

姜黄素对慢性高眼压大鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响及机制

许莞菁¹, 孙雨浩², 赵爽³, 赵军⁴, 张娟美⁴

引用: 许莞菁, 孙雨浩, 赵爽, 等. 姜黄素对慢性高眼压大鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响及机制. 国际眼科杂志 2023; 23(12): 1943-1949

作者单位: (201799) 中国上海市, 复旦大学附属中山医院青浦分院¹眼科; ²耳鼻咽喉科; ³(250117) 中国山东省济南市, 山东第一医科大学; ⁴(276000) 中国山东省临沂市人民医院眼科

作者简介: 许莞菁, 毕业于青岛大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 青光眼、白内障。

通讯作者: 许莞菁. xuwanjing23@163.com

收稿日期: 2023-05-19 修回日期: 2023-10-30

摘要

目的: 探讨姜黄素对慢性高眼压大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡的影响及机制。

方法: 将21只SD大鼠随机分为3组, 每组7只, 高眼压模型组和姜黄素治疗组大鼠通过烧灼巩膜上静脉法建立慢性高眼压模型, 假手术组大鼠仅剪开球结膜, 不烧灼巩膜上静脉; 姜黄素治疗组给予4mL/kg姜黄素灌胃, 假手术组和高眼压模型组给予4mL/kg纯水灌胃, 连续3wk。造模后3wk, 采用HE染色观察各组大鼠视网膜组织形态病理变化、RGCs数量及神经节细胞层(GCL)厚度; 采用TUNEL染色观察各组大鼠RGCs和视网膜细胞凋亡情况; 采用实时荧光定量PCR、免疫组织化学染色和Western blot法检测各组大鼠视网膜谷氨酰半胱氨酸连接酶调节亚基(GCLM)与血红素加氧酶-1(HO-1)的表达水平。

结果: 与假手术组相比, 高眼压模型组和姜黄素治疗组大鼠视网膜组织形态紊乱, RGCs数量减少, GCL变薄, RGCs和视网膜细胞凋亡率均升高, GCLM和HO-1表达量均升高; 与高眼压模型组相比, 姜黄素治疗组大鼠视网膜组织形态基本正常, RGCs数量增多, GCL增厚, RGCs和视网膜细胞凋亡率均降低, GCLM和HO-1表达量均升高。

结论: 姜黄素在慢性高眼压大鼠模型中可通过上调抗氧化基因GCLM与HO-1的表达抑制RGCs凋亡。

关键词: 姜黄素; SD大鼠; 慢性高眼压模型; 视网膜神经节细胞; 凋亡; 青光眼

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.12.02

Effects and mechanisms of curcumin on apoptosis of retinal ganglion cells in chronic ocular hypertension rats

Wan-Jing Xu¹, Yu-Hao Sun², Shuang Zhao³, Jun Zhao⁴, Juan-Mei Zhang⁴

QingPu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201799, China; ³Shandong First Medical University, Jinan 250117, Shandong Province, China; ⁴Department of Ophthalmology, Linyi People's Hospital, Linyi 276000, Shandong Province, China

Correspondence to: Wan-Jing Xu. Department of Ophthalmology, QingPu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201799, China. xuwanjing23@163.com

Received: 2023-05-19 Accepted: 2023-10-30

Abstract

• AIM: To investigate the effects and mechanisms of curcumin on apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs) in chronic ocular hypertension rats.

• METHODS: A total of 21 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups with 7 rats in each group. The rat models of chronic ocular hypertension were established by cauterization of the superior scleral veins in the high intraocular pressure model group and the curcumin treatment group, and the sham operation group only cut the conjunctiva without the cauterization of the superior scleral veins; the rats in the curcumin treatment group were intragastrically treated with curcumin at a dose of 4mL/kg, and the rats in the sham operation group and the high intraocular pressure model group were treated with pure water at a dose of 4mL/kg for 3wk. After 3wk, HE staining was used to observe the morphological and pathological changes of retina, the number of RGCs and the thickness of ganglion cell layer (GCL) in each group of rats; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of RGCs and retinal cells in each group of rats; the expression levels of glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) and heme oxygenase-1 (HO-1) in the retina of each group of rats were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, immunohistochemical staining and Western blot.

• RESULTS: Compared with the sham operation group, the retinal morphology of rats in the high intraocular pressure model group and the curcumin treatment group was disorganized, the number of RGCs was reduced, the GCL was thinner, the apoptosis rate of RGCs and retinal cells increased, and the expression levels of GCLM and HO-1 increased. Compared with the high intraocular pressure model group, the retinal morphology of rats in the curcumin treatment group was basically normal, the number of RGCs increased, the GCL thickened, the apoptosis rate of RGCs and retinal cells decreased, and the expression levels of GCLM and HO-1 increased.

• CONCLUSION: Curcumin can inhibit the apoptosis of

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Otolaryngology,

RGCs in the rat model of chronic ocular hypertension by up-regulating the expression of antioxidant genes GCLM and HO-1.

• KEYWORDS: curcumin; Spraque-Dawley rats; chronic ocular hypertension model; retinal ganglion cells; apoptosis; glaucoma

Citation: Xu WJ, Sun YH, Zhao S, *et al.* Effects and mechanisms of curcumin on apoptosis of retinal ganglion cells in chronic ocular hypertension rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023; 23(12): 1943-1949

