

青光安 II 号对慢性高眼压 SD 大鼠模型中视网膜 PAX6 和 Ngn1 及 Ngn2 mRNA 表达的影响

周亚莎¹, 徐 剑², 刘 悦², 彭 俊², 杨毅敬¹, 覃艮艳¹, 彭清华²

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273807); 湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目资助; 湖南省研究生科研创新项目(No. CX2017B426, CX2017B434); 国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目; 湖南省中医五官科学重点学科建设项目

作者单位:¹(410208)中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学中西医结合学院;²(410007)中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院眼科

作者简介:周亚莎, 硕士研究生, 助教, 研究方向: 青光眼、眼底病。

通讯作者:彭清华, 博士研究生, 二级教授, 主任医师, 研究方向: 青光眼、眼底病。pqh410007@126.com

收稿日期:2017-03-21 **修回日期:**2017-07-26

Effect of Qingguang'an II on expression of PAX6, Ngn1 and Ngn2 mRNA of rats with chronic high intraocular pressure

Ya-Sha Zhou¹, Jian Xu², Yue Liu², Jun Peng², Yi-Jing Yang¹, Gen-Yan Qin¹, Qing-Hua Peng²

Foundation items: Natural Science Foundation of China (No. 81273807); 225 Engineering Project of High Lever Health Professionals of Hunan Province; Research and Innovation Project for Graduate Students in Hunan(No. CX2017B426, CX2017B434); Key Discipline Project of State Administration of Traditional Chinese Medicine of Ophthalmology of TCM; Key Discipline Project of Hunan Province of Otorhinolaryngology of TCM

¹School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Correspondence to: Qing - Hua Peng. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. pqh410007@126.com

Received:2017-03-21 Accepted:2017-07-26

Abstract

• **AIM:** To remark the effect of Qingguang'an II on expression of PAX6, Ngn1, and Ngn2 mRNA of rats with chronic high intraocular pressure.

• **METHODS:** Totally 40 male SD rats were randomly divided into 6 groups, that was: A: blank group, B: model group, C: Qingguang'an II low dose group, D:

Qingguang'an II moderate dose group, E: Qingguang'an II high dose group, F: Yimaikang disket group. B, C, D, E, F groups of experimental rats were established the model of chronic high intraocular pressure (IOP) by cauterizing of superficial scleral vein. Animal model was established successfully by using monitoring IOP consistently keep above 25mmHg for 8wk as cut-off criterion. Tissues of Eyes were obtained after intragastric administration for 2wk and 4wk. The expressions of PAX6, Ngn1, and Ngn2 mRNA were investigated by Real-time PCR.

• **RESULTS:** At the time-point of 2wk, PAX6, Ngn1, and Ngn2 mRNA in group B were statistically expressed in lower level comparing with other groups ($P < 0.05$). Moreover, at the time-point of 4wk, PAX6, Ngn1, and Ngn2 mRNA in group C, D and E were statistically expressed in higher level comparing with group F ($P < 0.05$). Besides, PAX6, Ngn1, and Ngn2 mRNA in group C and D were statistically expressed in lower level comparing with group E ($P < 0.05$). PAX6, Ngn1, and Ngn2 mRNA in group C and D were expressed in similar level ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** In summar, Qingguang'an II and Yimaikang disket can remarkably increase the expressions of PAX6, Ngn1, and Ngn2, which suggest protecting the optic nerve of rats caused by chronic high IOP. What's more, this study indicated that, in the protection of optic nerve of rats with chronic high IOP, the high dose of Qingguang'an II at the time-point of 4wk was the better choice.

