

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research青葙苷 I 通过调节 ROS 介导线粒体凋亡途径
对视神经损伤模型大白兔节细胞的保护作用Protective effects of Celosin I on rabbit ganglion cells in optic nerve injury model
by regulating ROS mediated mitochondrial apoptosis pathway韩易言^{1,2}, 郑 曲^{1,2,3},
赵 磊⁴, 董宝强^{1,2}, 左 韬^{1,4}

(1. 辽宁中医药大学 针灸推拿学院, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁省针灸养生康复重点实验室, 辽宁 沈阳 110847; 3. 辽宁省教育厅针灸生物学重点实验室, 辽宁 沈阳 110847; 4. 辽宁中医药大学 第二临床学院, 辽宁 沈阳 110034)

HAN Yi - yan^{1,2}, ZHENG Qu^{1,2,3},
ZHAO Lei⁴, DONG Bao - qiang^{1,2},
ZUO Tao^{1,4}

(1. College of Acupuncture and Moxibustion Massage, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning Province, China; 2. Key Laboratory of Acupuncture and Moxibustion Health and Rehabilitation, Shenyang 110847, Liaoning Province, China; 3. Key Laboratory of Acupuncture and Moxibustion Biology, Department of Education of Liaoning Province, Shenyang 110847, Liaoning Province, China; 4. Second Clinical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, Liaoning Province, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104714); 国家资助博士后研究人员计划基金资助项目 (GZC20231025); 国家中医药管理局中药循证能力建设基金资助项目 (2019XZZX - YK008); 辽宁省教育厅青年基金资助项目 (JYTQN2023458); 辽宁省辽派中医学术经验和技能活态传承基金资助项目; 辽宁省针灸养生康复重点实验室基金资助项目 (18 - 006 - 0 - 06); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金资助项目 (zyzx2410)

作者简介: 韩易言 (1993 -), 女, 讲师, 主要从事神经损伤修复与再生的相关研究

通信作者: 左韬, 教授, 主任医师, 博士生导师
Tel: (024) 86803333
E - mail: ykzt208@163.com

摘要:目的 探究青葙苷 I 通过调节活性氧 (ROS) 介导线粒体凋亡途径对视网膜节细胞保护作用机制。方法 将 24 只新西兰大白兔随机分为假手术组、模型组、对照组和实验组, 每组 6 只。假手术组仅切开球结膜并缝合, 其他 3 组用视神经钳夹伤构建视神经损伤模型。假手术组和模型组均给予等体积 0.9% NaCl; 对照组给予 0.15 mg · kg⁻¹ 甲钴胺溶液; 实验组给予剂量 30 mg · kg⁻¹ 青葙苷 I 溶液。4 组新西兰大白兔每日灌胃给药 1 次, 连续给药 4 周。用 Tunnel 法检测视网膜节细胞的凋亡情况, 用免疫荧光法检测视网膜组织中 ROS、超氧化物歧化酶 (SOD) 和胱天蛋白酶 (caspase) 的表达情况, 用蛋白质印迹法检测视网膜组织中 B 淋巴细胞瘤 - 2 基因 (Bcl - 2)、Bcl - 2 样蛋白 1 (Bcl - xl)、Bcl - 2 相关 X 蛋白 (Bax) 和细胞色素 C (CytC) 蛋白的表达水平。结果 干预 4 周后, 实验组、对照组、模型组和假手术组的节细胞凋亡率分别为 (7.65 ± 1.20)%、(11.65 ± 1.29)%、(17.66 ± 0.93)% 和 (0.97 ± 0.14)%, ROS 表达水平分别为 6.14 ± 0.57、8.25 ± 0.96、16.51 ± 1.07 和 2.05 ± 0.23, SOD 表达水平分别为 2.45 ± 0.33、1.48 ± 0.23、0.74 ± 0.13 和 3.19 ± 0.30, caspase 3 表达水平分别为 8.55 ± 1.11、12.68 ± 0.92、18.74 ± 1.97 和 3.08 ± 0.20, caspase 9 表达水平分别为 3.69 ± 1.20、7.79 ± 1.13、12.81 ± 1.72 和 2.31 ± 0.30, Bcl - 2 蛋白相对表达水平分别为 0.46 ± 0.02、0.64 ± 0.07、0.77 ± 0.05 和 0.20 ± 0.03, Bcl - xl 蛋白相对表达水平分别为 0.46 ± 0.05、0.61 ± 0.05、0.78 ± 0.03 和 0.20 ± 0.03, Bax 蛋白相对表达水平分别为 0.50 ± 0.07、0.69 ± 0.18、0.82 ± 0.13 和 0.14 ± 0.04, CytC 蛋白相对表达水平分别为 0.43 ± 0.15、0.80 ± 0.14、1.08 ± 0.19 和 0.26 ± 0.07。实验组的上述指标与对照组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 青葙苷 I 通过降低视神经损伤模型视网膜组织 ROS 水平, 抑制节细胞线粒体凋亡相关蛋白的表达, 从而减少视网膜节细胞凋亡。

