

银杏内酯 B 联合视网膜干细胞移植对青光眼大鼠的影响及机制研究

刘 嫻, 王 兵, 付 珂

作者单位: (473058) 中国河南省南阳市, 南阳医学高等专科学校第一附属医院眼科

作者简介: 刘嫻, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 刘嫻. m15165305593@163.com

收稿日期: 2017-04-25 修回日期: 2017-09-28

Therapeutic effect of Ginkgolide B and retinal stem cells transplantation on glaucoma in rats

Xian Liu, Bing Wang, Ke Fu

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473058, Henan Province, China

Correspondence to: Xian Liu. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473058, Henan Province, China. m15165305593@163.com

Received: 2017-04-25 Accepted: 2017-09-28

Abstract

• AIM: To investigate the combination therapeutic effect of Ginkgolide B (GKB) and retinal stem cells (RSCs) transplantation on glaucoma in rats.

• METHODS: Rats were divided randomly into five groups: control group, glaucoma group, RSCs group, GKB group and RSCs combination therapy group. A chronic glaucoma model was established in rats, accordingly. The morphological changes in ocular tissues were analyzed by HE staining. Retinal ganglion cells apoptosis were analyzed by TUNEL staining. The protein expressions of Bcl-2, Bax, Cleaved caspase-3 and Cleaved caspase-9 were determined by Western blot. The mRNA levels of Bcl-2 and Bax were determined by qPCR.

• RESULTS: HE staining revealed that RSCs transplantation or GKB treatment decreased fiber interstitial edema and vacuole, as compared to glaucoma group. Furthermore, this improvement was more pronounced in combination therapy group than in single treatment alone. Combination therapy significantly inhibited retinal ganglion cells apoptosis, increased Bcl-2 mRNA and protein expression, but decreased Bax mRNA and protein expression. Moreover, the protein expression of Cleaved caspase-3 and Cleaved caspase-9 expression were decreased after combination therapy.

• CONCLUSION: Our data demonstrate that combination of Ginkgolide B and retinal stem cells transplantation can inhibit retinal ganglion cells apoptosis and protect

against glaucoma. These effects may be associated with the regulation of Bcl-2, Bax, Cleaved caspase-3 and Cleaved caspase-9 expression.

• KEYWORDS: Ginkgolide B; retinal stem cells transplantation; glaucoma

Citation: Liu X, Wang B, Fu K. Therapeutic effect of Ginkgolide B and retinal stem cells transplantation on glaucoma in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017; 17(11): 2024-2027

摘要

目的: 研究银杏内酯 B 联合干细胞移植对青光眼大鼠的影响及相关机制。

方法: 实验共分为五组: 正常对照组 (Control)、青光眼模型组 (GLA)、干细胞组 (RSCs)、银杏内酯 B 组 (GKB) 与混合组 (RSCs+GKB)。眼球组织进行 HE 染色, TUNEL 染色检测视网膜神经节细胞的凋亡, 免疫印迹法 (Western blot) 检测 Bcl-2、Bax 以及 Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 的蛋白表达水平, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分别检测各组组织中 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平。结果: HE 染色结果显示, 给予干细胞或银杏内酯 B 处理, 减少纤维间质水肿与空泡的出现, 混合组纤维间质少见水肿与空泡; 银杏内酯 B 联合干细胞处理后显著减少视网膜神经节细胞的凋亡, 上调 Bcl-2 的蛋白与 mRNA 表达水平, 并下调 Bax 的蛋白与 mRNA 表达水平、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 的蛋白表达水平。

结论: 银杏内酯 B 联合干细胞能够抑制青光眼大鼠视网膜神经节细胞的凋亡, 改善青光眼, 其作用机制可能与调控 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 因子的表达有关。

关键词: 银杏内酯 B; 干细胞移植; 青光眼

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.11.08

引用: 刘嫻, 王兵, 付珂. 银杏内酯 B 联合视网膜干细胞移植对青光眼大鼠的影响及机制研究. 国际眼科杂志 2017; 17(11): 2024-2027

0 引言

青光眼 (glaucoma) 是慢性进展性的神经变性疾病, 属于主要的致盲性眼病之一, 具有不可逆性。眼内压增高是导致青光眼最重要的因素, 但眼内压增高后导致视网膜神经节细胞凋亡的机制尚未明确。视神经是中枢神经系统的一部分, 损伤后无法进行自我修复^[1]。近年来对青光眼的治疗焦点集中于阻止视网膜神经节细胞的凋亡与促进细胞再生。干细胞是一类具有自我更新和多向分化能力