0 引言

青光眼是能够损伤视神经并造成特征性视野缺损的一组慢性、进行性、不可逆性的眼病,是不可逆失明的主要原因,其在全球范围内对视力丧失的影响仅次于白内障^[1]。青光眼眼前节病变因类型的不同而有所区别,而青光眼眼后节病变多表现为视神经头的典型凹陷性萎缩和视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的慢性进行性丢失^[2]。研究表明,青光眼的易感性随着年龄的增长而增加,分析可能是由于持续的氧化应激损害及抗氧化防御机制的生理性减弱所致^[3]。在氧化应激或其它因素刺激下,机会会上调一系列抗氧化防御酶如谷氨酰半胱氨酸连接酶调节亚基(glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)和血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达,这些酶及下游产物可在类似青光眼的损害中发挥细胞保护作用^[4-6]。既往研究发现,从传统草药姜黄根茎中提取的天然多酚类化合物姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗增殖、抗血管生成等多种药用价值^[7]。本研究参考青光眼的氧化应激学说,研究姜黄素的抗氧化生物活性在青光眼动物模型中对RGCs和视网膜的作用及机制,以期对青光眼的治疗提供新的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特殊病原体级(specific pathogen free, SPF)雄性 Spraque-Dawley (SD)大鼠 21 只,6~8 周龄,体质量 220~240g,裂隙灯及眼底镜检查无眼部疾病,由湖北省实验动物研究中心提供[许可证号:SCXK(鄂)2020-0018]。所有动物实验程序均按照国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》和青岛大学关于动物道德使用的指导方针进行。所有大鼠均在温度和湿度受控的房舍饲养,保持 12h 光照/黑暗循环。

1.1.2 主要试剂与仪器 姜黄素(Sigma)、0.5%丙美卡因滴眼液(ALCAINE)、左氧氟沙星眼膏(远大健康)、细胞凋亡检测试剂盒(Elabscience)、GCLM 抗体(Affinity)、HO-1 抗体(Affinity)、兔多抗 GAPDH(杭州贤至生物有限公司)、兔多抗 GCLM(Affinity)、兔多抗 HO-1(Affinity);生物显微镜(尼康)、超微量紫外可见分光光度计(杭州米欧仪器有限公司)、PCR 仪(杭州米欧仪器有限公司)、电转仪(北京六一仪器厂)及酶标仪(Thermo)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及动物模型的建立 采用随机数字表法将 21 只 SPF 级 SD 大鼠分为假手术组(7 只)、高眼压模型组(7 只)及姜黄素治疗组(7 只)。高眼压模型组和姜黄素治疗组建立慢性高眼压大鼠模型,采用标准烧灼巩膜上静

脉法造模,SD 大鼠用 1%戊巴比妥钠按照 45mg/kg 行腹腔内注射麻醉,选取左眼为术眼,左眼滴 0.5%丙美卡因滴眼液,在角膜缘后 1mm 处沿顺时针方向剪开 6:00~14:00 位的球结膜,分离结膜下筋膜及肌肉,分别在上直肌两侧及外直肌下方附近找到 3 条“Y”字形巩膜上静脉,游离并抬起静脉总支,夹闭并用加热的大头针烧灼角巩膜远侧的静脉主干,使静脉封闭,烧灼成功后复位缝合球结膜。假手术组仅在同样位置剪开左眼球结膜,不烧灼巩膜上静脉。术毕左眼结膜囊内涂左氧氟沙星眼膏,将大鼠放置于保温毯上,待其自然苏醒后放回笼内,术后 5d 每日结膜囊内涂左氧氟沙星眼膏 1 次。

1.2.2 眼压测定 待麻醉显效后,采用 TONO-PEN AVIA 眼压计笔尖紧密接触角膜,每眼连续测量 5 次稳定读数,读数的平均值作为眼压测定值。分别于造模前、造模后 30min 测量眼压,造模后左眼眼压大于术前眼压的 1.7 倍即视为造模成功。每周监测眼压直至 3wk 后实验结束。

1.2.3 给药方式 姜黄素治疗组术后给予姜黄素灌胃,灌胃剂量为 4mL/kg(10mg/kg),每日 1 次,连续 3wk。假手术组和高眼压模型组则给予纯水灌胃,灌胃剂量为 4mL/kg,每日 1 次,连续 3wk。

1.2.4 取材 造模 3wk 后所有大鼠使用 10 倍的麻醉剂量(1%戊巴比妥钠,450mg/kg)实施安乐死,每组随机选取 4 只取左眼球组织,用 4%多聚甲醛固定,制备石蜡切片,每组其余 3 只取左眼球组织,去除角膜、晶状体和玻璃体,分离视网膜组织,放入-80℃冰箱中冻存备用。

1.2.5 HE 染色观察视网膜组织形态病理变化和 RGCs 数量及神经节细胞层厚度 将制备好的眼球组织石蜡切片进行脱蜡、苏木素染色、伊红染色、脱水、透明、封片,高倍显微镜下(×200)观察视网膜变化,采集图像;在神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)区域取 600μm,应用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件计数 RGCs,每组随机选取 4 眼,每眼随机选取 3 张切片计数,取平均值;应用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件测量 GCL 厚度,每组随机选取 4 眼,每眼随机选取 3 张切片,每张切片测量 5 次取平均值。

1.2.6 TUNEL 染色检测 RGCs 凋亡率和视网膜细胞总凋亡率 将制备好的眼球组织石蜡切片进行脱蜡水化、蛋白酶 K 孵育、标记工作液孵育、DAPI 孵育、封片,荧光显微镜下(×400)观察采集图像,每组随机选取 4 眼,每眼随机选取 3 个高倍视野(×400)计算细胞凋亡率取平均值,每个高倍视野采用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件计数凋亡 RGCs 数(TUNEL 染色阳性)、RGCs 总数和凋亡视网膜细胞数(TUNEL 染色阳性)、视网膜细胞总数,细胞凋亡率=TUNEL 染色阳性细胞数/细胞总数。

1.2.7 免疫组织化学染色检测视网膜 GCLM 与 HO-1 蛋白的表达 将制备好的眼球组织石蜡切片进行脱蜡水化、抗原修复、阻断过氧化物酶、血清封闭,依次加入一抗(1:100)、HRP 标记的羊抗鼠/兔二抗、DAB 显色液,显微镜观察到颜色改变后,自来水冲洗、苏木素复染、脱水透明、封片,晾干后,在显微镜下观察并采集图像,每组随机选取 4 眼,每眼随机选取 4 个高倍视野(×400)计算光密度取平均值,每个高倍视野采用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件测量视网膜积分光密度和面积,光密度=积分光密度/面积。