关键词: 青葙苷 I; 活性氧; 线粒体凋亡; 视神经损伤模型; 节细胞

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.07.015

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)07-0977-06

Abstract: Objective To explore the protective mechanism of Celosin I on retinal ganglion cells by regulating reactive oxygen species (ROS) mediated mitochondrial apoptosis pathway. **Methods** Twenty - four New Zealand white rabbits were randomly divided into sham - operation, model, control and experimental groups, with 6 rabbits per group. The sham - operation group only had the bulbar conjunctiva cut and sutured, the other 3 groups were received with optic nerve clamp injury to construct the optic nerve injury model. The sham - operation and model groups

were given equal volumes of physiological saline by gavage, the control group was given a dose of $0.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ mecobalamine solution by gavage, and the experimental group was given a dose of $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Celosin I solution by gavage. Four groups were administered a daily gavage treatment for four consecutive weeks. The Tunnel method was used to detect apoptosis of retinal ganglion cells, and immunofluorescence was employed to detect the expression of ROS, superoxide dismutase (SOD) and caspase in retinal tissues. The expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-like protein 1 (Bcl-xl), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cytochrome C (CytC) proteins in retinal tissues were assessed using Western blotting. **Results** After four weeks of intervention, the apoptosis rates of ganglion cells in the experimental, control, model and sham-operated groups were $(7.65 \pm 1.20)\%$, $(11.65 \pm 1.29)\%$, $(17.66 \pm 0.93)\%$ and $(0.97 \pm 0.14)\%$; the expression levels of ROS in retinal tissues were 6.14 ± 0.57 , 8.25 ± 0.96 , 16.51 ± 1.07 and 2.05 ± 0.23 ; the expression levels of SOD were 2.45 ± 0.33 , 1.48 ± 0.23 , 0.74 ± 0.13 and 3.19 ± 0.30 ; the expression levels of caspase-3 were 8.55 ± 1.11 , 12.68 ± 0.92 , 18.74 ± 1.97 and 3.08 ± 0.20 ; the expression levels of caspase-9 were 3.69 ± 1.20 , 7.79 ± 1.13 , 12.81 ± 1.72 and 2.31 ± 0.30 ; the relative expression levels of Bcl-2 were 0.46 ± 0.02 , 0.64 ± 0.07 , 0.77 ± 0.05 and 0.20 ± 0.03 ; the relative expression levels of Bcl-xl were 0.46 ± 0.05 , 0.61 ± 0.05 , 0.78 ± 0.03 , and 0.20 ± 0.03 ; the relative expression levels of Bax were 0.50 ± 0.07 , 0.69 ± 0.18 , 0.82 ± 0.13 and 0.14 ± 0.04 ; the relative expression levels of CytC were 0.43 ± 0.15 , 0.80 ± 0.14 , 1.08 ± 0.19 and 0.26 ± 0.07 . The differences in the aforementioned indicators in the experimental group compared with control group were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Celosin I reduces ROS levels in retinal tissue of a model of optic nerve injury, inhibits the expression of mitochondrial apoptosis related proteins in retinal ganglion cells, and reduces retinal ganglion cell apoptosis.

