

中药复光颗粒对家兔视神经夹伤后 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

朱 劲¹, 江 文¹, 黄 玲¹, 张 晓¹, 周华祥², 张 燕³

作者单位:¹(610041)中国四川省成都市,核工业 416 医院眼科;²(610041)中国四川省成都市,成都中医药大学附属医院眼科;³(610041)中国四川省成都市,四川省妇幼保健院
作者简介:朱劲,硕士,医师,研究方向:眼底病。
通讯作者:朱劲. 365881548@qq. com
收稿日期:2011-01-24 修回日期:2011-03-14

Effect of fuguang pellet on Bcl-2 and Bax expression after optic nerve crush in rabbits

Jin Zhu¹, Wen Jiang¹, Ling Huang¹, Xiao Zhang¹, Hua-Xiang Zhou², Yan Zhang³

¹Department of Ophthalmology, 416 Hospital of Nuclear Industry, Chengdu 610041, Sichuan Province, China;²Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, Sichuan Province, China;³Maternal and Child Health Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Jin Zhu. Department of Ophthalmology, 416 Hospital of Nuclear Industry, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. 365881548@qq. com

Received:2011-01-24 Accepted:2011-03-14

Abstract

• **AIM:** To observe the protective effect of fuguang pellet on optic nerve through the research of expression of apoptosis-related genes (Bcl-2, Bax) in the rabbits after crushing the optic nerve with microforceps.

• **METHODS:** By the method of crushing rabbit optic nerve, the models of traumatic optic neuropathy (TON) were set up. By determination of the expression of apoptosis-related genes (Bcl-2, Bax) in the rabbits' optic nerve, the influence of the fuguang pellet on injured optic nerve was observed.

• **RESULTS:** After the rabbits' optic nerve was crushed, there were significant differences in the expression of apoptosis-related genes (Bcl-2, Bax) between model group and the group of the fuguang pellet ($P < 0.05$). There were no significant differences between the group of high-dosage group and low-dosage group of the fuguang pellet.

• **CONCLUSION:** Fuguang pellet can decrease damages of optic nerve by increasing Bcl-2 gene expression and restraining Bax gene expression in this experiment.

• **KEYWORDS:** optic nerve crush; rabbit; Bax; Bcl-2; apoptosis-related gene; traumatic optic neuropathy

Zhu J, Jiang W, Huang L, *et al.* Effect of fuguang pellet on Bcl-2 and Bax expression after optic nerve crush in rabbits. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(5):792-794

摘要

目的:观察复光颗粒对家兔受损视神经的保护作用。

方法:采用视神经夹伤方法,建立家兔外伤性视神经病变(tramaumatic optic neuropathy, TON)模型,通过测定凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达,观察复光颗粒对受损视神经的影响。

结果:视神经夹伤后,凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达及 Bcl-2/Bax 值在复光颗粒组间(低、高剂量组)比较无显著差异性($P > 0.05$)。而复光颗粒各组与模型对照组间均有显著差异($P < 0.05$),复光颗粒各组较模型组 Bcl-2 表达增加,Bax 表达减少。

结论:在本实验条件下,复光颗粒具有上调抗凋亡基因 Bcl-2 和下调促凋亡基因 Bax 表达的作用,可减轻视神经损伤的作用。

关键词:视神经夹伤;家兔;Bax;Bcl-2;凋亡基因;外伤性视神经病变

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.05.013

朱劲,江文,黄玲,等. 中药复光颗粒对家兔视神经夹伤后 Bcl-2 和 Bax 表达的影响. 国际眼科杂志 2011;11(5):792-794

0 引言

外伤性视神经病变(tramaumatic optic neuropathy, TON)是一种对视功能损害严重的眼外伤,临床表现为视功能损害和眼底改变,治疗效果一般欠佳。目前,临床上对外伤所致视神经病变的治疗效果一般,同时治疗方面的相关基础研究也较薄弱,因此其治疗药物及方法已成为 TON 研究领域最迫切的课题。而中医药治疗本病的临床价值受到了广泛的关注,特别是活血化瘀和补益肝肾等药物的使用尤为普遍^[1]。既往实验研究表明,凋亡相关因子 Bcl-2 和 Bax 是调节凋亡的重要基因,两者的比例决定了细胞是生存还是死亡。因此,我们通过检测凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 在家兔视神经夹伤后的表达,研究中药复光颗粒对 TON 的保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 家兔 24 只,雌雄各半,体质量 2 ~ 2.5kg,由成都中医药大学实验动物中心提供。室温 18℃ ~ 25℃,空气流通,相对湿度 55% ~ 70%,自然光照饲养。动物在笼中