• **KEYWORDS:** Qingguang'an II; chronic high intraocular pressure; PAX6 mRNA; Ngn1 mRNA; Ngn2 mRNA

Citation: Zhou YS, Xu J, Liu Y, *et al.* Effect of Qingguang'an II on expression of PAX6, Ngn1 and Ngn2 mRNA of rats with chronic high intraocular pressure. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(9):1631-1634

摘要

目的: 观察青光安 II 号方对 SD 大鼠慢性高眼压模型中视网膜 PAX6、Ngn1 及 Ngn2 mRNA 表达影响。

方法: 将 40 只 80 眼雄性 SD 大鼠随机分成 6 组, 分别为: A 组(空白组)、B 组(模型组)、C 组(青光安 II 号方低剂量组)、D 组(青光安 II 号方中剂量组)、E 组(青光安 II 号方高剂量组)、F 组(益脉康分散片组)。将 B、C、D、E、F 五组实验大鼠采用烧灼巩膜表浅静膜法建立大鼠慢性

高眼压模型,术后监测眼压,使眼压维持在25mmHg以上持续2mo视为慢性高眼压造模成功。动物维持高眼压状态2mo后开始灌胃,灌胃后2、4wk分别处死,qPCR检测PAX6、Ngn1、Ngn2 mRNA的相对表达量。

结果:PCR结果显示:SD大鼠慢性高眼压模型成模灌胃2wk后,各组PAX6、Ngn1、Ngn2 mRNA表达量与B组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D、E、F组组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。SD大鼠慢性高眼压模型成模灌胃4wk后,C、D、E组与F组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。C、D组与E组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。C组与D组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

结论:青光安II号方及益脉康分散片均能增加PAX6、Ngn1、Ngn2 mRNA的相对表达量,对慢性高眼压大鼠视网膜神经节细胞有一定的保护作用;在对慢性高眼压大鼠视神经的保护中,青光安II号方高剂量灌胃后4wk时效果最优。

关键词:青光安II号方;慢性高眼压;PAX6 mRNA;Ngn1 mRNA;Ngn2 mRNA

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.9.06

引用:周亚莎,徐剑,刘悦,等.青光安II号对慢性高眼压SD大鼠模型中视网膜PAX6和Ngn1及Ngn2 mRNA表达的影响.国际眼科杂志2017;17(9):1631-1634

0 引言

青光眼(glaucoma)是一组产生特征性视神经损伤和视功能损害的不可逆性致盲眼病^[1],其发病迅速,病情凶险,危害性较大,已被世界卫生组织列为世界第二致盲性眼病^[2]。目前,通过药物、激光、手术等手段降低眼压是青光眼的主要治疗方法,然而,单纯的降低眼压并不能阻止青光眼导致的视神经损伤。因此,保护视神经一直以来都是国内外学者的研究热点。Wnt信号通路调节多种基因的转录,参与调控生物体的生长、发育及细胞的增殖、分化和凋亡等重要的生理病理过程,在神经退行性疾病中,经典Wnt信号通路发生改变影响神经元的增殖、分化或对神经元产生毒性作用,导致神经元功能损伤^[3]。基于肝肾亏虚、气虚血瘀的病理机制,彭清华教授结合自己多年的临床经验创制了青光安II号方。本实验观察了青光安II号方对慢性高眼压大鼠视网膜中PAX6、Ngn1、Ngn2 mRNA表达的变化,为青光眼视神经损伤提供一种新的中医药治疗方法,并为中医药治疗视网膜视神经疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠40只(实验动物质量合格证:No.43004700016136),2~3月龄,由湖南中医药大学动物实验中心提供,体质量180~200g。所做实验符合动物保护条例。

1.1.2 药品与试剂 复方中药青光安II号:由补肾活血中药组成,制成浸膏。益脉康分散片:湖南湘雅制药有限公司,国药准字:Z20080073,规格:每片重0.4g。妥布霉素地塞米松滴眼液:齐鲁制药有限公司,国药准字:

H20020497。妥布霉素地塞米松眼膏:s.a. ALCON-COUREUR n.v.进口药品注册证号:H20130743。逆转录试剂盒(北京康为世纪),EDTA(Sigma公司),Tris(Sigma公司),Trizol(Invitrogen公司),引物(南京金斯瑞公司),Taq酶(Genstar公司),DL2000 DNA Marker(Genstar公司),dNTP(Genstar公司),SYBGREEN PCR Mix(Invitrogen公司)。

1.1.3 主要仪器 Tono-Pen(美国Reichert公司,型号:AVIA),数码医学图像分析系统(深圳市深沉恒科技有限公司,型号:Motic 6.0),荧光定量RCP仪(Thermo公司,型号:PIKO REAL 96)。