Key words: Celosin I; reactive oxygen; mitochondrial apoptosis; model of optic nerve injury; ganglion cell

视神经损伤(optic nerve injury, ONI)是导致视力损失的主要原因之一^[1-2]。据统计,在闭合性头部损伤中有0.5%~5.0%的病例伴有 ONI,主要影响青壮年人群^[3]。尽管 ONI 的病理生理机制尚未完全明确,普遍认为视神经受损后,轴突数量减少,神经元凋亡反应启动,导致视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)发生细胞凋亡^[4-5],因此,预防 RGCs 凋亡是防止 ONI 后退行性变化的重要策略^[6]。青葙子是眼科常用的中药材,性味苦寒,归肝经,具有清热泻火、明目退翳的功效,常用于治疗目赤肿痛、角膜炎、虹膜睫状体炎等症。现代研究显示,青葙苷 I 是其主要有效成分,具有抗氧化、降脂和保肝作用^[7-8]。本研究通过建立 ONI 模型,旨在探讨青葙苷 I 对 ONI 模型大白兔 RGCs 的保护机制。

材料与方法

1 材料

动物 SPF 级新西兰大白兔,兔龄 12 周,体质量 $2.0 \sim 2.5 \text{ kg}$,沈阳腾华生物技术有限公司提供。动物许可证号:SYXK(辽)2019-0004。本实验经辽宁中医药大学附属第二医院实验动物伦理委员会批准(伦

理批号:L31201)。

药品与试剂 青葙苷 I,规格:每瓶 100 mg,含量: $\geq 98\%$,批号:B2330,甲钴胺,规格:每瓶 100 mg,含量: $\geq 96\%$,批号:B33816,均购自上海源叶生物科技有限公司。细胞凋亡与坏死检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司生产;B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 样蛋白 1(B-cell lymphoma-2-like protein 1, Bcl-xl)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、细胞色素 C(cytochrome C, CytC)、胱天蛋白酶(caspase)9、caspase 3 抗体,均由英国 Abcam 公司生产。

仪器 BX53 荧光显微镜,日本 Olympus 公司产品;MB-530 多功能酶标分析仪,深圳市汇松科技发展有限公司产品;VE-186 电泳仪,上海天能生命科学有限公司产品。

2 实验方法

2.1 溶液配制

青葙苷 I 溶液配制 称取青葙苷 I 30 mg,溶于 0.9% NaCl 100 mL 中,制成 30% 青葙苷 I 溶液。

甲钴胺溶液配制 称取甲钴胺 30 mg,溶于 0.9% NaCl 200 mL 中,制成质量浓度为 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲钴胺溶液。

2.2 模型构建^[5]

新西兰大白兔腹腔注射 $1\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 20% 乌来糖麻醉后,固定于手术台上,头部旋向左侧。在双目显微镜下,上下睑外侧设置牵引缝线以牵开上下睑;剪开球结膜,在上直肌及上斜肌止端处安置牵引缝线,将眼球向眶前外下方向牵引,锐性分离球后软组织以暴露视神经,向深部分离视神经约 5 mm,在球后 3 mm 处用动脉瘤夹夹闭 20 s,用 1 mL 注射器针头在显微镜下分离视神经外鞘包膜组织,实现视神经减压,缝合球结膜。致伤眼直接对光反应消失,间接反射存在,瞳孔散大固定认定为 ONI 模型构建成功。假手术组仅切开球结膜并缝合。

2.3 动物分组与给药方法

将新西兰大白兔按随机数表法分为假手术组、模型组、对照组和实验组,每组 6 只。假手术组仅切开球结膜并缝合,其他 3 组按“2.2”的方法用视神经钳夹伤构建 ONI 模型。造模成功后,假手术组和模型组均给予等体积 0.9% NaCl;对照组给予 $0.15\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲钴胺溶液;实验组给予剂量 $30\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 青箱苷 I 溶液。4 组新西兰兔每日灌胃给药 1 次,连续给药 4 周。