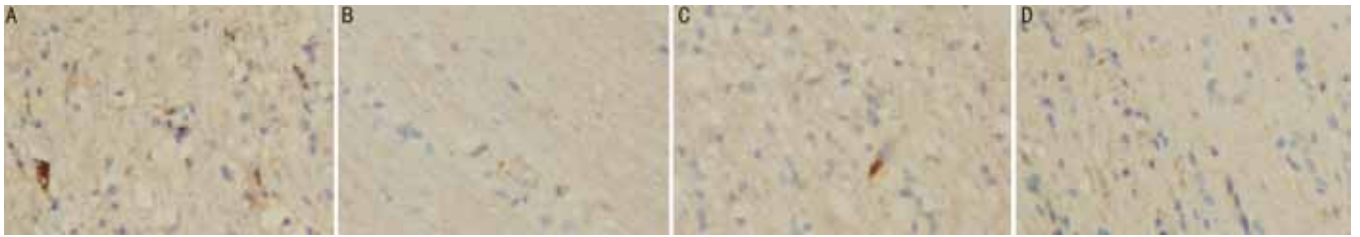


图1 兔眼 Bcl-2 的表达 (SABC ×400) A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 高剂量组。

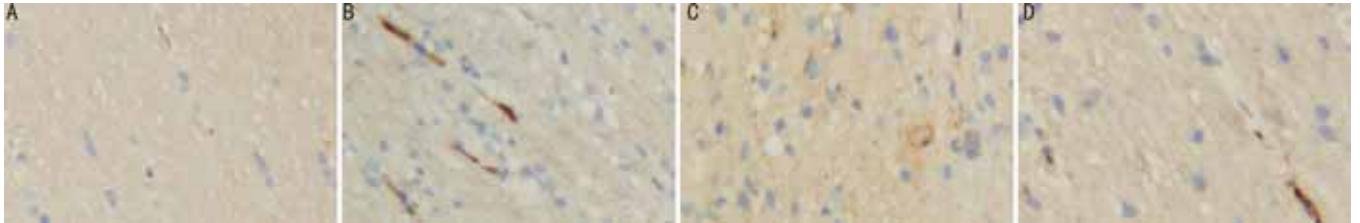


图2 兔眼 Bax 的表达 (SABC ×400) A: 正常组; B: 模型组; C: 低剂量组; D: 高剂量组。

自由摄食饮水, 饲料为全价兔颗粒料, 驯养 7d 后造模。复光颗粒 (处方: 当归 120g、白芍 160g、茯苓 200g、白术 250g、丹参 120g、柴胡 200g、熟地 200g、山药 160g、生地 200g、枸杞子 250g、磁石 160g、栀子 120g、升麻 120g、五味子 120g、甘草 80g), 由汕头鮑滨制药厂提供。3.7cm 反向血管夹 (弯) 型号: W40160, 标准号: YZB/沪 0130-02A-2005 0512 (上海医疗器械厂)。电子天平: 型号 T1000 (美国双杰兄弟有限公司)。Bcl-2/Bax I 抗 (兔抗鼠 mAb), II 抗 (羊抗兔 mAb): 武汉博士德公司。

