TUNEL 检测。6 只大鼠的左眼视网膜组织 2.5% 戊二醛固定, 行透射电镜观察。剩余 6 只大鼠视网膜组织 -80℃ 保存备用。

1.2.3 TUNEL 原位凋亡检测 石蜡切片经常规脱蜡处理, PBS 冲洗后, 将切片置于湿盒中, 滴加 50 μ L 蛋白酶工作液, 37℃ 水浴 20min, PBS 冲洗 3 次, 滴加 20 μ L TUNEL 反应液, 37℃ 水浴 1h。PBS 冲洗 3 次后, 滴加 20 μ L Converter-POD 溶液, 37℃ 水浴 30min。PBS 冲洗 3 次后, 滴加 50 μ L DAB 工作液进行显色反应, PBS 冲洗。苏木素复染 10s, 自来水漂洗, 盐酸、酒精分化数秒, 自来水漂洗, 1% 氨水泛蓝, 自来水漂洗。酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。400 倍镜下观察 TUNEL 染色切片, 分别计算外核层和神经节细胞层细胞凋亡指数 (AI)。AI = 凋亡细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.2.4 酶联免疫吸附法测定视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 水平 取视网膜组织 1g, 添加 9mL 生理盐水于匀浆器中制备组织匀浆液, 3000r/min 离心 10min 后, 保留上清, 参照酶联免疫测定视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 水平, 在酶标包被板添加 50 μ L 标准品, 设空白孔 (不添加样品和酶标试剂)、待测样品孔, 将 40 μ L 样品、10 μ L 亲和素加入待测样品孔, 封板后 37℃ 反应 30min, 清洗、拍干后, 添加 50 μ L 酶标试剂 (空白孔除外), 封板后 37℃ 温育 30min, 洗涤、拍干后, 添加 100 μ L 显色剂, 37℃ 避光放置 5min, 添加 50 μ L 终止液结束反应, 于 450nm 波长检测各孔 OD 值, 绘制标准品曲线计算样品浓度。

1.2.5 Western Blot 检测蛋白表达 取视网膜组织, 充分裂解后, BCA 法定量蛋白含量。取 30 μ g 蛋白质, 加入上样缓冲液, 95℃ 煮沸 5min, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 将蛋白条带转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶 37℃ 封闭 1h。TBST 洗膜后, 分别加入 Bax、p-NF- κ Bp65 和 cleaved-caspase-3、p-PI3K、p-Akt 和 Bcl-2 一抗 (1:300), 4℃ 孵育 12h。TBST 洗膜, 加入 HRP 标记 IgG 二抗 (1:5000), 37℃ 孵育 2h。TBST 洗膜, 加入 ECL 发光液, 避光显影, 凝胶成像系统自动显影, 扫描 Bax、p-NF- κ Bp65 和 cleaved-caspase-3、p-PI3K、p-Akt 和 Bcl-2 蛋白条带灰度值, 以 β -actin 为内参, 各蛋白相对表达水平 = 目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。

统计学分析: 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 若存在差异, 进一步采用 LSD-*t* 检验进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 HE 染色结果 各组大鼠视网膜总厚度、外核层和内核层厚度比较, 差异有统计学意义 ($F = 175.879$ 、 12.668 、 19.387)。与空白对照组比较, 模型组大鼠视网膜总厚度、外核层和内核层厚度均降低, 差异有统计学意义 ($t = 23.004$ 、 5.934 、 7.182 , $P < 0.05$)。与模型组比较, M-DHA 组和 H-DHA 组大鼠视网膜总厚度、外核层和内