1.2.8 Western blot 检测视网膜 GCLM 与 HO-1 蛋白的表达 从-80℃冰箱中取出保存的视网膜组织,提取视

网膜组织中总蛋白、测定蛋白浓度、制备电泳胶,待电泳分离及电转移后,依次用一抗(1:1000)、二抗进行孵育,显色曝光后,采用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件分析胶片灰度值,以 GAPDH 为内参蛋白,计算灰度值比值 GCLM/GAPDH 和 HO-1/GAPDH,实验重复 3 次。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 检测视网膜 GCLM mRNA 与 HO-1 mRNA 的表达 从-80℃冰箱中取出保存的视网膜组织,Trizol 法提取 RNA 后,逆转录合成 cDNA,以 GAPDH 作为内参照。正向和反向引物:Rat GAPDH:正向:5'-ACAGCAACAGGCTGCTGGAC-3';反向:5'-TTTGAGGGTGCAGCGAAGCTT-3';产物长度:253bp。Rat GCLM:正向:5'-TAAACCCTGATGAAAGAGA-3';反向:5'-GTAAGGCTGCAAATGCT-3';产物长度:197bp。Rat HO-1:正向:5'-GCATGTCCCAGGATTTGTCC-3';反向:5'-GGTTCGCTTTGCTTTCGCTCT-3';产物长度:192bp。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量,实验重复 3 次。

统计学分析:所有数据运用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析。计量资料均符合正态分布且方差齐,采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,眼压变化情况的比较采用重复测量方差分析,组间及组内进一步两两比较采用 LSD-t 检验;三组间比较采用单因素方差分析,组间进一步两两比较采用 LSD-t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠眼压比较 造模前,3 组大鼠眼压比较差异均无统计学意义($P>0.05$);造模后 30min,1、2、3wk,高眼压模型组和姜黄素治疗组大鼠眼压均高于假手术组,差异均有统计学意义($P<0.05$),而高眼压模型组与姜黄素治疗组大鼠眼压差异均无统计学意义($P>0.05$)。假手术组大鼠各时间点眼压两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$),高眼压模型组和姜黄素治疗组大鼠造模后各时间点眼压均高于造模前,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1,图 1。

2.2 各组大鼠视网膜组织形态病理变化和 RGCs 数量及 GCL 厚度比较 HE 染色结果显示,假手术组大鼠视网膜

组织形态正常,分层清楚,细胞排列规整,单层 RGCs 外形正常、排列整齐、数量正常,细胞核内染色质分布均匀,内核层与外核层细胞排列紧密、规整;高眼压模型组大鼠视网膜组织形态紊乱,分层不清晰,细胞排列欠规整,单层 RGCs 外形不规则、排列紊乱、数量减少,可见部分细胞核固缩、溶解、碎裂等变性病理改变,内核层与外核层细胞排列疏松、紊乱,呈水肿样改变;姜黄素治疗组大鼠视网膜组织形态基本正常,分层清楚,细胞排列尚规整,单层 RGCs 外形较规则、排列尚整齐、数量基本正常,变性细胞核较少,内核层与外核层细胞排列稍疏松、紊乱。假手术组、高眼压模型组、姜黄素治疗组大鼠 RGCs 数量分别为 37.583 ± 3.167 、 20.167 ± 1.478 、 26.500 ± 3.249 个,差异有统计学意义($F=40.962, P<0.05$);GCL 厚度分别为 12.933 ± 0.622 、 8.963 ± 0.617 、 $11.289\pm 0.318\mu m$,差异有统计学意义($F=55.035, P<0.05$)。与假手术组相比,高眼压模型组和姜黄素治疗组大鼠 RGCs 数量均减少、GCL 厚度均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与高眼压模型组相比,姜黄素治疗组大鼠 RGCs 数量增加、GCL 厚度升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2~4。

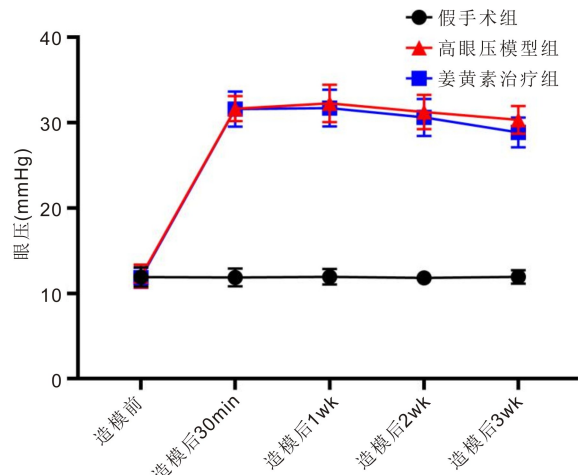


图 1 各组大鼠造模前后眼压情况。

表 1 各组大鼠造模前后眼压的比较

组别	造模前	造模后 30min	造模后 1wk	造模后 2wk	造模后 3wk
假手术组	11.91±1.13	11.85±1.04	11.94±0.91	11.81±0.85	11.92±0.78
高眼压模型组	12.01±1.34	31.63±1.47 ^{a,c}	32.24±2.18 ^{a,c}	31.23±2.01 ^{a,c}	30.31±1.62 ^{a,c}
姜黄素治疗组	11.83±1.17	31.59±2.05 ^{a,c}	31.69±2.14 ^{a,c}	30.60±2.16 ^{a,c}	28.85±1.74 ^{a,c}

注: $F_{组间}=500.319, P_{组间}<0.001$; $F_{时间}=386.976, P_{时间}<0.001$; $F_{交互}=97.516, P_{交互}<0.001$ 。^a $P<0.05$ vs 同时假手术组; ^c $P<0.05$ vs 同组造模前。