2.4 内窥镜检查各组大白兔眼底情况^[9]

大白兔用平板固定后,儿科开睑器撑开眼睑,用盐酸丙美卡因滴眼液 2~3 滴进行表面麻醉,麻醉后,用复方托吡卡胺滴眼液散瞳,当瞳孔散大后,持耳鼻喉内窥镜(镜头直径 3.2 mm)观察大白兔眼底,调整探头方向,选择合适角度及距离进行眼底观察,并拍照记录。

2.5 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法检测各组大白兔视网膜的病理变化^[10]

石蜡切片经过烘烤、脱蜡、水化处理,依照试剂盒的说明书,依次进行染色步骤:用苏木素染液染色 5 min,用 1% 盐酸乙醇进行分化处理 10 s,1% 氨水进行返蓝处理 30 s,以及伊红染液染色 3 min。每个步骤后,用自来水冲洗切片 1 min。按照常规方法,用梯度浓度的乙醇进行脱水,二甲苯进行透明化处理,最后用中性树胶进行封固,封固后的组织切片通过光学显微镜在 400 倍放大下观察,观察视网膜的形态。

2.6 Tunel 法检测各组大白兔视网膜节细胞的凋亡情况^[11]

用 TUNEL 试剂盒检测视网膜节细胞凋亡情况,在光学显微镜下对切片进行观察,并用图像分析系统对视网膜节细胞凋亡情况进行定量分析,计算出节细

胞凋亡率。

2.7 免疫荧光法检测视网膜组织中活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和 caspase 的表达情况^[12]

制备视网膜的石蜡切片,烘烤、脱蜡、水化处理后,用高温低火进行抗原修复,吸去切片上的多余水分,在切片上滴加山羊血清,避光条件下滴加 1:100 稀释的一抗(ROS、SOD 以及 caspase 3、9 抗体),在 4℃ 下孵育过夜。孵育后,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)清洗切片,在避光条件下滴加 1:200 稀释的荧光二抗以及 4',6-二脒基-2-苯基吲哚盐(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI),继续在避光条件下孵育 1 h。孵育结束后,吸去切片上的液体,滴加抗荧光淬灭剂,最后进行常规封片处理。封片完成后,在荧光显微镜下观察并拍摄染色效果,用 Image J 软件对 ROS、SOD 和 caspase 3、9 的表达水平进行分析。

2.8 蛋白质印迹法检测视网膜组织 Bcl-2、Bcl-xl、Bax、CytC 和 caspase 蛋白的表达水平^[13]

通过液氮研磨及冰上裂解处理视网膜组织后,在 4℃ 下,以 $1.2 \times 10^4\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上层蛋白,加入相当于其体积 1/4 的 5×蛋白上样缓冲液,在 100℃ 下加热 10 min,冷却后备用。取蛋白样本 30 μg,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 PVDF 膜 2 h,后用 TBST 洗涤。将 PVDF 膜置于 1:1 000 稀释的一抗(Bcl-2、Bcl-xl、Bax、CytC 和 caspase 3、9)和 1:5 000 稀释的 β -actin 一抗中,在 4℃ 下孵育 18 h。TBST 洗涤 PVDF 膜后,将其置于 1:1 000 稀释的二抗中,在 4℃ 下孵育 2 h,再次用 TBST 洗涤。最终,将 ECL 化学发光液滴加在 PVDF 膜表面,用化学发光成像系统进行曝光并采集图像,以 β -actin 为内参,计算目的蛋白的相对表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用配对样本 *t* 检验;计数资料用率(%)表示,比较用单因素方差分析。

结 果

1 4 组新西兰大白兔的眼底情况

实验组给予剂量 $30\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 青箱苷 I 溶液;对照组给予 $0.15\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲钴胺溶液;假手术组和模