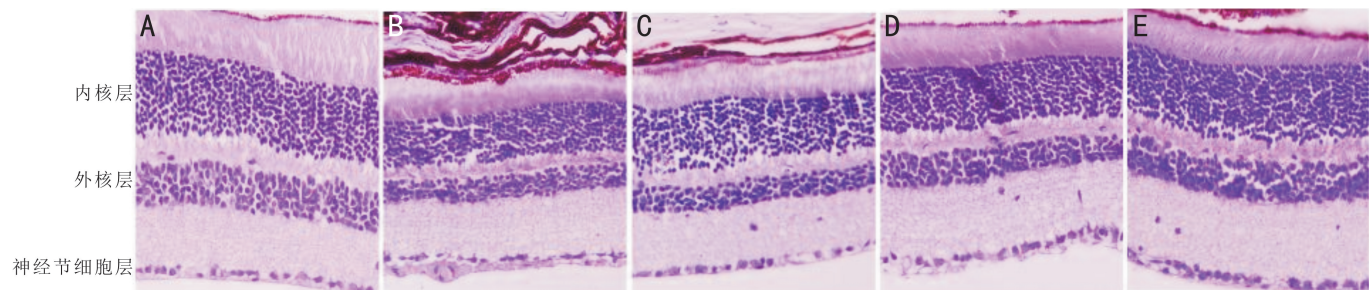


图1 各组大鼠 HE 染色结果(×400) A:空白对照组;B:模型组;C:L-DHA 组;D:M-DHA 组;E:H-DHA 组。

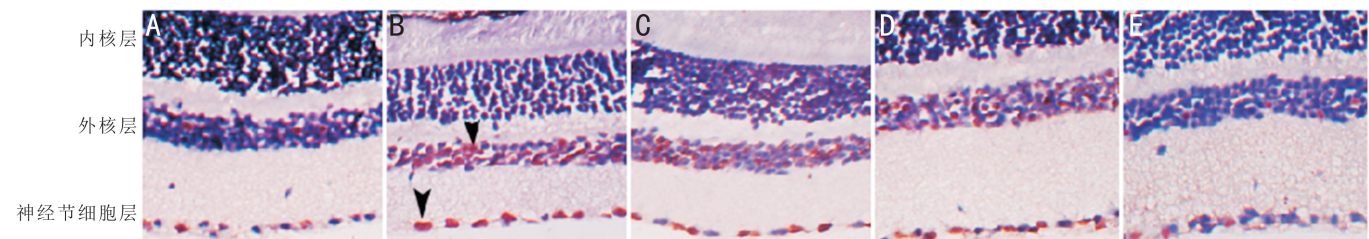


图2 各组大鼠 TUNEL 染色结果(×400) A:空白对照组;B:模型组(黑色箭头所示为 TUNEL 阳性细胞);C:L-DHA 组;D:M-DHA 组;E:H-DHA 组。

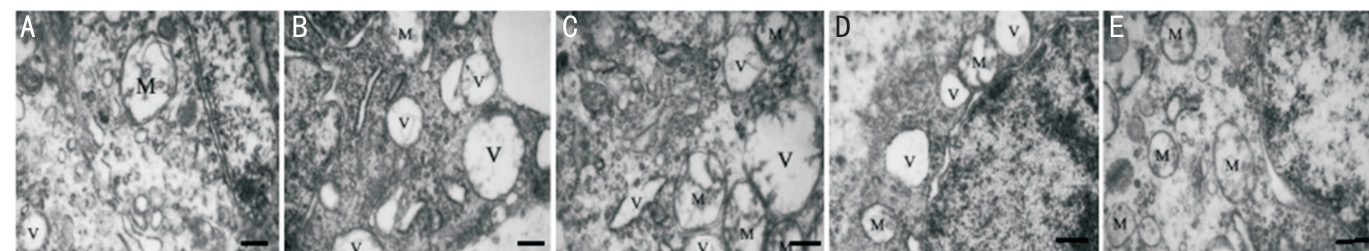


图3 各组大鼠视网膜神经节细胞超微结构(×5000) A:空白对照组;B:模型组;C:L-DHA 组;D:M-DHA 组;E:H-DHA 组。N:神经节细胞的细胞核;M:神经节细胞的线粒体;V:空泡。

表1 各组大鼠视网膜的总厚度、外核层和内核层厚度变化

组别	($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)		
	视网膜总厚度	外核层	内核层
空白对照组	167.25±5.21	22.37±2.61	43.16±3.15
模型组	110.23±3.14 ^a	15.37±1.24 ^a	31.24±2.57 ^a
L-DHA 组	124.35±3.57 ^c	16.43±1.28	33.11±2.59
M-DHA 组	139.43±4.35 ^e	18.62±2.25 ^e	37.82±2.67 ^e
H-DHA 组	158.34±5.11 ^g	21.05±2.46 ^g	40.61±2.87 ^g