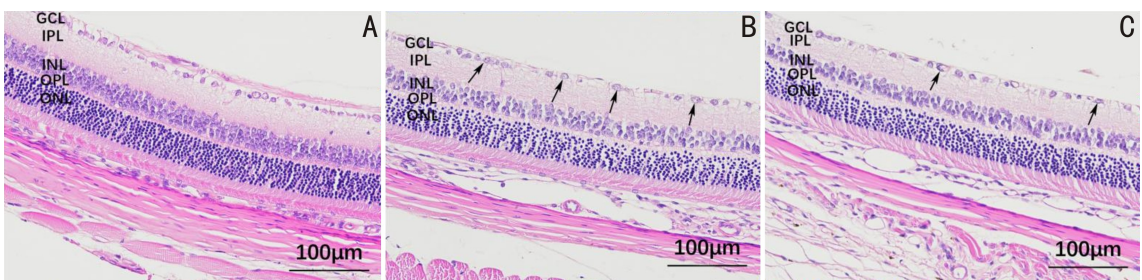


图 2 HE 染色观察各组大鼠视网膜组织形态变化 A:假手术组;B:高眼压模型组;C:姜黄素治疗组。蓝色:细胞核;红色:细胞浆、肌纤维、胶原纤维和红细胞。GCL: 神经节细胞层;IPL: 内丛状层;INL: 内核层;OPL: 外丛状层;ONL: 外核层。箭头所示为变性细胞核。

2.3 各组大鼠 RGCs 和视网膜细胞凋亡情况比较
 TUNEL 染色结果显示,假手术组、高血压模型组、姜黄素治疗组大鼠 RGCs 凋亡率分别为 $(1.660 \pm 1.159)\%$ 、 $(13.713 \pm 2.223)\%$ 、 $(5.316 \pm 1.938)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 45.628, P < 0.05$); 视网膜细胞总凋亡率分别为 $(1.957 \pm 0.809)\%$ 、 $(13.562 \pm 1.758)\%$ 、 $(6.603 \pm 1.204)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 78.808, P < 0.05$)。与假手术组相比,高眼压模型组和姜黄素治疗组大鼠 RGCs 和视网膜细胞总凋亡率均升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与高眼压模型组相比,姜黄素治疗组大鼠 RGCs 和视网膜细胞总凋亡率降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5、6。

2.4 各组大鼠视网膜 GCLM 和 HO-1 蛋白表达水平比较
 免疫组织化学染色检测结果显示,假手术组、高血压模型组、姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM 蛋白平均光密度值

分别为 0.00148 ± 0.00054 、 0.00429 ± 0.00046 、 0.00662 ± 0.00041 , 差异有统计学意义 ($F = 120.038, P < 0.05$); HO-1 蛋白平均光密度值分别为 0.00346 ± 0.00042 、 0.00721 ± 0.00050 、 0.01100 ± 0.00058 , 差异有统计学意义 ($F = 221.878, P < 0.05$)。与假手术组相比,高眼压模型组和姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM 和 HO-1 蛋白平均光密度值均升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与高眼压模型组相比,姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM 和 HO-1 蛋白平均光密度值升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 7~9。

Western blot 检测结果显示,假手术组、高血压模型组、姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM/GAPDH 灰度值比值分别为 0.091 ± 0.039 、 0.390 ± 0.075 、 0.614 ± 0.002 , 差异有统计学意义 ($F = 87.206, P < 0.05$); HO-1/GAPDH 灰度值比值分别为 0.395 ± 0.033 、 0.709 ± 0.092 、 0.986 ± 0.094 , 差异有统计学意义 ($F = 42.672, P < 0.05$)。与假手术组相比,高眼

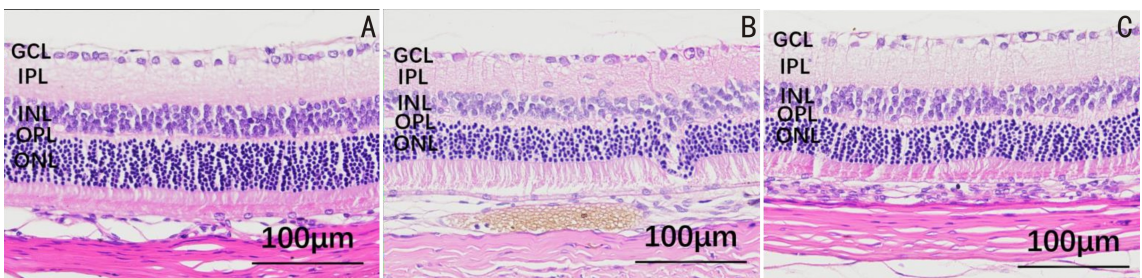


图3 HE染色观察各组大鼠GCL厚度 A:假手术组;B:高血压模型组;C:姜黄素治疗组。GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层。

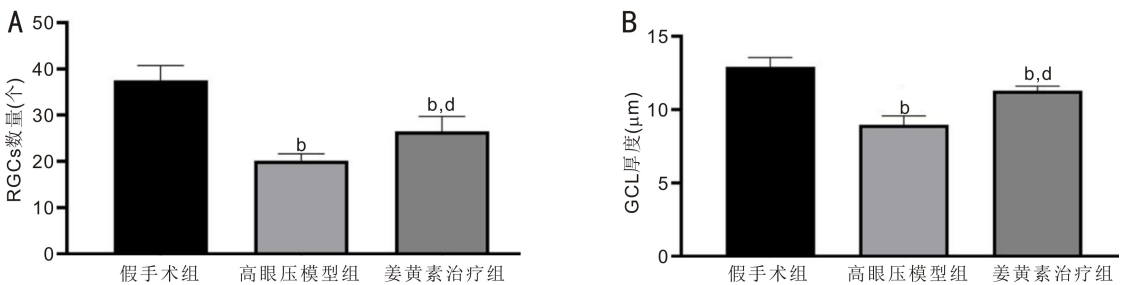


图4 造模后3wk 各组大鼠RGCs数量和GCL厚度比较 A:RGCs数量;B:GCL厚度。^b $P < 0.01$ vs 假手术组;^d $P < 0.01$ vs 高血压模型组。