1.2 方法

1.2.1 慢性高眼压动物模型的建立及分组方法 参照汪建涛等^[4]烧灼表浅巩膜静脉方法造模。将40只大鼠随机抽取6只作为A组:空白组,剩余34只建立大鼠慢性高眼压模型。术后眼压持续在25mmHg以上2mo视为造模成功,若术后眼压未见上升,或上升后回降,则进行二次造模。若第二次造模也失败,则将造模失败鼠剔除本次实验研究范围。最终有30只大鼠造模成功,将其随机分为:B组:模型组;C组:青光安II号低剂量组;D组:青光安II号中剂量组;E组:青光安II号高剂量组;F组:益脉康分散片组,每组6只。A、B组以生理盐水12mL/kg灌胃;C组灌胃量为6.75g/(kg·d)(按“人-动物体表面积等效剂量比值表”折算,相当于成人等效剂量);D组为13.5g/(kg·d)(相当于成人2倍等效剂量);E组为27g/(kg·d)(相当于成人4倍等效剂量);F组每只灌胃0.22g/(kg·d)。每组均灌胃2wk,1次/d。

1.2.2 取材 分别于灌胃后的第2、4wk将大鼠麻醉,摘除双眼球。在解剖显微镜下去除眼前节及玻璃体,用显微镊子剥离出视网膜组织,保存于-80℃冰箱中,供qPCR检测PAX6 mRNA、Ngn1 mRNA及Ngn2 mRNA。

1.2.3 PCR检测 Trizol提取总RNA,30μL反应体系进行RNA反转录,在NCBI上搜索目的基因的序列,运用primer5软件设计引物,由南京金斯瑞生物科技公司合成引物。Ngn1-F:5'-CGGCCAGCGATACAGAGT-3',Ngn1-R:5'-GTACGGGATGAAGCAGGCT-3',产物长度:191bp。Ngn2-F:5'-AGGCTCAAGGCCAACAAC-3',Ngn2-R:5'-GGAGGAAGGTGGAGAAGG-3',产物长度:288bp。PAX6-F:5'-TGGGCAGGTATTACGAGA-3',PAX6-R:5'-GTCTGTCCGTTTCAGCATC-3',产物长度:289bp。30μL体系行实时定量PCR,定量PCR扩增程序50℃ 2min,95℃ 10min;95℃ 5s,60℃ 30s,循环40次。2^{-ΔΔCt}法计算相对表达量。

统计学分析:采用SPSS22.0软件进行实验数据分析。实验结果所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。资料满足正态性和方差齐性,采用单因素方差分析进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD大鼠慢性高眼压模型视网膜PAX6 mRNA相对表达量变化情况 SD大鼠慢性高眼压模型成模灌胃2wk后,各组PAX6 mRNA表达量均高于B组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D、E、F各组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。SD大鼠慢性高眼压模型成模灌胃4wk后,各组PAX6 mRNA表达量均高于B组,差异有统

表1 不同时间各组 PAX6 mRNA 相对表达量

时间	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组
灌胃 2wk 后	0.78±0.15 ^a	0.28±0.06	0.49±0.65 ^a	0.43±0.10 ^a	0.62±0.12 ^a	0.47±0.03 ^a
灌胃 4wk 后	0.81±0.11 ^c	0.26±0.47	0.58±0.06 ^{c,e,g}	0.58±0.53 ^{c,e,g}	0.71±0.47 ^{c,e}	0.48±0.11 ^c

注:A 组:空白组;B 组:模型组;C 组:青光安 II 号方低剂量组;D 组:青光安 II 号方中剂量组;E 组:青光安 II 号方高剂量组;F 组:益脉康分散片组。^a $P<0.05$ vs B 组;^c $P<0.05$ vs B 组;^e $P<0.05$ vs F 组;^g $P<0.05$ vs E 组。

表2 不同时间各组 Ngn1 mRNA 相对表达量

时间	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组
灌胃 2wk 后	1.82±1.67 ^a	0.67±0.18	1.05±0.10 ^a	1.11±0.11 ^a	1.15±0.97 ^a	1.06±0.09 ^a
灌胃 4wk 后	1.89±0.51 ^c	0.56±0.16	1.23±0.16 ^{c,e,g}	1.25±0.11 ^{c,e,g}	1.58±0.13 ^{c,e}	0.96±0.16 ^c