注:^a $P < 0.05$ vs 空白对照组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

核层厚度均升高,差异有统计学意义($t_{\text{M-DHA组}} = 13.427, 3.099, 4.349, t_{\text{H-DHA组}} = 19.733, 5.050, 5.985, P < 0.05$);L-DHA 组大鼠视网膜总厚度升高,差异有统计学意义($t = 7.381, P < 0.05$),外核层和内核层厚度升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$,图1,表1)。

2.2 各组大鼠视网膜细胞凋亡情况 如图2所示,TUNEL 阳性细胞(黑色箭头)主要分布在神经节细胞层和视网膜外核层中。各组大鼠神经节细胞层和外核层细胞凋亡指数比较,差异有统计学意义($F = 125.379, 150.245, P < 0.001$)。与空白对照组比较,模型组大鼠神经节细胞层和外核层细胞凋亡指数升高,差异有统计学意义($t = 20.579, 19.833, P < 0.05$)。与模型组比较,M-DHA 组和 H-DHA 组大鼠神经节细胞层和外核层细胞凋亡指数降低,差异有统计学意义($t_{\text{M-DHA组}} = 7.934, 7.518, t_{\text{H-DHA组}} = 14.656, 14.585, P < 0.05$);L-DHA 组降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$,图2,表2)。

表2 各组大鼠神经节细胞层和外核层细胞凋亡指数比较

组别	($\bar{x} \pm s, \%$)	
	神经节细胞层	外核层
空白对照组	8.37±1.21	6.13±0.82
模型组	77.51±8.14 ^a	62.15±6.87 ^a
L-DHA 组	68.35±8.23	56.43±6.12
M-DHA 组	42.18±7.26 ^e	36.62±4.69 ^e
H-DHA 组	22.54±4.26 ^g	17.15±3.15 ^g

注:^a $P < 0.05$ vs 空白对照组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

2.3 各组大鼠透射电镜观察超微结构 视网膜神经节细胞超微结构见图3。空白对照视网膜神经节细胞具有均匀正常出现的细胞核和线粒体。模型组出现空泡化,染色质边缘化,染色质浓缩,线粒体肿胀和嵴缺失。DHA 治疗后,空泡化、染色质边缘化、染色质浓缩以及线粒体肿胀的不同程度改善。H-DHA 组线粒体和细胞核基本正常,与空白对照组较为相似。

2.4 各组大鼠视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 水平比较 各组大鼠视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 表达水平比较,差异有统计学意义($F = 18.729, 80.136, P < 0.001$)。与空白对照组比较,模型组大鼠视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 表达水平均升高,差异有统计学意义($t = 6.846, 13.079, P < 0.05$)。与模型组比较,M-DHA 组和 H-DHA 组大鼠视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 表达水平均降低,差异有统计学意义($t_{\text{M-DHA组}} = 4.132, 6.828, t_{\text{H-DHA组}} = 5.824, 11.965, P < 0.05$);L-DHA 组降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$,表3)。

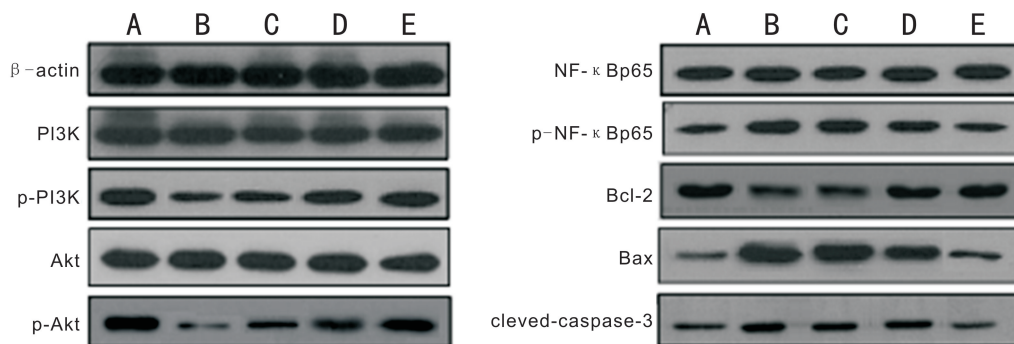


图4 各组大鼠视网膜组织相关蛋白条带 A:空白对照组;B:模型组;C:L-DHA组;D:M-DHA组;E:H-DHA组。

表3 各组大鼠视网膜组织 TNF- α 和 IL-6 水平比较

($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	TNF- α	IL-6
空白对照组	1.21 \pm 0.34	3.42 \pm 0.28
模型组	2.97 \pm 0.53 ^a	7.15 \pm 0.64 ^a
L-DHA组	2.58 \pm 0.47	6.73 \pm 0.53
M-DHA组	1.87 \pm 0.38 ^c	4.92 \pm 0.48 ^c
H-DHA组	1.46 \pm 0.35 ^c	3.61 \pm 0.34 ^c