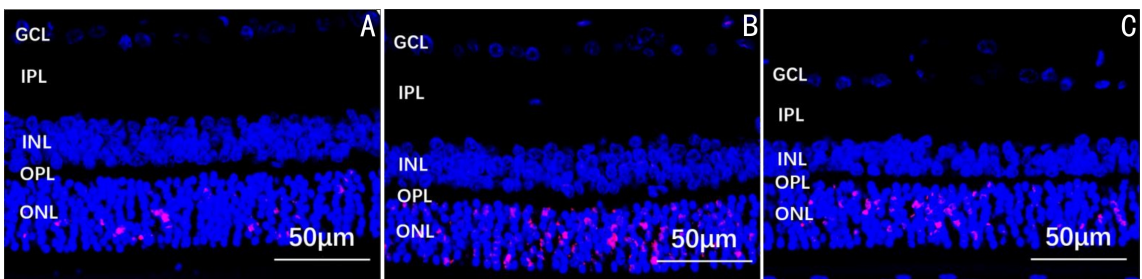


图5 TUNEL染色观察各组大鼠RGCs和视网膜细胞凋亡情况 A:假手术组;B:高血压模型组;C:姜黄素治疗组。GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层。红色:凋亡细胞;蓝色:细胞核。

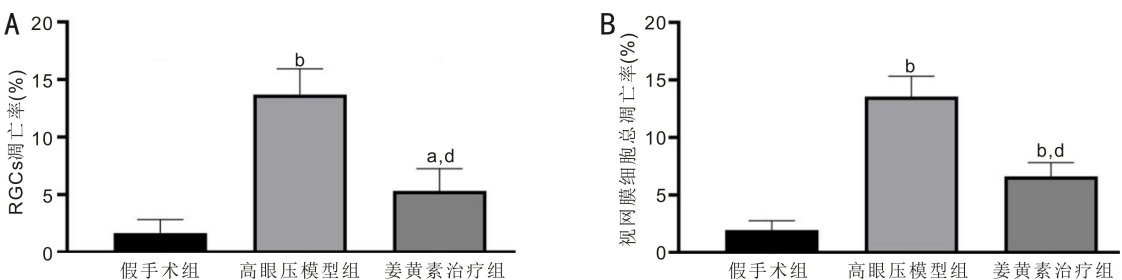


图6 造模后3wk 各组大鼠RGCs和视网膜细胞凋亡率比较 A:RGCs凋亡率;B:视网膜细胞总凋亡率。^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 假手术组;^d $P < 0.01$ vs 高血压模型组。

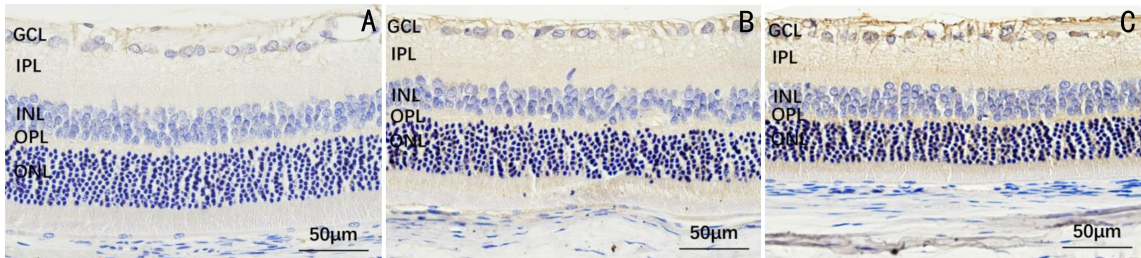


图7 免疫组织化学染色观察各组大鼠视网膜 GCLM 蛋白表达情况 A:假手术组;B:高眼压模型组;C:姜黄素治疗组。GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层。蓝色:细胞核;棕黄色/棕褐色:GCLM 蛋白阳性表达。

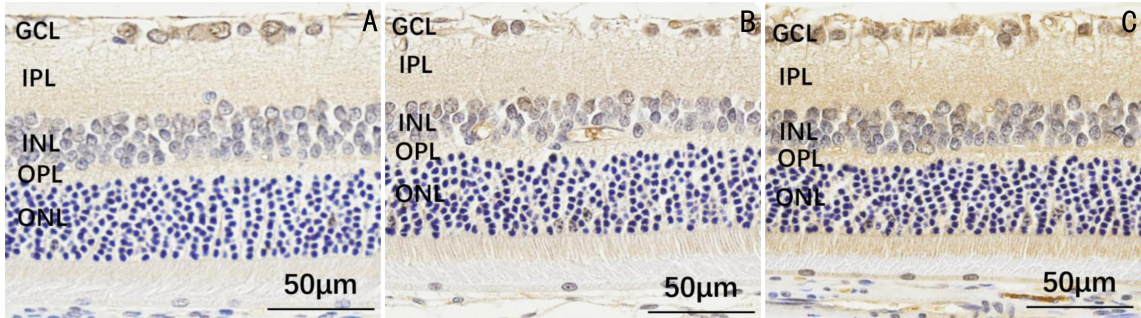


图8 免疫组织化学染色观察各组大鼠视网膜 HO-1 蛋白表达情况 A:假手术组;B:高眼压模型组;C:姜黄素治疗组。GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层。蓝色:细胞核;棕黄色/棕褐色:HO-1 蛋白阳性表达。

