

大黄酚对青光神经退行性病变的保护作用及其信号转导通路

胡浩, 江灵莉

作者单位: (317500) 中国浙江省温岭市第一人民医院眼科
作者简介: 胡浩, 毕业于温州医科大学, 副主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼、眼视光学。
通讯作者: 胡浩. huhao06@126.com
收稿日期: 2015-08-19 修回日期: 2015-12-14

Protective effect of chrysophanol on neural degeneration caused by glaucoma and its mechanism

Hao Hu, Ling-Li Jiang

Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Wenling, Wenling 317500, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Hao Hu. Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Wenling, Wenling 317500, Zhejiang Province, China. huhao06@126.com

Received: 2015-08-19 Accepted: 2015-12-14

Abstract

• AIM: To investigate the effect and mechanism of chrysophanol for rat model with glaucoma.

• METHODS: The glaucoma rat models were made by cauterization of three episcleral veins. Then the glaucoma rats were divided into three groups. Group 1 was the untreated intraocular hypertension group. Group 2 was the low dose of chrysophanol group (25mg/kg). Group 3 was the high dose of chrysophanol group (50mg/kg), 15 rats in each group. The right eyes were the experiment eyes while the left were the control ones. After 6wk treatment, the mRNA and protein of protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and Rho kinase 1 (ROCK-1) were determined in the retina.

• RESULTS: The chrysophanol reduced intraocular pressure (IOP) of experiment eyes, which was significantly lower than that of control eyes ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the p-PERK protein increased significantly in the retina of glaucoma model group and chrysophanol increased the lever of p-PERK protein. The ROCK-1 protein level increased significantly in glaucoma group, it all decreased in these treatment groups, and it decreased significantly in high dose treatment group. Detected by TR-PCR, chrysophanol also could activate the mRNA of PERK and inhibited the mRNA expression of ROCK-1 in a rat model of glaucoma.

• CONCLUSION: These results suggest that chrysophanol can reduce the IOP through the phosphorylation of PERK protein to regulate the PERK/ROCK signaling in glaucoma rat model.

• KEYWORDS: chrysophanol; glaucoma; protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase; Rho kinase 1; neuroprotection

Citation: Hu H, Jiang LL. Protective effect of chrysophanol on neural degeneration caused by glaucoma and its mechanism. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(1):34-36

摘要

目的: 探讨大黄酚对慢性青光眼大鼠的保护作用及其作用机制。

方法: 采用双极电凝器电凝巩膜表面3组静脉, 建立慢性高血压大鼠模型, 分为3组。一组为高血压模型组, 一组为大黄酚低剂量组(25mg/kg), 一组为大黄酚高剂量组(50mg/kg), 每组各15只, 右眼为实验眼, 左眼为正常对照眼。连续给药6wk后处死大鼠并摘取眼球, PCR和Western-blot检测PERK和ROCK-1在视网膜中的表达。

结果: 大黄酚高、低剂量组能有效降低大鼠眼内压, 与模型眼相比有显著统计学差异($P < 0.01$)。正常对照视网膜p-PERK蛋白水平表达比较低, 青光眼模型组表达显著升高, 高、低剂量大黄酚使其表达增高。ROCK-1在视网膜中的表达在青光眼模型组表达最高, 各治疗组均可使其表达下降, 以高剂量组下降最显著。RT-PCR结果表明, 高剂量组大鼠视网膜PERK mRNA水平明显高于模型对照眼; ROCK-1 mRNA水平则显著降低。

结论: 高剂量大黄酚能有效降低青光眼大鼠的眼内压, 其作用机制可能是通过激活PERK蛋白磷酸化以调控PERK/ROCK信号转导而发挥其保护作用。

关键词: 大黄酚; 青光眼; PERK; ROCK; 神经保护

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.1.08

引用: 胡浩, 江灵莉. 大黄酚对青光神经退行性病变的保护作用及其信号转导通路. 国际眼科杂志 2016;16(1):34-36

0 引言

青光眼是一种复杂的神经退行性眼部疾病, 它是全球第二大致盲性眼病。青光眼的神经性病变发生在视网膜神经节细胞及视神经轴突, 高血压是其病变的主要原因之一^[1]。眼内压的升高引起的视网膜神经节细胞及其轴突渐进性及不可逆转的损失, 导致视力丧失。大黄酚是中药大黄主要的有效单体之一, 属于蒽醌类化合物。研究表明, 大黄酚在脑缺血再灌注损伤、阿尔茨海默病中表现出很好的神经保护作用^[2]。为此, 本研究通过考察慢性高血压大鼠在大黄酚治疗后眼内压的变化, 初步探讨大黄酚对青光眼治疗的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 PERK和p-PERK多克隆抗体, ROCK-1多克