1.2 方法 右眼造模前临时以生理盐水将戊巴比妥钠配制成 30g/L 浓度溶液, 按 1mL/kg 作耳缘 iv 全身麻醉。术眼周围脱毛, 以 2.5g/L 氯霉素眼液、生理盐水交替冲洗结膜囊, 手术部位消毒、铺巾。结扎、剪断上直肌: 于 9:00 ~ 3:00 位穹隆部剪开球结膜, 向前分离球结膜以暴露上直肌, 用 5-0 缝线结扎上直肌肌腱作牵引线, 距上直肌肌止端 4mm 处剪断上直肌。暴露视神经: 用眼睑拉钩牵拉上睑, 向眶外下方牵拉上直肌牵引线, 以暴露视神经。夹持视神经: 利用反向血管夹于球后 2mm 处夹持视神经, 持续时间 2min。术后处理: 庆大霉素冲洗夹伤部位, 剪断上直肌牵引线, 连续缝合结膜, 结膜下注射庆大霉素 2 万 U, 涂金霉素眼膏, 待苏醒后放回笼内。术后术眼点 2.5g/L 氯霉素眼液, 2 次/d, 连续用药 6d^[2]。动物以随机数字分为正常组 (所有模型对照组家兔的左眼)、模型对照组 (给予 10mL 蒸馏水)、复光颗粒低 (1g/kg)、高剂量 (4g/kg) 组^[3]。造模 40d 后开始给药, 以灌胃的方法给药, 1 次/d, 连续给药 30d, 给药期间每周称 1 次体质量, 以调整给药剂量。给药 30d 后于耳缘静脉注气法, 处死家兔, 暴露视神经, 于球后 3mm 处切断视神经, 立即摘取眼球并固定于 40g/L 甲醛溶液 24h; 经漂洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烤片后装盒 4℃ 保存备用。经免疫组化染色切片的处理, SABC 法免疫组化染色。将 SABC 法染色切片在 10 × 10 低倍视野下进行全面观察, 寻找 Bcl-2 和 Bax 阳性物质最丰富区域 (即“热点”区, 染色颜色最深/或者染色面积最多), 然后在 10 × 40 中倍视野下选择 5 个热点区, 采用 IPP 图像分析系统测量各个指标阳性物质积分吸光度, 表示它们的含量。

统计学分析: 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,

DPS 统计软件包处理, 多组间两两比较采用 q 检验 (S-N-K 法) 以及 LSD- t (方差齐) 或 Tamhane (方差不齐), 取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

在灌服复光颗粒悬液过程中, 高、低剂量组家兔出现腹胀或萎靡、不进食现象, 并伴随死亡现象, 其中高剂量组中死亡 2 只, 低剂量组死亡 1 只。

2.1 Bcl-2 的表达 正常组可见大量棕色颗粒, 均匀分布, Bcl-2 表达较明显 (图 1A)。模型组有少量棕色颗粒, 偶有 Bcl-2 表达 (图 1B)。低剂量组的棕色颗粒较模型组分布相对密集, Bcl-2 更明显 (图 1C)。高剂量组的棕色颗粒较模型组分布密集, Bcl-2 明显提高 (图 1D)。Bcl-2 的表达模型组 (6265 ± 905) 与正常组 (25644 ± 5191) 有显著差异 ($P < 0.05$), 说明造模成功; 模型组的 Bcl-2 积分吸光度明显低于高、低剂量组 (11884 ± 1908 vs 11385 ± 2096), 说明在本实验条件下, 高低剂量复光颗粒制剂均具有上调 Bcl-2 表达的作用; 低、高剂量组间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 Bax 的表达 正常组偶见棕色颗粒, Bax 的表达不明显 (图 2A)。模型组有大量棕色颗粒, 分布密集, Bax 表达显著 (图 2B)。低剂量组的棕色颗粒较模型组减少, 分布较稀疏 (图 2C)。高剂量组的棕色颗粒少, 分布疏散, 较模型组明显减少 (图 2D)。统计结果显示, 模型组 (68939 ± 5314) 与正常组 (21109 ± 760) 间相比较有显著差异性 ($P < 0.05$), 说明造模成功; 低剂量组 (47754 ± 1698)、高剂量组 (40656 ± 2177) 与模型组间比较有显著差异性 ($P < 0.05$), 说明两组均能下调促凋亡基因 Bax 基因表达; 低剂量组、高剂量组间比较无统计意义 ($P > 0.05$)。