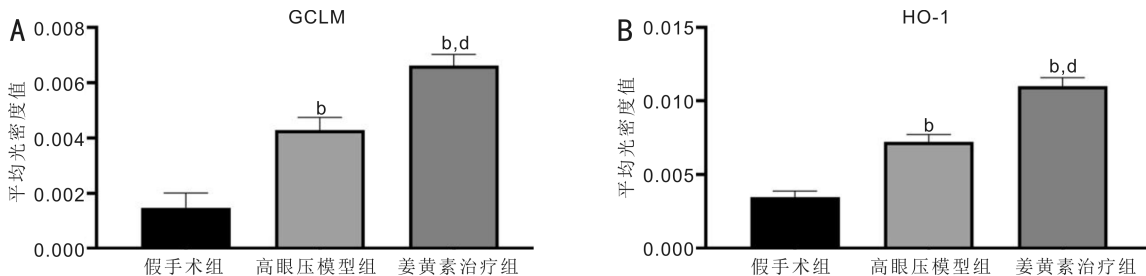


图9 免疫组织化学染色检测各组大鼠视网膜 GCLM 与 HO-1 蛋白表达水平比较 A:GCLM 蛋白相对表达水平;B:HO-1 蛋白相对表达水平。^b $P < 0.01$ vs 假手术组;^d $P < 0.01$ vs 高眼压模型组。

压模型组和姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM/GAPDH 和 HO-1/GAPDH 灰度值比值均升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与高眼压模型组相比,姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM/GAPDH 和 HO-1/GAPDH 灰度值比值升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 10。

2.5 各组大鼠视网膜 GCLM mRNA 与 HO-1 mRNA 表达水平比较 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,假手术组、高眼压模型组、姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM mRNA 相对表达水平分别为 0.986 ± 0.066 、 1.816 ± 0.336 、 2.538 ± 0.402 ,差异有统计学意义 ($F = 19.493$, $P < 0.05$);HO-1 mRNA 相对表达水平分别为 0.974 ± 0.041 、 3.041 ± 0.426 、 5.147 ± 0.530 ,差异有统计学意义 ($F = 84.352$, $P < 0.05$)。与假手术组相比,高眼压模型组和姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM mRNA 和 HO-1 mRNA 的相对表达水平均升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与高眼压模型组相比,姜黄素治疗组大鼠视网膜 GCLM mRNA 和 HO-1 mRNA 的相对表达水平升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 11。

3 讨论

近年,视神经保护性治疗越来越受到重视,由于青光眼患者不可逆性视功能损害是视神经损伤并导致 RGCs 凋亡的结果,因此,青光眼的治疗已经不再满足于仅降低眼压,而是预防视神经损伤及 RGCs 进行性丢失。RGCs 的死亡涉及多种机制,包括神经营养因子剥夺、炎症、氧化

应激、线粒体功能障碍、谷氨酸兴奋性毒性和自噬失调等,其中氧化应激是一条重要的损伤途径^[8]。氧化应激指氧化剂和抗氧化剂之间的平衡发生紊乱,导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 过度积累并造成损伤^[9]。RGCs 及其轴突容易受到氧化应激的影响,是因为视网膜耗氧量高,多不饱和脂肪酸比例高,且直接暴露于紫外线、可见光、电离辐射、化疗药物和环境毒素中^[3]。为了应对内源性或外源性氧化剂产生的影响,细胞配备了相应的抗氧化防御系统,可以保护细胞免受氧化应激的损伤,其中 Keap1-Nrf2-ARE 是调节抗氧化蛋白产生的重要信号通路,其下游基因产物包含超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽转移酶、醌氧化还原酶-1、谷氨酰半胱氨酸连接酶及 HO-1 等^[4-5]。

谷氨酰半胱氨酸连接酶与 HO-1 均是 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路下游的抗氧化防御酶^[10]。GCLM 是谷氨酰半胱氨酸连接酶的重要组成部分,而后者是谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 生物合成的限速酶,GSH 具有解毒、抗氧化、调节细胞增殖等多种功能^[11]。Malone 等^[12]研究表明 GSH 可清除慢性氧化应激产物,从而保护视神经;Park 等^[13]研究则表明通过药物降低 GSH 水平可诱导视网膜细胞死亡。HO-1 是血红素分解代谢过程中的限速酶,其产物在人体内发挥抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用^[14]。既往研究已证明使用基因转移或药物的方式诱导 HO-1 可抑