隆抗体(美国 Santa 公司),Tono-pen XL 笔式眼压计(美国 Mentor),手术显微镜(上海医用光学仪器厂)。SPF 级 SD 雄性大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供)45 只,体质量 160~180g,无眼疾。随机分为 3 组,一组为高血压模型组,一组为大黄酚低剂量组(25mg/kg),一组为大黄酚高剂量组(50mg/kg),每组各 15 只,右眼为实验眼,左眼为正常对照眼。

1.2 方法 大鼠 3% 戊巴比妥钠溶液按 30mg/kg 行腹腔注射麻醉,盐酸奥布卡因进行眼表面麻醉,抗生素注射液滴眼,剪开右眼外眦部,上下眼睑缝线开睑,分别于 3:00、6:00、9:00 及 12:00 位处,沿角巩膜缘剪开球结膜和其下方的 Tenon 囊,切口长约 2mm,沿切口的两端行放射状切开,在直肌旁侧或其下方找到 3 条巩膜表层静脉,用烧灼器迅速轻点烧灼,阻断成功的标志是血管立即收缩,其远端血流中断。术后结膜囊内点 3g/L 诺氟沙星滴眼液。假手术对照眼只剪开外眦部不烧灼。术前、术后即刻及术后每周用 Tono-Pen XL 眼压计测眼压。建模第 3d 起高血压大黄酚治疗组每天灌胃给药(大黄酚 25mg/kg 或 50mg/kg),高血压模型组每天灌胃等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠。到 6wk 末,用 100g/L 水合氯醛溶液按 3mL/kg 的剂量腹腔麻醉,随后摘取每只鼠的双眼,去除其眼球前节。在无菌条件下于显微镜下将眼球做成眼杯,小心剥离出视网膜组织,液氮下冷冻,-80℃ 储存。

1.2.1 RT-PCR 技术检测视网膜组织中基因表达 采用 RT-PCR 技术检测各组大鼠视网膜组织中 PERK 和 ROCK-1 的 mRNA 表达。首先使用 Trizol 试剂盒从视网膜组织中提取总 mRNA,然后将提取的 RNA 反转录为 cDNA,同时进行实时荧光定量 PCR 检测。PCR 反应参数为:95℃ 3min,循环体:95℃ 30s, 55℃ 30s,72℃ 30s,35~40 个循环,延伸:72℃ 15min。GAPDH 引物序列:上游 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3',下游 5'-TGTCATTGAGAGCAATGCCAGC-3';PERK 引物序列:上游 5'-AAGATGGTACAGTGGACGGC-3',下游 5'-CCGTGTTCTGGTGAAATCT-3';ROCK-1 引物序列:上游 5'-CCCTCACCCTTTCCAGCCA-3',下游 5'-GGCGGTGGCTTAAAAACATGC-3'。以 PERK mRNA、ROCK-1 mRNA 与 GAPDH mRNA 含量比值作为 PERK mRNA、ROCK-1 mRNA 表达水平。

1.2.2 Western-blot 检测视网膜组织中蛋白表达 取各样本蛋白质 50μg 进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,脱脂奶粉封闭 2h,TBST 液洗膜 3 次,每次 5min,共 3 次,加入相对应的特异性一抗孵育,ROCK-1 多克隆抗体的工作浓度为 1:500,PERK 和 p-PERK 多克隆抗体的工作浓度都为 1:1000。4℃ 孵育过夜。TBST 液洗膜 3 次,每次 5min,然后二抗室温孵育 2h,TBST 液洗膜 3 次,每次 5min,共 3 次,ECL 曝光后采用 Quantity-one Software 4.6.9 测定各条带光密度。