型组均给予等体积0.9% NaCl。

假手术组大白兔眼底表现正常,视网膜中心可见视盘结构,颜色偏红,中心动脉处可见视盘结构,颜色偏红,没有黄斑结构,眼底血供丰富,红润。模型组可见眼底血供减少,整个视野下呈现灰白色,血流减少,中心动脉血流减少、血管变细。对照组与实验组治疗后可见眼底血流增加,对照组中心动脉血流仍较假手术组血管直径细,视野颜色呈现淡红色,视盘淡红色;实验组可见血管直径恢复,血流正常,视野呈现粉红色,视盘颜色正常。结果见图1。

2 4组新西兰大白兔的视网膜情况

HE染色结果显示:假手术组大白兔视网膜切片未见明显异常,RGCs排列整齐,细胞形态规则,细胞核呈均匀蓝染,形态规律,呈卵圆形;模型组大白兔视网膜组织结构明显异常,RGCs数量减少、排列紊乱,细胞核存在皱缩浓染,RGCs胞体或出现肿胀或出现皱缩,细胞间隙增大;对照组与实验组视网膜组织结构及RGCs损伤均有所改善,RGCs数量增多,细胞形

态恢复规则,细胞核呈均匀蓝染,形态规律,呈卵圆形。对照组仍存在部分RGCs形态异常、染色不均匀;实验组的RGCs总体数量较对照组增多,RGCs形态异常较少,染色均匀。结果见图2。

3 4组新西兰大白兔视网膜的节细胞凋亡情况和ROS、SOD及caspase的表达情况

实验组与对照组的凋亡率和ROS、caspase 3、caspase 9表达水平均较模型组明显降低,SOD表达水平较模型组明显升高(均 $P<0.05$);实验组的上述指标与对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结果见表1。

4 4组新西兰大白兔视网膜组织中Bcl-2、Bcl-xl、Bax、CytC和caspase蛋白的表达情况

实验组、对照组、模型组和假手术组的Bcl-2蛋白相对表达水平分别为 0.46 ± 0.02 、 0.64 ± 0.07 、 0.77 ± 0.05 和 0.20 ± 0.03 ,Bcl-xl蛋白相对表达水

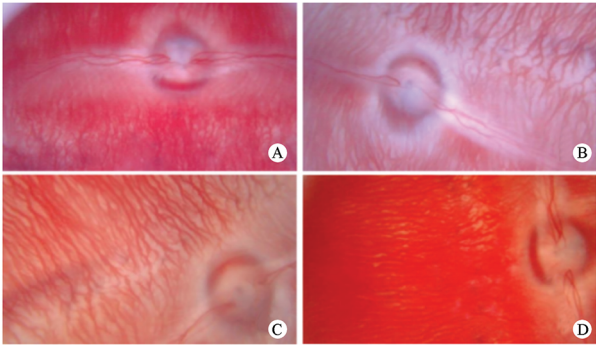


图1 4组新西兰大白兔的眼底情况(×200)

Figure 1 Eye fundus condition of four groups (×200)

A: Sham-operation group, 0.9% NaCl; B: Model group, 0.9% NaCl; C: Control group received $0.15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ methylcobalamin solution; D: Experimental group received $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Celosin I solution.

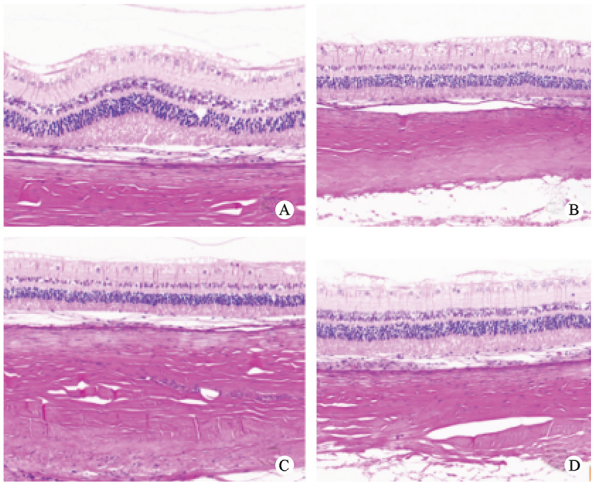


图2 4组新西兰大白兔的视网膜染色结果(苏木精-伊红染色,×400)

Figure 2 Retinal staining results of four groups (hematoxylin-eosin staining, ×400)

A-D refer to figure 1.