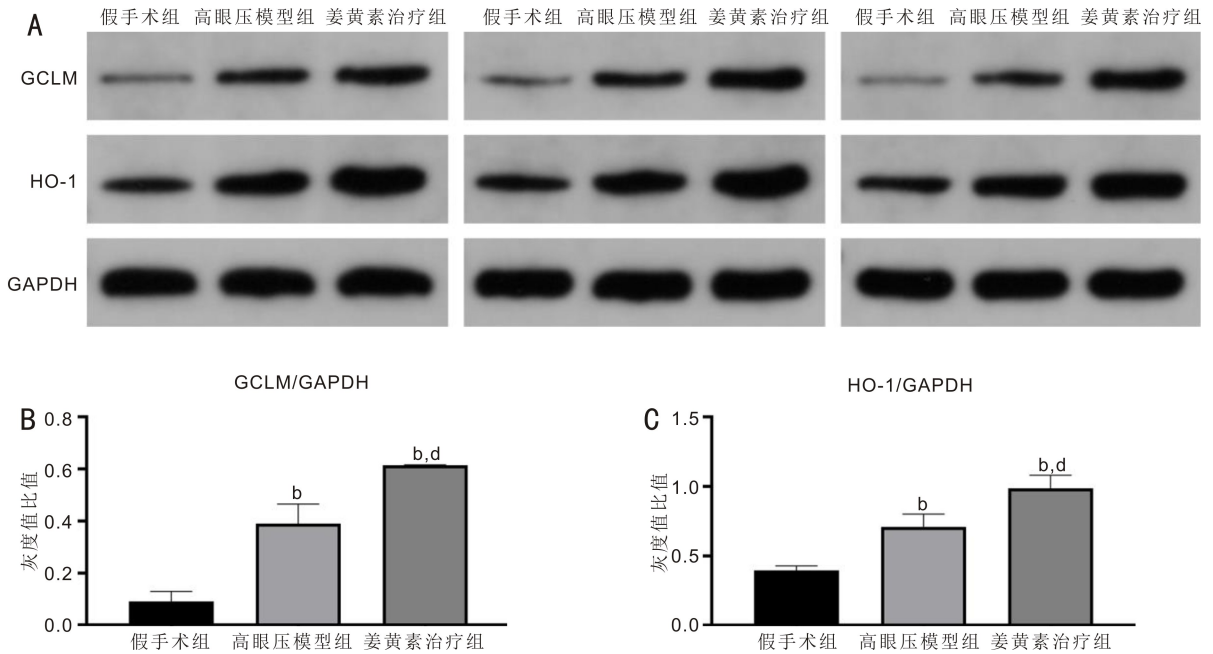


图10 Western blot 检测各组大鼠视网膜 GCLM 和 HO-1 蛋白表达水平 A: Western blot 检测结果; B: GCLM 蛋白相对表达量; C: HO-1 蛋白相对表达量。^b $P < 0.01$ vs 假手术组; ^d $P < 0.01$ vs 高血压模型组。

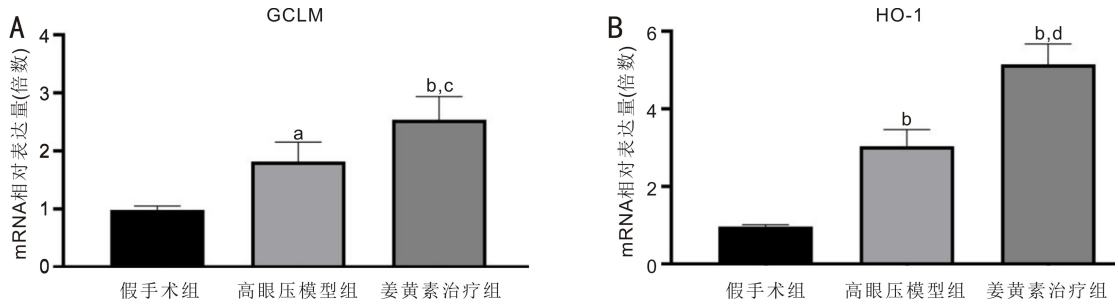


图11 实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠视网膜 GCLM 和 HO-1 mRNA 相对表达水平 A: GCLM mRNA 相对表达水平; B: HO-1 mRNA 相对表达水平。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 假手术组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 高血压模型组。

制细胞凋亡并在细胞损伤后提供保护^[15-17]。通过对 GCLM 与 HO-1 进行研究,或许可为青光眼的视神经保护性治疗提供新思路。

姜黄素是从姜科植物姜黄的地下根茎中提取的主要活性物质,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗衰老等多种生物活性^[18]。姜黄素是一种有效的 ROS 自由基清除剂,由于其结构的特殊性,可以激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路,诱导 GCLM、HO-1 等细胞保护性蛋白的表达,发挥抗氧化作用^[19-20]。以往大量研究已证明姜黄素的抗凋亡和抗炎等作用可以保护 RGCs 免受青光眼相关刺激的影响^[21-24]。然而,姜黄素的抗氧化生物活性在青光眼治疗中的应用潜力还有待进一步挖掘。

本研究以烧灼巩膜上静脉法制造慢性高血压大鼠模型模拟青光眼模型,结果显示,高血压模型组和姜黄素治疗组造模后各时间点眼压与造模前相比差异均具有统计学意义,且均明显高于造模前,提示造模成功。造模后各时间点高血压模型组和姜黄素治疗组大鼠眼压均高于假手术组,差异均有统计学意义,而高血压模型组与姜黄素治疗组大鼠眼压相比差异均无统计学意义,提示姜黄素在该模型中降低眼压的效果并不显著,需要进一步通过组织学检测评估姜黄素的神经保护性作用。HE 染色结果显示,姜黄素有助于视网膜病理形态的恢复。此外,虽然与假手术组比较可发现姜黄素的治疗效果并不能完全逆转

青光眼的损害,但姜黄素治疗组大鼠 RGCs 数量、GCL 厚度、TUNEL 染色视网膜总细胞及 RGCs 凋亡情况均显著优于高血压模型组,表明姜黄素对 RGCs 和视网膜具有一定的保护作用,并且对 RGCs 的凋亡具有抑制作用。

为了进一步验证姜黄素影响 RGCs 凋亡的机制是否与其抗氧化应激能力有关,本研究观察调控 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路的两个重要抗氧化基因 GCLM 与 HO-1 的表达情况,结果显示,无论是从基因还是蛋白水平,姜黄素均促进高血压大鼠视网膜组织中 GCLM 与 HO-1 的表达。结合 RGCs 的研究结果,推测在慢性高血压大鼠模型中姜黄素通过激活抗氧化防御系统抑制 RGCs 凋亡。此外,尽管增幅不如姜黄素治疗组,高血压模型组抗氧化基因的表达量仍显著高于假手术组,这可能是由于慢性高血压状态下产生了大量 ROS,激活了内源性抗氧化防御系统^[4,25]。

本研究初步证明对慢性高血压大鼠进行姜黄素溶液 10mg/kg 灌胃治疗 3wk 后能够减少 RGCs 凋亡,并进一步证明姜黄素对大鼠 RGCs 的保护效应可能是通过上调抗氧化基因 GCLM 与 HO-1 的表达实现的。然而,若要将姜黄素在动物模型中对青光眼的疗效成果推广到临床,还需要考虑其具体的应用方法。以往姜黄素的应用受到其缺乏水溶性和生物利用率低等特点的影响,为解决这一问题,近年已研发出姜黄素佐剂、脂质体姜黄素、姜黄素纳米颗粒、姜黄素磷脂复合物、姜黄素结构类似物等新型姜黄