统计学分析:采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计学分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用独立样本 *t* 检验进行统计处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高血压大鼠模型的眼压观察 大鼠术前右眼和左眼眼压差异无统计学意义 (15.87 ± 1.87 vs 16.02 ± 2.02 mmHg, $t=0.5233$, $P=0.6031$)。在实验过程中,对照组眼压在 14~17 mmHg 范围波动。高血压模型眼(右眼)眼压相对于对照眼明显升高(16.42 ± 2.18 vs 21.81 ± 2.92 mmHg,

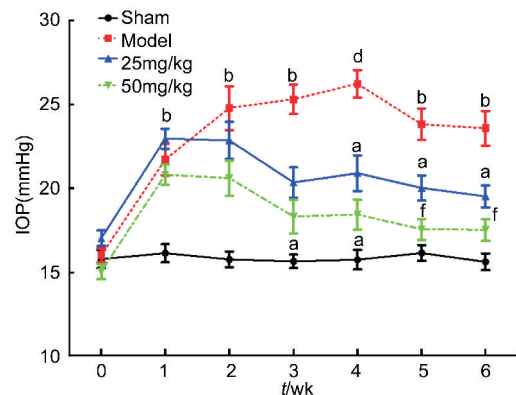


图 1 各组大鼠不同时间点眼内压变化情况 Sham:假手术组; Model:模型组; 25mg/kg: 25mg/kg 大黄酚灌胃组; 50mg/kg: 50mg/kg 大黄酚灌胃组;^b $P < 0.01$,^d $P < 0.001$ vs Sham 组;^a $P < 0.05$,^f $P < 0.01$ vs Model 组。

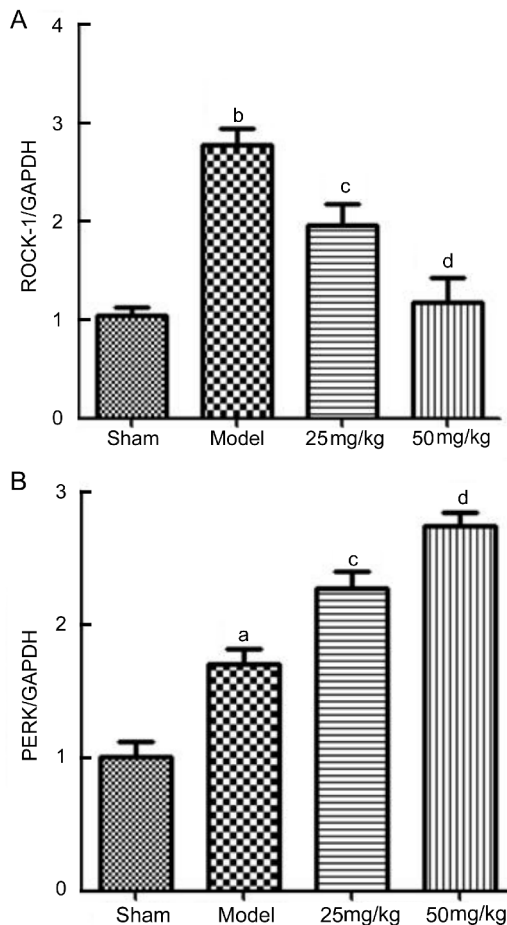


图 2 大鼠视网膜中 mRNA 表达水平 A:各组大鼠视网膜 ROCK-1 信使 RNA 表达水平; B:各组大鼠视网膜 PERK 信使 RNA 表达水平; Sham:假手术组; Model:模型组; 25mg/kg: 25mg/kg 大黄酚灌胃组; 50mg/kg: 50mg/kg 大黄酚灌胃组。^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs Sham 组;^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ vs Model 组。

$t=6.770$, $P=0.0045$)。在连续给药 6wk 后,大黄酚高、低剂量组大鼠眼内压平均下降了 31% 和 22% (图 1)。

2.2 各组大鼠视网膜中 PERK 和 ROCK 基因的表达量 以 PERK/GAPDH 和 ROCK/GAPDH 比值代表 PERK 和 ROCK mRNA 的相对表达情况。由图 2 可见,高血压模型大鼠视网膜 ROCK-1 和 PERK mRNA 表达水平较正常对照视网膜水平显著升高 ($t=0.0008$, $P=0.0008$; $t=4.415$, $P=0.0116$)。大鼠大黄酚灌胃 6wk 后,在低剂量组和高剂