注:A 组:空白组;B 组:模型组;C 组:青光安 II 号方低剂量组;D 组:青光安 II 号方中剂量组;E 组:青光安 II 号方高剂量组;F 组:益脉康分散片组。^a $P<0.05$ vs B 组;^c $P<0.05$ vs B 组;^e $P<0.05$ vs F 组;^g $P<0.05$ vs E 组。

表3 不同时间各组 Ngn2 mRNA 相对表达量

时间	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组
灌胃 2wk 后	1.65±0.36 ^a	0.59±0.10	0.92±0.14 ^a	0.99±0.14 ^a	1.04±0.25 ^a	0.97±0.15 ^a
灌胃 4wk 后	1.71±0.32 ^c	0.53±0.11	1.13±0.10 ^{c,e,g}	1.15±0.20 ^{c,e,g}	1.45±0.10 ^{c,e}	0.82±0.19 ^c

注:A 组:空白组;B 组:模型组;C 组:青光安 II 号方低剂量组;D 组:青光安 II 号方中剂量组;E 组:青光安 II 号方高剂量组;F 组:益脉康分散片组。^a $P<0.05$ vs B 组;^c $P<0.05$ vs B 组;^e $P<0.05$ vs F 组;^g $P<0.05$ vs E 组。

计学意义($P<0.05$);C、D、E 组 PAX6 mRNA 表达量均高于 F 组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D 组均低于 E 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。C 组与 D 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。说明灌药 4wk 后,青光安 II 号方高剂量在促进 PAX6 释放的作用上优于低、中剂量及益脉康分散片(表 1)。扩增曲线见图 1,熔解曲线见图 2。

2.2 SD 大鼠慢性高眼压模型视网膜上 Ngn1 mRNA 相对表达量变化情况 SD 大鼠慢性高眼压模型成模灌胃 2wk 后,各组 Ngn1 mRNA 表达量均高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D、E、F 各组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。SD 大鼠慢性高眼压模型成模灌胃 4wk 后,各组 Ngn1 mRNA 表达量均高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D、E 组 Ngn1 mRNA 表达量均高于 F 组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D 组均低于 E 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。C 组与 D 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。说明灌药 4wk 后,青光安 II 号方高剂量在促进 Ngn1 释放的作用上优于低、中剂量及益脉康分散片(表 2)。扩增曲线见图 3,熔解曲线见图 4。

2.3 SD 大鼠慢性高眼压模型视网膜 Ngn2 mRNA 相对表达量变化情况 SD 大鼠慢性高眼压模型成模灌胃 2wk 后,各组 Ngn2 mRNA 表达量均高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D、E、F 各组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。SD 大鼠慢性高眼压模型成模灌胃 4wk 后,各组 Ngn2 mRNA 表达量均高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D、E 组 Ngn2 mRNA 表达量均高于 F 组,差异有统计学意义($P<0.05$);C、D 组均低于 E 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。C 组与 D 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。说明灌药 4wk 后,青光安 II 号方高剂量在促进 Ngn2 释放的作用上优于低、中剂量及益脉康分散片(表 3)。扩增曲线见图 5,熔解曲线见图 6。