表1 4组新西兰大白兔视网膜节细胞凋亡情况和活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)和胱天蛋白酶(caspase)表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of apoptosis rates of retinal ganglion cells and expression levels of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and caspase among 4 groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Apoptosis rate(%)	ROS	SOD	Caspase 3	Caspase 9
Sham-operation	6	0.97 ± 0.14	2.05 ± 0.23	3.19 ± 0.30	3.08 ± 0.20	2.31 ± 0.30
Model	6	17.66 ± 0.93	16.51 ± 1.07	0.74 ± 0.13	18.74 ± 1.97	12.81 ± 1.72
Control	6	$11.65\pm1.29^*$	$8.25\pm0.96^*$	$1.48\pm0.23^*$	$12.68\pm0.92^*$	$7.79\pm1.13^*$
Experimental	6	$7.65\pm1.20^{* \#}$	$6.14\pm0.57^{* \#}$	$2.45\pm0.33^{* \#}$	$8.55\pm1.11^{* \#}$	$3.69\pm1.20^{* \#}$

Dose refer to figure 1; Compared with model group, $^*P<0.05$; Compared with control group, $^{\#}P<0.05$; ROS: Reactive oxygen species; SOD: Superoxide dismutase.

平分别为 0.46 ± 0.05 、 0.61 ± 0.05 、 0.78 ± 0.03 和 0.20 ± 0.03 , Bax 蛋白相对表达水平分别为 0.50 ± 0.07 、 0.69 ± 0.18 、 0.82 ± 0.13 和 0.14 ± 0.04 , CytC 蛋白相对表达水平分别为 0.43 ± 0.15 、 0.80 ± 0.14 、 1.08 ± 0.19 和 0.26 ± 0.07 , caspase 3 蛋白相对表达水平分别为 0.58 ± 0.08 、 0.91 ± 0.13 、 1.17 ± 0.17 和 0.32 ± 0.05 , caspase 9 蛋白相对表达水平分别为 0.59 ± 0.14 、 0.76 ± 0.11 、 1.23 ± 0.13 和 0.40 ± 0.08 。实验组和对照组视网膜组织中的上述蛋白相对表达水平均较模型组显著降低 (均 $P < 0.05$); 实验组视网膜组织中的上述蛋白相对表达水平与对照组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结果见图 3。

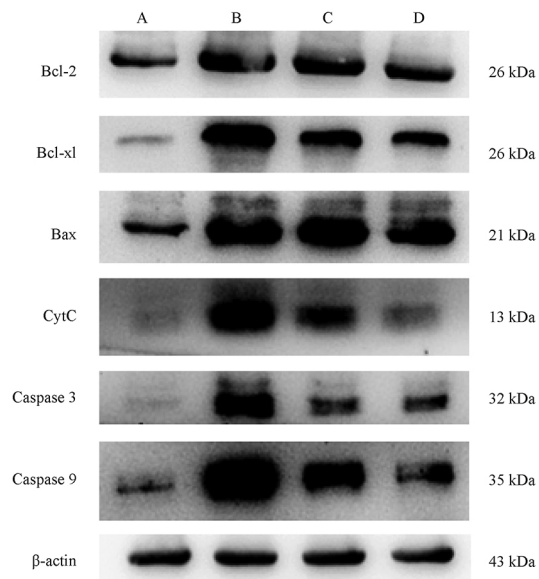


图 3 用蛋白质印迹法检测 4 组新西兰大白兔视网膜组织中 B 淋巴细胞瘤 - 2 基因 (Bcl - 2)、Bcl - 2 样蛋白 1 (Bcl - xl)、Bcl - 2 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C (CytC) 和 caspase 蛋白的表达情况

Figure 3 Detection of the expression of B - lymphomatoma - 2 gene (Bcl - 2), B - cell lymphoma 2 - like protein 1 (Bcl - xl), Bcl - 2 related X protein (Bax), cytochrome C (CytC) and caspase proteins in the retina tissues of four groups by Western blotting

A - D refer to figure 1.