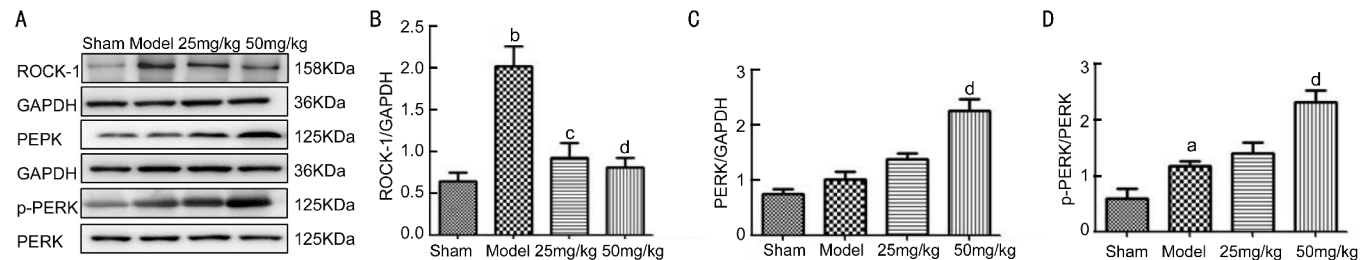


图3 大鼠视网膜蛋白表达水平 A:各组大鼠视网膜 ROCK-1、PERK、p-PERK 蛋白表达条带;B:各组大鼠视网膜 ROCK-1 蛋白表达水平;C:各组大鼠视网膜 PERK 蛋白表达水平;D:各组大鼠视网膜 p-PERK 蛋白表达水平;Sham:假手术组;Model:模型组;25mg/kg:25mg/kg 大黄酚灌胃组;50mg/kg:50mg/kg 大黄酚灌胃组。^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs Sham 组;^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ vs Model 组。

量大鼠视网膜 PERK mRNA 与高血压模型对照组相比都上升($t = 3.388, P = 0.0276$; $t = 6.944, P = 0.0023$)。而 ROCK-1 mRNA 相对表达量较高眼压视网膜相比都显著下降($t = 3.034, P = 0.0383$; $t = 5.162, P = 0.0067$)。

2.3 视网膜中 PERK/ROCK 信号通路作用抑制 为了探讨大黄酚对高血压大鼠治疗的作用机制,采用 Western-blot 检测大鼠视网膜中 p-PERK、PERK 和 ROCK-1 的蛋白水平(图3)。结果表明,相对于正常对照眼视网膜,高血压模型组中 p-PERK 蛋白表达水平显著增加($t = 2.951, P = 0.0419$),并且 PERK 蛋白表达也增加,但无统计学差异($t = 1.624, P = 0.2029$)。同时,ROCK-1 蛋白表达也大大上升($t = 7.167, P = 0.0056$)。在给药 6wk 后,与高血压模型相比,高低剂量组大鼠视网膜 p-PERK 蛋白($t = 4.935, P = 0.0078$; $t = 1.025, P = 0.413$)和 PERK 蛋白($t = 5.171, P = 0.0066$; $t = 2.106, P = 0.103$)都呈上升趋势,而 ROCK-1 蛋白表达却下降($t = 5.971, P = 0.004$; $t = 4.603, P = 0.012$)。

3 讨论

青光眼是具有病理性高血压合并视盘、视网膜神经纤维层损害及青光眼视野改变的一种致盲性眼病,而高血压是其病变的主要原因,其特征表现为视神经萎缩和视野缺损。视神经损伤是青光眼发病的一个重要因素,而视网膜神经节细胞的凋亡是青光神经病变的最终通路^[3]。蛋白激酶 R 样内质网激酶(PKR-like ER kinase, PERK)是内质网应激凋亡的一个重要途径,而内质网应激诱导的凋亡信号传导通路是细胞凋亡信号传导三大通路之一^[4]。细胞凋亡促成青光眼神经节细胞的丢失,而青光眼视网膜损伤的主要病理变化之一就是神经节细胞的减少。Rho 相关蛋白激酶(Rho associated kinase, ROCK)的主要功能是调节细胞肌动蛋白骨架的重组,从而广泛参与神经再生、细胞凋亡等一系列神经保护作用。最近,研究表明 ROCK 抑制剂能引起眼压下降和房水外流增加,在保护视网膜神经节细胞、降低眼内压以及改善眼部血流量等方面为青光眼的治疗提供了一个新的良好前景,并且其对于青光眼滤过性手术后瘢痕的形成也有减轻效果^[5]。