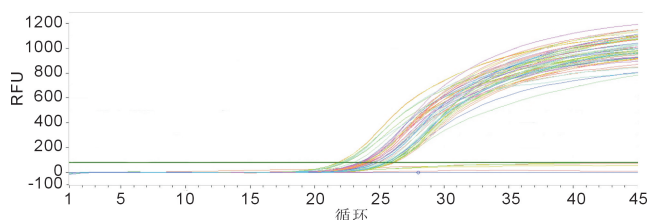


图1 PAX6 扩增曲线。

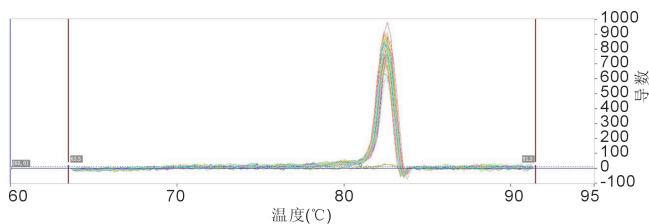


图2 PAX6 熔解曲线。

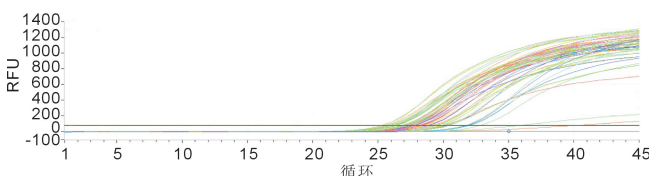


图3 Ngn1 扩增曲线。

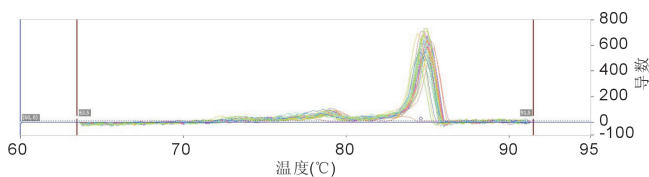


图4 Ngn1 熔解曲线。

3 讨论

青光眼视神经损害的病理基础是神经节细胞及其纤维的丧失,其机制是由于青光眼视神经的原发损伤激发了细胞内或细胞外的自我损伤过程^[5]。青光眼治疗的最终目的是减少视神经损害,提高视功能。

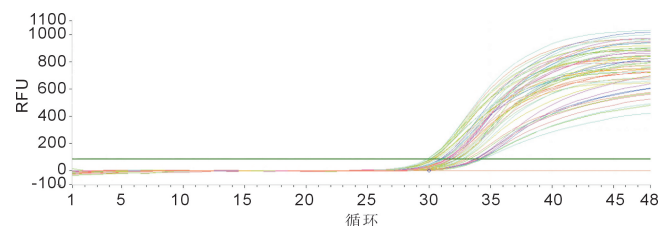


图5 Ngn2 扩增曲线。

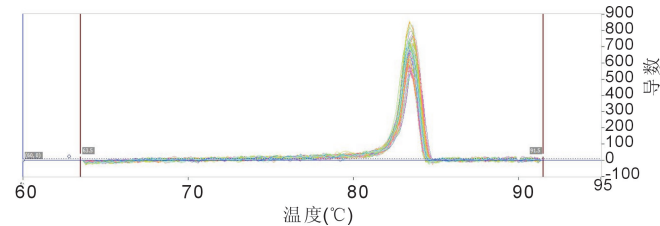


图6 Ngn2 熔解曲线。

Wnt 信号通路分为经典 Wnt 信号通路 (canonical Wnt signal pathway, 即 Wnt/ β -catenin 信号途径) 和非经典 Wnt 信号通路 (noncanonical Wnt signal pathway)^[6]。激活 Wnt/ β -catenin 信号传导途径, 可促进神经干细胞增殖分化, 尤其是在促进神经干细胞向神经元分化的过程中发挥主要作用^[7]。近年来的研究发现, Wnt 信号通路可能参与了多种眼部疾病的发生和发展。Wnt/ β -catenin 信号通路的活性与视盘形态构建关系密切^[8-9]。Seitz 等^[10]通过对视神经缺血和青光眼患者的临床观察及相关动物实验研究发现: 重组 Norrin 蛋白无需任何翻译后修饰即可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 提高视网膜神经节细胞的存活率。因此, 研究经典 Wnt 信号通道与神经退行性疾病的发病机制及其与治疗的关系有重要意义。

有研究表明^[11], 通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 可进一步激活 β -catenin 活性, 在体外发挥减少神经元凋亡的作用。PAX6、神经源素 (Neurogenin, Ngn) 1 及 Ngn2 是 Wnt/ β -catenin 信号通路中重要的下游基因。PAX6 基因是眼发育过程中的重要调控基因^[12-13], 其异常表达会引起各种眼病, 包括先天性视神经发育异常等^[14]。Azuma 等^[15]通过分析 155 例各种先天性视神经异常患者的 Pax6 基因表达, 发现牵牛花综合征、视神经发育不良、大的视神经凹陷伴永存原始玻璃体增生均存在 Pax6 基因突变。因此, 我们推测 Wnt/ β -catenin 信号通路可能通过调控 Pax6、Ngn1 及 Ngn2 的表达来抑制神经元的凋亡, 从而起到保护神经的作用。