讨 论

视神经由视网膜第 3 级神经元——RGCs 的轴突汇聚而成^[14], 视神经受损后, 轴突会首先受到剪切力的损伤, 引发轴浆运输和神经血管循环的障

碍^[15], 会导致营养因子的缺失、视神经轴突断裂、失去营养支持以及局部缺血^[16], 同时过量产生或释放的一氧化氮具有神经毒性, 这些因素共同触发了凋亡的启动程序, 引起 RGCs 的进行性死亡^[17]。由于 RGCs 缺乏自我更新与修复的能力, 因此, RGCs 死亡引起的视功能丧失是不可逆的, RGCs 死亡的程度会根据损伤因素和程度的不同而有所差异^[18]。研究表明, 减少 ONI 后 RGCs 凋亡是延缓 ONI 的关键途径之一^[19]。研究证实, 众多相关基因参与调控细胞凋亡过程, 其表达变化可以诱发或抑制细胞凋亡^[20]。

青葙苷 I 是中药青葙子的主要药理成分之一, 具有抗氧化、降血脂和抗凋亡等作用。青葙子最早被记录在《神农本草经》中,《本草纲目》明确指出其治疗眼疾的功效:“青葙子治眼,与决明子、菟实同功”。青葙子的味苦,性寒,归入肝经,具有清肝、明目、退翳的效果,在中医药治疗眼科疾病中广泛应用。在凋亡级联反应中, caspase 3 作为凋亡执行酶发挥着关键作用^[21], Bcl - 2 家族蛋白是细胞凋亡线粒体途径的核心调控分子^[22], 其中 Bax 是促进凋亡的基因^[23], 本研究发现, 经青葙苷 I 干预后, Bax、caspase 3 与 caspase 9 明显降低, 提示青葙苷 I 能够抑制损伤的 RGCs 的凋亡状态, 而 Bcl - 2 和 Bcl - xl 是抑制凋亡的相关蛋白^[24], 也同样出现降低情况。分析其原因可能为: 假手术组因呈现非过度凋亡状态, 因此 Bcl - 2 和 Bcl - xl 表达含量较低, 而模型组呈现高度凋亡状态, Bcl - 2 和 Bcl - xl 蛋白表达也升高, 经青葙苷 I 干预后, 凋亡状态减轻, 因此对照组与实验组呈现 Bcl - 2 和 Bcl - xl 表达降低, 且实验组优于对照组, 也提示青葙苷 I 减轻 RGCs 凋亡并非通过升高 Bcl - 2 和 Bcl - xl 蛋白来完成的。邓翕之等^[25]用烟酰胺核糖干预羰基氰化物间氯苯腈所诱导的大鼠视网膜的永生视网膜前体细胞, 结果发现, 其能够提高细胞活力, 降低 caspase 3 与 caspase 9 与 CytC 等凋亡蛋白表达, 减少 ROS 生成, 与本文结果一致。

本研究提示: 青葙苷 I 能够降低 ONI 模型视网膜组织 ROS 水平, 升高 SOD 水平, 抑制凋亡相关蛋白 Bax、caspase 3 与 caspase 9 的表达, 提示当 ONI 后, 节细胞因 ROS 水平的迅速升高出现 caspase 3 信号通路被激活, 线粒体大量凋亡, 经青葙苷 I 干预后, 可以抑制视网膜节细胞线粒体凋亡途径, 起到节细胞的保护作用。

参考文献:

[1] QIU J, BOUCHER M, CONLEY G, et al. Traumatic brain injury -

- related optic nerve damage [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2022, 81 (5):344—355.
- [2] WONG K A, BENOWITZ L I. Retinal ganglion cell survival and axon regeneration after optic nerve injury: Role of inflammation and other factors [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (17):10179.
- [3] CHEN B, ZHANG H, ZHAI Q, *et al*. Traumatic optic neuropathy: A review of current studies [J]. *Neurosurg Rev*, 2022, 45 (3): 1895—1913.
- [4] GUY W M, SOPARKAR C N, ALFORDI E L, *et al*. Traumatic optic neuropathy and second optic nerve injuries [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2014, 132 (5):567—571.
- [5] ABD GHAPOR A A, IEZHITS A, AGARWAL R, *et al*. Intravitreal trans - resveratrol ameliorates NMDA - induced optic nerve and retinal injury [J]. *Curr Eye Res*, 2022, 47 (6):866—873.
- [6] XU X, LAI Y, HUA ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39 (1):BSR20180992.
- [7] 郝枝花, 王船英, 周月乔, 等. 青箱子现代药理学研究[J]. 宜春学院学报, 2019, 41 (9):27—31.
- [8] 李潇然, 王娟, 王世东, 等. 木贼 - 青箱子药对治疗糖尿病视网膜病变作用机制网络药理学研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28 (2):28—34.
- [9] 田雯雯, 段志学, 蒲建中, 等. 枸杞多糖调控 AMPK/ULK1 自噬途径对高渗诱导角膜上皮细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (1):42—46.
- [10] 王佳娣, 安百平, 刘悦, 等. 槲皮素介导铁死亡途径对高渗刺激诱导的干眼细胞模型的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (4):529—533.
- [11] 毕晓晨, 孔晓彬, 赵娜, 等. 银杏叶提取物调控 PI3K/AKT 信号通路对人脑血管外膜成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (11):1556—1559.
- [12] 孟子璐, 宋纯东, 王耀献, 等. 雷公藤多苷调控鞘氨醇激酶信号通路改善 IgA 肾病大鼠肾损伤的作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (6):879—883.
- [13] 袁超, 孔思琪, 梁建庆, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨归芪益元膏联合顺铂治疗 Lewis 肺癌的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (10):1424—1428.
- [14] 郁璐, 林沛, 杨宁, 等. 免疫细胞在视神经损伤中作用的研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2024, 60 (1):95—101.
- [15] 张鹤, 王丽杰. 外伤性视神经损伤的中西医结合治疗概述[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49 (11):199—202.
- [16] 李玉洁, 马科, 张海娟, 等. 天麻钩藤饮对视神经损伤后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, 2018, 36 (2):91—95.
- [17] 王航, 蔡亚宁, 衡立君, 等. 创伤性视神经损伤预后影响因素分析及视神经管骨折手术策略选择[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2022, 8 (1):23—27.
- [18] 李新宇, 郭智霖. 外伤性视神经损伤的研究进展[J]. 组织工程与重建外科, 2023, 19 (3):315—318.
- [19] YANG Y, SUN X. Retinal ganglion cell death in glaucoma: Advances and caveats [J]. *Curr Eye Res*, 2023, 48 (1):1—10.
- [20] QIN Q, YU N, GU Y, *et al*. Inhibiting multiple forms of cell death optimizes ganglion cells survival after retinal ischemia reperfusion injury [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (5):507.
- [21] ZHAO W J, FAN C L, HU X M, *et al*. Regulated cell death of retinal ganglion cells in glaucoma: Molecular insights and therapeutic potentials [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43 (7):3161—3178.
- [22] CHEN H, DENG Y, GAN X, *et al*. NLRP12 collaborates with NLRP3 and NLRC4 to promote pyroptosis inducing ganglion cell death of acute glaucoma [J]. *Mol Neurodegener*, 2020, 15 (1):26.
- [23] GARCIA - AYUSO D, DI PIERDOMENICO J, VIDAL - SANZ M, *et al*. Retinal ganglion cell death as a late remodeling effect of photoreceptor degeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (18): 4649.
- [24] SEONG H, JEONG J Y, RYU J, *et al*. Resveratrol prevents hypoxia - induced retinal ganglion cell death related with ErbB2 [J]. *Int J Ophthalmol*, 2022, 15 (3):394—400.
- [25] 邓翥之, 张楠, 曾雯, 等. 烟酰胺核糖在视神经节细胞中的线粒体保护作用[J]. 中国药师, 2024, 27 (1):1—7.

(收稿日期 2024 - 10 - 12)