注:^a $P < 0.05$ vs 空白对照组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

表4 各组大鼠视网膜组织相关蛋白表达水平比较

$\bar{x} \pm s$

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	Bax	Bcl-2	p-NF- κ Bp65/NF- κ Bp65	cleaved-caspase-3
空白对照组	0.59 \pm 0.03	0.55 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01	0.49 \pm 0.03	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
模型组	0.13 \pm 0.01 ^a	0.07 \pm 0.01 ^a	0.59 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.02 ^a	0.38 \pm 0.02 ^a	0.19 \pm 0.01 ^a
L-DHA组	0.22 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.56 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.34 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02
M-DHA组	0.39 \pm 0.02 ^c	0.26 \pm 0.02 ^c	0.32 \pm 0.02 ^c	0.29 \pm 0.02 ^c	0.26 \pm 0.03 ^c	0.16 \pm 0.03 ^c
H-DHA组	0.48 \pm 0.03 ^c	0.39 \pm 0.02 ^c	0.12 \pm 0.01 ^c	0.35 \pm 0.03	0.15 \pm 0.02 ^c	0.13 \pm 0.02 ^c

注:^a $P < 0.05$ vs 空白对照组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

2.5 各组大鼠视网膜组织相关蛋白表达 各组大鼠视网膜组织 Bax、p-NF- κ Bp65 和 cleaved-caspase-3、p-PI3K、p-Akt 和 Bcl-2 蛋白比较,差异有统计学意义 ($F = 916.895, 168.682, 17.842, 390.788, 624.947, 76.125, P < 0.01$)。与空白对照组比较,模型组大鼠视网膜组织 Bax、p-NF- κ Bp65 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达升高,差异有统计学意义 ($t = 40.279, 27.386, 13.856, P < 0.05$); p-PI3K、p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达降低,差异有统计学意义 ($t = 35.631, 37.181, 18.343, P < 0.05$)。与模型组比较, M-DHA 组和 H-DHA 组大鼠视网膜组织 Bax、p-NF- κ Bp65 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达降低,差异有统计学意义 ($t_{M-DHA组} = 18.343, 8.152, 2.324, t_{H-DHA组} = 36.406, 19.919, 6.573, P < 0.05$); p-PI3K、p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达升高,差异有统计学意义 ($t_{M-DHA组} = 28.482, 20.813, 3.184, t_{H-DHA组} = 27.111, 35.054, 8.832, P < 0.05$, 图 4, 表 4)。

3 讨论

ARMD 是一种眼科常见的视网膜黄斑退行性病变,由年龄、饮食、环境等多种因素引起的综合病症,对患者视力造成严重损伤^[10]。目前,ARMD 的发病机制尚不十分明确,但其病理已经证实与患者视网膜光感受器细胞的凋亡有密切关系。因此,开发新的能够抑制光感受器细胞凋亡的药物,延缓病情,减轻患者痛苦具有十分重要的意义。