目为肝窍, 目内房水流通之道亦为窍道之一, 目之所以能够视物, 肝气的疏泄适度和肝血的充盈畅达是其主要保障, 故肝的功能活动正常与否可以反映于目, 眼病也多从肝辨治。肾藏精, 精生髓, 髓通于脑, 目系内通于脑, 精是人体各种机能活动的物质基础。肾精充沛, 则髓海丰满, 思维敏捷, 目光炯炯有神, 《审视瑶函》: “真精者……先起于肾, 次施于胆, 而后及乎瞳神也, 凡此数者, 一有所

损, 目病生矣”。气阴亏损目之窍道无力以通, 肝肾亏虚则无物以养目而视物不清。导师彭清华教授研究青光眼相关课题数十年, 认为青光眼患者视神经损伤的病理机制主要为肝肾亏虚, 气虚血瘀, 并基于该病理机制, 结合自己多年的临床经验创制了以滋补肝肾, 益气活血为治则的青光安 II 号方。本研究中使用的青光安 II 号方由枸杞子、灯盏细辛等补肾活血中药组成, 本方补通兼施, 使目窍通畅, 气血调和, 则诸症俱解。

本实验成功建立了慢性高血压大鼠模型, 维持高血压状态 8wk 后开始用青光安 II 号方及益脉康分散片进行干预, 并与模型组进行比较, 灌胃 2、4wk 后分时段取材。该实验研究表明: (1) 青光安 II 号方及益脉康分散片可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 上调 PAX6、Ngn1、Ngn2 mRNA 的相对表达量, 从而发挥保护视神经的作用。(2) 通过实验观察可初步说明在对慢性高血压大鼠视神经的保护中, 青光安 II 号方高剂量灌胃后 4wk 时效果最优。

参考文献

- 葛坚. 眼科学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社 2014; 241-144
- 黄胜. 原发性青光眼基础临床研究进展与发展趋势. 中国实用眼科杂志 2011; 29(3): 199-204
- 张彩霞, 管英俊, 陈燕春, 等. 经典 Wnt 信号通路与神经退行性疾病关系的研究进展. 解剖科学进展 2013; 19(1): 96-99
- 汪建涛, 许迅, Alfredo A. Sadun, 等. 大鼠慢性高血压诱导视神经损伤的研究. 上海交通大学学报(医学版) 2008; 28(6): 622-625
- 赵秀军, 徐亮. 青光眼视神经损害与保护研究的最新进展. 眼科 2000; 9(2): 362-365
- Verkaar F, Zaman GJ. New avenues to target Wnt/ β -catenin signaling. *Drug Discov Today* 2011; 16(12): 35-41
- Daneman R, Agalliu D, Ghou L. Wnt/A-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(2): 641-646
- Bankhead EJ, Colasanto MP, Dyorich KM, et al. Multiple requirements of the focal dermal hypoplasia gene porcupine during ocular morphogenesis. *Am J Pathol* 2015; 185(1): 197-213
- Hagglund AC, Berghard A, Carlsson L. Canonical Wnt/ β -catenin signalling is essential for optic cup formation. *PLoS One* 2013; 8: e81158
- Seitz R, Hackl S, Seibuchner T, et al. Norrin Mediates Neuroprotective Effects on Retinal Ganglion Cells via Activation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and the Induction of Neuroprotective Growth Factors in Müller Cells. *J Neurosci* 2010; 30(17): 5998-6010
- 卢志有, 林斌. 信号通路与脊髓损伤后神经细胞修复研究进展. 中国脊柱脊髓杂志 2011; 21(7): 610-614
- Tsonis PA, Fucntes EJ. Focus on molecules: PAX6, the eye master. *Exp Eye Res* 2006; 83(2): 233-234
- Kozmik Z. PAX genes in eye development and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(4): 430-438
- 刘旭阳, 傅涛, 王宁利. PAX6 基因与眼发育异常. 国外医学眼科学分册 2004; 28(4): 217-220
- Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, et al. Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic-nerve malformations. *Am J Hum Genet* 2003; 72(6): 1565-1570