大黄酚是从廖科植物大黄中提取的主要有效成分之一,研究表明大黄酚具有止咳、抗菌、止血作用,并能促进肠管动物的神经兴奋和肌肉麻痹。它对于脑缺血再灌注小鼠脑中过氧化氢酶活性有增强作用,其具有明显的抗衰老作用^[6]。对于衰老小鼠的记忆障碍,大黄酚能增加脑组织超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性,改善被动回避性记忆障碍^[7]。近年来,大黄酚对于神经保护作用的研究越来越多。为此,本研究首次尝试探讨大黄酚对于视网膜的神经保护作用。

本研究通过构建经典的慢性眼压大鼠模型,通过测定

眼内压来判断高血压大鼠模型的构建情况。大鼠青光眼模型构建成功后,我们进一步考察了大黄酚对青光眼大鼠的保护作用,并探讨了大黄酚对青光眼保护的可能分子机制。实验结果表明,高血压大鼠在大黄酚灌胃给药 6wk 后,眼内压明显降低,提示其对于青光眼有一定的治疗效果。大鼠视网膜 PERK 蛋白磷酸化比例显著升高,相同的,ROCK-1 蛋白的表达在高血压大鼠视网膜中表达也明显增加,提示 PERK 蛋白磷酸化以及 ROCK 蛋白在青光眼的发病机制中发挥重要的作用。同时,mRNA 结果也显示出相同的趋势,PERK 和 ROCK-1 两者的 mRNA 表达水平在模型大鼠视网膜中也显著上升。由此我们可以推测,大黄酚可通过降低眼内压治疗青光眼,其机制之一可能是通过调控 PERK/ROCK 信号通路。最近,研究还表明青光眼引起的视神经萎缩,在眼压得到控制后仍有神经细胞的凋亡、视功能的损害,说明高血压不是视功能损害的唯一原因。视神经的血液供应和神经营养因子的补充也是影响青光眼治疗的重要原因。王树等^[8]发现大黄酚对于脑缺血再灌注小鼠有一定的保护作用,它能提高大鼠脑内的血流量。由于视神经的血液供应与脑血管都来自颈内动脉,大黄酚或许也能通过改善大鼠大脑血液供应从而增加视神经的血液供应来发挥其治疗青光眼的作用。除此之外,宋金艳等证实了大黄酚脂质体能提高脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,而 BDNF 保护视神经功能作用在体内、体外青光眼模型得到许多证实^[9]。关于大黄酚对青光眼大鼠保护作用的详细机制有待深入探讨。

参考文献

- 张旭,刘盛涛,易敬林. 青光眼视神经病变中远端轴突病变的研究进展. 中华眼科杂志 2014;50(5):391-394
- 颜娟,张丹参. 大黄酚神经保护作用及其机制研究进展. 神经药理学报 2012;6(2):52-57
- 成龙,王育良. 青光眼视功能保护的中医药研究进展. 国际中医中药杂志 2013;35(12):1136-1138
- Ji GR, Yu NC, Xue X, et al. PERK-mediated Autophagy in Osteosarcoma Cells Resists ER Stress-induced Cell Apoptosis. *Int J Biol Sci* 2015;11(7):803-812
- Kajikawa M, Noma K, Maruhashi T, et al. Rho-associated kinase activity is a predictor of cardiovascular outcomes. *Hypertension* 2014;63(4):856-864
- Lin F, Zhang C, Chen X, et al. Chrysophanol affords neuroprotection against microglial activation and free radical-mediated oxidative damage in BV2 murine microglia. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(3):3447-3455
- 沈丽霞,李淑娟,张丹参,等. 大黄酚对小鼠记忆障碍的作用及其机制分析. 中国药理学通报 2003;19(8):906-908
- 王树,张丹参,张力,等. 大黄酚对脑缺血再灌注小鼠记忆功能的保护作用. 中国老年学杂志 2009;29(15):1934-1936
- 谢钊,李翔. 脑源性神经营养因子对青光眼视神经保护的研究进展. 国际眼科杂志 2010;10(1):100-101