DHA 是人体必须的高度不饱和脂肪酸,不能由自身合成,主要从食物中获取。DHA 作用广泛,具有抗神经炎症、抗氧化等功能,对帕金森、老年痴呆、黄斑变性等疾病有一定的预防作用。有报道称,与不含 DHA 藻油的大豆调和油饲养的大鼠相比,含 DHA 藻油的大豆调和油饲养的 SD 大鼠视网膜组织细胞层次更为清楚,细胞生长正常并且排列紧密,杆状细胞、锥状细胞清晰可见,说明 DHA 有益于视网膜组织细胞的生长发育^[11]。艾明等^[12]研究表明,DHA 可抑制 N-甲基-N-亚硝脲(MNU)对视网膜光感受器细胞超微结构的损伤,具有较好的保护作用,是一种潜在延缓视网膜色素变性病程进展的有效药物。本研究结果显示,模型组大鼠视网膜总厚度、外核层和内核层厚度较空白对照组降低,视网膜神经节细胞层和外核层细胞凋亡指数升高,神经节细胞出现空泡化,染色质边缘化,染色质浓缩,线粒体肿胀和嵴缺失现象,提示模型组大鼠视网膜光感受器异常,细胞凋亡。经 DHA 治疗后,可明显改善视网膜神经节细胞染色质边缘化和浓缩、线粒体肿胀等现象,增加视网膜总厚度、外核层和内核层厚度,以及降低视网膜神经节细胞层和外核层细胞凋亡指数,随着给药剂量的增加,视网膜神经节细胞逐渐得到恢复,具有剂量依赖性,与相关研究报道结果一致,提示 DHA 可保护 ARMD 大鼠光感受器细胞凋亡,可能是潜在治疗 ARMD 疾病的药物。

为了了解 DHA 保护 ARMD 大鼠光感受器细胞凋亡的作用机制,本研究基于 PI3K/Akt 信号通路进行了简单探讨。本研究表明,与空白对照组比,模型组大鼠视网膜组织 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平降低,PI3K 是一种可使肌醇环第 3 位羟基磷酸化的磷脂酰肌醇激酶,Akt 是 PI3K 的下游作用靶点。PI3K 被激活后生成的磷脂产物进一步激活 Akt 及其下游信号级联反应,参与细胞的生长和发育、抗凋亡等过程。近年来研究发现,PI3K/Akt 信号通路与眼部疾病关系密切^[13],陈春丽等^[14]发现上调 ARMD 视网膜色素上皮细胞 PI3K/Akt 信号通路,可降低细胞氧化应激损伤,发挥细胞保护作用。结合文献本研究成果提示 PI3K/Akt 信号通路可能参与 ARMD 的发生。本研究发现玻璃体注射 DHA 后,p-PI3K 和 p-Akt 蛋白水平升高,随着注射剂量的升高,p-PI3K 和 p-Akt 蛋白水平逐渐升高。玻璃体内注射 DHA 可减轻 NaIO₃ 诱导的 ARMD 大鼠模型的感光细胞损伤^[7]。DHA 抑制 PI3K 活性,进而降低非小细胞肺癌(NSCLC)细胞活力,诱导细胞凋亡^[15]。基于此,本研究推测 DHA 可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路,促进 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达,DHA 可能也通过 PI3K/Akt 信号通路缓解视网膜组织损伤,进而发挥对 ARMD 的保护作用。本研究表明,模型组大鼠视网膜组织 Bax、p-NF-κBp65 和 cleaved-caspase-3 蛋白、炎症因子 TNF-α 和 IL-6 表达升高,p-PI3K、p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达降低;研究表明 PI3K/Akt 信号通路可促进 Bcl-2 蛋白表达,抑制 Bax 蛋白表达,抑制细胞凋亡^[16];Dilly 等^[17]研究发现,激活 PI3K/Akt 信号通路能够活化 NF-κB 上调 TNF-α、IL-6 等炎症因子的表达;仇志富等^[18]研究发现,PI3K/Akt 信号通路可抑制 caspase-9 磷酸化,降低 caspase-3 表达,降低细胞凋亡。以往研究证实,激活 PI3K/Akt 信号通路,可增强 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达,促进慢性高眼压 SD 大鼠初级视皮层神经元损伤的修复,改善神经元细胞超微结构以及降低眼压^[19]。基于以上研究推测 ARMD 大鼠视网膜组织损伤后下调 PI3K/Akt 信号通路,进而激活 caspase-3 通路,造成 ARMD 大鼠光感受器细胞凋亡。本研究表明,经 DHA 干预后视网膜组织 Bax、p-NF-κBp65 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达及炎症因子 TNF-α 和 IL-6 表达均降低,具有剂量依赖性。研究发现 DHA 可能通过 Nrf2 途径诱导视网膜色素上皮细胞表达 HO-1,降低视网膜色素上皮细胞凋亡,从而发挥对视网膜色素上皮细胞的保护作用^[5]。推测 DHA 可能通过上调 PI3K/Akt 信号通路降低 ARMD 大鼠光感受器细胞凋亡,进而发挥对 ARMD 的保护作用。