素制剂^[7,26-27]。Davis等^[28]研制了一种新型姜黄素纳米载体,应用于模拟青光眼环境中的视网膜前体细胞,结果表明,该姜黄素纳米载体能够发挥神经保护作用,并进一步在大鼠动物模型中发现这种新型载体可以有效减少RGCs损失。氧化应激对青光眼的影响不仅限于RGCs死亡,还能使小梁网房水流出通道受损,从而引起眼压升高。Cheng等^[29]开发出一种既含有拉坦前列素也含有姜黄素负载纳米颗粒的热敏水凝胶,可有效减轻人小梁网细胞氧化应激介导的损伤,其中姜黄素对小梁网细胞凋亡发挥了保护作用,同时,热敏水凝胶里含有的拉坦前列素可以增加房水经葡萄膜巩膜途径的流出量,从而降低眼压,这种含有姜黄素的联合用药方式将传统的降眼压治疗和抗氧化应激保护性治疗结合起来,为今后新型姜黄素制剂的研发及临床应用提供了新的思路。

参考文献

- GBD Blindness and Vision Impairment Collaborators, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health* 2021;9(2):e144-e160
- 勾明宝, 赵全良, 袁芳, 等. 原发性急性闭角型青光眼患者视神经的评估. *国际眼科杂志* 2023;23(8):1390-1394
- Saccà SC, Cutolo CA, Ferrari D, et al. The eye, oxidative damage and polyunsaturated fatty acids. *Nutrients* 2018;10(6):668
- Naguib S, Backstrom JR, Gil M, et al. Retinal oxidative stress activates the NRF2/ARE pathway: an early endogenous protective response to ocular hypertension. *Redox Biol* 2021;42:101883
- Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway As a potential preventive and therapeutic target: an update. *Med Res Rev* 2016;36(5):924-963
- 张丹, 赵军, 孙凤江, 等. 芍药苷对慢性高眼压大鼠 RGCs 保护作用的研究. *中国中医眼科杂志* 2020;30(4):239-243
- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 2007;4(6):807-818
- Adornetto A, Rombolà L, Morrone LA, et al. Natural products: evidence for neuroprotection to be exploited in glaucoma. *Nutrients* 2020;12(10):3158
- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 2015;4:180-183
- Lin XY, Bai DP, Wei ZX, et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW_{264.7} cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PLoS One* 2019;14(5):e0216711
- Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009;30(1-2):42-59
- Malone PE, Hernandez MR. 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res* 2007;84(3):444-454
- Park MH, Kim SY, Moon C, et al. Differential cell death and Bcl-2 expression in the mouse retina after glutathione decrease by systemic D,

- L-buthionine sulphoximine administration. *Mol Cells* 2013;35(3):235-242
- Himori N, Maruyama K, Yamamoto K, et al. Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res* 2014;92(9):1134-1142
- Peng PH, Chao HM, Juan SH, et al. Pharmacological preconditioning by low dose cobalt protoporphyrin induces heme oxygenase-1 overexpression and alleviates retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Curr Eye Res* 2011;36(3):238-246
- Lai IR, Chang KJ, Tsai HW, et al. Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction. *Transplantation* 2008;85(5):732-738
- Li Y, Wang Q, Chu CY, et al. Astaxanthin protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/HO-1 pathway. *J Chem Neuroanat* 2020;110:101876
- Zia A, Farkhondeh T, Pourbagher-Shahri AM, et al. The role of curcumin in aging and senescence: molecular mechanisms. *Biomed Pharmacother* 2021;134:111119
- Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings. *Redox Biol* 2013;1(1):448-456
- Turpaev KT. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry Moscow* 2013;78(2):111-126
- Buccarello L, Dragotto J, Hassanzadeh K, et al. Retinal ganglion cell loss in an *ex vivo* mouse model of optic nerve cut is prevented by curcumin treatment. *Cell Death Discov* 2021;7(1):394
- Matteucci A, Frank C, Domenici MR, et al. Curcumin treatment protects rat retinal neurons against excitotoxicity: effect on N-methyl-D: -aspartate-induced intracellular Ca(2+) increase. *Exp Brain Res* 2005;167(4):641-648
- Wang LL, Li CZ, Guo H, et al. Curcumin inhibits neuronal and vascular degeneration in retina after ischemia and reperfusion injury. *PLoS One* 2011;6(8):e23194
- Yue YK, Mo B, Zhao J, et al. Neuroprotective effect of curcumin against oxidative damage in BV-2 microglia and high intraocular pressure animal model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014;30(8):657-664
- 高凤娟, 孙兴怀, 陈君毅, 等. 慢性高眼压大鼠视网膜线粒体复合物活性与氧化应激的动态变化研究. *中国眼耳鼻喉科杂志* 2015;15(6):379-383
- 曹莉, 蔡岩. 姜黄素抗纤维化作用在眼科中的研究进展. *中国中医眼科杂志* 2023;33(4):383-387
- 张惜琴, 范媛媛, 梁靓靓, 等. 姜黄素纳米制剂抗消化系统肿瘤的药理作用研究进展. *药物评价研究* 2022;45(7):1440-1445
- Davis BM, Pahlitzsch M, Guo L, et al. Topical curcumin nanocarriers are neuroprotective in eye disease. *Sci Rep* 2018;8(1):11066
- Cheng YH, Ko YC, Chang YF, et al. Thermosensitive chitosan-gelatin-based hydrogel containing curcumin-loaded nanoparticles and latanoprost as a dual-drug delivery system for glaucoma treatment. *Exp Eye Res* 2019;179-187