2.3 Bcl-2/Bax 的影响 正常组为 1.215 ± 0.091 , 低、高剂量组 ($0.238 \pm 0.024, 0.292 \pm 0.077$) 与模型组 (0.091 ± 0.007) 比较均有显著差异性 ($P < 0.05$), 显示复光颗粒有减少凋亡、保护视神经作用; 但低剂量组、高剂量组比较 ($P > 0.05$) 无统计意义。

3 讨论

TON 根据其不同的病理及临床表现, 在中医眼科学中分属于“撞击伤目”、“青盲”、“触伤真气”等病症范畴, 主要致病机制在于: 目系受损, 气血失和, 血瘀气滞, 脉道

瘀阻,玄府闭塞,神光发越受阻甚至神光泯灭,从而表现视力骤降或丧失。故临床治疗中,大多以活血化瘀、疏肝解郁、滋养肝肾为基础治疗原则。视神经损伤后凋亡机制的研究给我们提供了一种认识 TON 治疗机制的新途径,提示我们一方面可以应用凋亡抑制剂保护受伤视神经;另一方面,有可能利用基因工程技术直接加强抗凋亡基因的表达,抑制促凋亡基因的表达,从而提高临床疗效,为 TON 患者挽救更多的视功能^[4]。好的动物模型是医学科研的先决条件和关键,本实验选用家兔视神经钳夹伤模型,家兔的视神经直径约 1.0mm,且结构与人相似,价格相对便宜,饲养条件要求低,故家兔是建立视神经损伤模型较为理想的实验动物。以反向止血夹夹持视神经 2min,文献报道及本实验前期预试病理切片均显示可造成视神经部分损伤;球后视神经约 2mm 处夹持,可减少对球内血液循环的影响。实验采用反向血管夹,可借助自身弹力闭合,闭合时其夹持力度一致,在视神经球后相同部位以相同时间致伤制作的视神经夹挫伤模型,以确保视神经损伤的定量和各受试动物损伤程度的一致性。

动物实验研究表明,视神经损伤的家兔抗凋亡基因 Bcl-2 的表达呈下降趋势,而促凋亡基因 Bax 则呈上升趋势。因此减少视神经损伤后的凋亡,对保护受损的视神经有重要意义。本实验结果显示:复光颗粒用药组的低剂量组和高剂量组 Bcl-2 基因的表达均较模型组提高,具有一定的上调抗凋亡反应;Bax 基因表达降低,说明这两组用药均能够改变抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax 之间的

平衡,可能是其发挥治疗作用的机制之一,从而显示具有视神经保护作用。复光颗粒用药组的低剂量组和高剂量组之间抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax 的积分吸光度值差异无统计学意义,提示复光颗粒可能存在量效关系方面的问题,需进一步深入研究和优化。在本实验条件下,复光颗粒可能对家兔夹伤后的视神经有一定保护作用,低剂量组和高剂量组均能够影响凋亡基因的表达^[5]。复光颗粒在前期的初步临床观察中,对 TON 显示了一定临床疗效,特别是在改善患者视力方面有一定功效,本实验也证实了该制剂对家兔视神经夹伤后凋亡基因的表达确有一定积极性影响,因此通过进一步的探索或许有可能成为可供临床选择的治疗药物,值得深入研究。

参考文献

- 1 张亚平. 中医辨证治疗间接性视神经损伤. 眼外伤职业眼病杂志 2000;22(5):520
- 2 李志刚. 视神经损伤动物模型的研制方法. 河南实用神经疾病杂志 2004;7(2):32-33
- 3 朱豫,张效房. 深入开展外伤性视神经病变的诊断及治疗研究. 中华眼科杂志 2002;38(11):641-643
- 4 Jousseaume AM, Poulaki V, Qin W, et al. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion *in vivo*. *Am J Pathol* 2002;160(2):501-509
- 5 易少华,吴红色,邓伟连,等. 视神经挫伤后视网膜形态学和 Bcl-2/Bax 表达. 眼外伤职业眼病杂志 2006;28(5):321-324