综上所述,DHA 可降低 ARMD 大鼠光感受器的细胞凋亡,其可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路,上调 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达,进而抑制下游凋亡相关蛋白表达,从而发挥抗凋亡作用的,是治疗 ARMD 的潜在药物。本研究也存在一些不足,ARMD 机制较复杂,DHA 是否通过其它途径发挥保护作用,还有待后续深入研究。

参考文献

- 1 武明星,郑政,周希媛. 年龄相关性黄斑变性流行病学研究进展. 国际眼科杂志 2015;15(2):223-227
- 2 归成,石卫峰,黄堃. 治疗年龄相关性黄斑变性药物的应用分析. 上海食品药品监管情报研究 2014;32(6):23-28
- 3 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):839-884
- 4 Qin Y, Zhu Y, Luo F, et al. Killing two birds with one stone: dual blockade of integrin and FGF signaling through targeting syndecan-4 in postoperative capsular opacification. *Cell Death Dis* 2017; 8(7):2920-2926
- 5 刘越峰,罗卫民,张勇,等. 二十二碳六烯酸对人视网膜色素上皮细胞中血红素氧合酶-1 表达的诱导作用. 中华实验眼科杂志 2016;34(8):677-683
- 6 王玉泽,刘志权,张海从,等. 二十二碳六烯酸治疗非酒精性脂肪性肝病患者疗效观察. 实用肝脏病杂志 2015;18(5):542-543
- 7 刘越峰,罗卫民,张勇,等. 二十二碳六烯酸抑制氧化应激状态下人视网膜色素上皮细胞凋亡. 中国病理生理杂志 2016;32(3):504-509
- 8 谭涵宇,李建超,彭俊,等. 蛭螭不同途径给药对干性年龄相关性黄斑变性模型 Caspase-3、FasL、TNF-α、NF-κB 表达的影响. 湖南中医药大学学报 2018;248(5):17-21
- 9 Qiu S, Wei Y, Zhou X, et al. Intravitreal injection of docosahexaenoic acid attenuated photoreceptor cell injury in a NaIO₃-induced age-related macular degeneration rat model. *Neurosci Lett* 2017;657:53-61
- 10 安娜,陈强,梁丽娜,等. 氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型的建立. 眼科新进展 2016;36(7):605-608
- 11 陈涛,向红莉,张配,等. 含 DHA 藻油的大豆调和油对 SD 大鼠大脑皮层和视网膜形态结构的影响. 中国油脂 2017;42(7):130-133
- 12 艾明,孙明,李岱. 二十二碳六烯酸对视网膜光感受器细胞超微结构影响的实验研究. 湖北科技学院学报(医学版) 2011;25(6):465-467
- 13 Wu L, Zheng J, Chen P, et al. Small nucleolar RNA ACA11 promotes proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting the PI3K/AKT signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2017; 90:705-712
- 14 陈春丽,宋宗明,贾新国,等. 促红细胞生成素抑制氧化损伤诱导的人眼 Müller 细胞凋亡. 山东大学耳鼻喉眼学报 2015;29(3):65-71
- 15 闵发胜,杨建洪,黄建军,等. DHA 通过抑制 PI3K 通路和 GLUT2 表达而诱导 NSCLC 细胞毒性. 中国病理生理杂志 2015;31(11):1961-1969
- 16 张元浩,闫斌,王靖博,等. 胰岛素对高糖培养海马神经元凋亡及 IRS/PI3K/AKT 信号通路、Bcl-2 与 Bax 蛋白表达的影响. 医学研究杂志 2017;46(3):60-65
- 17 Dilly AK, Ekambaram P, Guo Y, et al. Platelet - type 12 - lipoxygenase induces MMP9 expression and cellular invasion via activation of PI3K/Akt/NF-κB. *Int J Cancer* 2013;133(8):1784-1791
- 18 仇志富,吴晓光,孟杰,等. 补阳还五汤提取物灌胃对脑出血大鼠脑中 PI3K、AKT、Caspase-3 表达的影响. 山东医药 2016;56(9):29-31
- 19 刘红佳,李翔,李祥玉,等. 补肾活血中药对 SD 大鼠慢性高眼压模型初级视皮层 PI3K/Akt 通路凋亡相关因子 BAX 及 BCL2 的影响. 中医眼耳鼻喉杂志 2017;7(4):197-202