的细胞。随着对干细胞研究的深入,利用胚胎干细胞移植,分化整合取代神经元功能进而修复神经系统的损伤逐渐成为神经病变的研究热点。猴胚胎神经干细胞在体外能够分化为神经前体细胞、神经元^[2-3]和胶质细胞;随着对神经干细胞研究的深入,发现在胚胎干细胞向神经干细胞分化时,早期全能神经前体细胞是具有玫瑰花环结构的细胞^[4]。银杏内酯 B(ginkgolide B, GKB) 是从银杏叶提取的单体,是银杏叶提取物 EGB761 的主要有效成分之一,活性很强,特异性高^[5]。EGb761 在中枢神经系统具有抗氧化、抑制神经元凋亡的作用,并影响多巴胺类和胆碱类等神经递质的功能,对大脑的认知方面具有改善作用^[6]。研究发现 GKB 能够通过降低视网膜神经节细胞中钙离子浓度与线粒体膜电位抑制缺血和谷氨酸毒性损伤的大鼠视网膜神经节细胞的凋亡^[7]。本实验进一步验证 GKB 联合干细胞移植对青光眼大鼠的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物: SPF 级 SD 大鼠 50 只, 10±2 周龄, 体重 180±10g, 购自北京维通利华试验动物技术有限公司, 许可证编号: SCXK 京 2008-2010; 实验室温度 22℃±2℃, 标准饲料和饮用水喂养, 光照充分。实验试剂: 银杏内酯 B 购自上海齐一生物科技有限公司; GFP 猕猴胚胎干细胞购自赛业生物科技有限公司; 牛血清白蛋白购自美国 Sigma, DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco, 山羊抗大鼠 Bcl-2、山羊抗大鼠 Bax、兔抗大鼠 Cleaved caspase-3、兔抗大鼠 Cleaved caspase-9 和 GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。动物实验经南阳医学高等专科学校动物伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 大鼠青光眼模型的建立 SD 大鼠以 10% 水合氯醛 (0.4mL/100g) 腹腔注射, 麻醉后, 俯卧在手术台, 将 4g/L 奥布卡因滴眼液滴入双眼结膜囊内, 使双眼表面麻醉。以右眼为对照眼, 左眼为实验眼, 将大鼠头部置于裂隙灯显微镜架处, 用 532 二极管激光行左眼 270° 角膜缘血管网和角膜缘颞上、颞下 3 条浅层巩膜静脉血管光凝, 双眼滴入诺氟沙星滴眼液, 隔日在裂隙灯显微镜下观察结膜的充血情况以及角膜水肿和前房的情况。分别于光凝当天、7、14、21d 测量双眼的眼压, 若实验眼眼压高于对照眼眼压 10mmHg 则显示造模成功, 若激光 7d 后实验眼与对照眼眼压差小于 10mmHg, 则造模不成功, 该大鼠退出实验。

1.2.2 视网膜干细胞的培养 绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 猕猴胚胎干细胞分化得到 GFP 猕猴神经干细胞, 培养并收集致密集落, 细胞集落悬浮培养, 形成拟胚体, 贴壁培养, 分化后得到神经干细胞。经生长传代后通过手工挑选, 转至神经分化培养基继续培养, 观察出现玫瑰花环 (rosettes) 状细胞后继续培养, DMEM/F12 培养液重悬细胞, 调整密度为 1×10^8 /mL, 4℃ 保存备用^[8]。

1.2.3 实验分组与给药处理 实验共分为五组, 每组大鼠 10 只: 干细胞组 (RSCs), 实验眼视网膜腔下用微量注射器注入干细胞悬液 3μL; 银杏内酯 B 组 (GKB), 腹腔注射 40μg/mL 银杏内酯 B, 每日一次, 共 14d; 混合组 (RSCs + GKB) 的大鼠给予腹腔注射 40μg/mL 银杏内酯 B, 每日一

次, 共 14d, 并于给药第 1d 于实验眼视网膜腔注射干细胞悬液 3μL; 正常对照组 (Control) 与青光眼模型组 (GLA) 大鼠不给予任何药物处理, 给予等体积生理盐水注射。

1.2.4 苏木素-伊红染色观察眼球组织形态变化 给药完成后, 耳缘静脉麻醉大鼠, 眼角膜缘剪开球结膜, 分离出眼球。将眼球置于 40g/L 多聚甲醛固定, 脱水后加入适量包埋剂, 制成石蜡切片。蒸馏水冲洗, 苏木素染色 5~10min, 自来水冲洗, 10g/L 盐酸乙醇分化 30s, 自来水浸泡 15min, 伊红复染 2~5min, 梯度酒精脱水 (95% 酒精 I - 95% 酒精 II - 无水酒精 I - 无水酒精 II), 二甲苯 I、II 各 1min, 中性树脂封固, 显微镜下观察眼球组织形态变化。

1.2.5 TUNEL 染色观察细胞凋亡情况 分离视网膜在内的后半部分眼杯, 浸入 40g/L 多聚甲醛, 4℃ 固定 1h, 包埋, 切片。40g/L PFA/KPBS 溶液浸染 15min, 滴入 20μg/mL 蛋白酶 K 工作液, 室温孵育 10min, 40g/L PFA 固定 5min, 100μL 平衡液 8min, 滴加反应液并于湿盒中孵育 1h, 37℃, 避光, 终止反应, KPBS 洗涤, 滴入 DAPI 染液, 孵育 15min, 封片, 置于荧光显微镜 520nm 处观察细胞凋亡情况, 分析结果。计算平均凋亡细胞数所占百分比作为凋亡率。

1.2.6 免疫印迹法检测大鼠视网膜组织蛋白表达水平 取各组大鼠视网膜组织蛋白, 加入蛋白裂解液, 蛋白定量后, 调整蛋白量作免疫印迹法 (Western blot) 检测。上样后进行 SDS - PAGE 电泳。完成电泳后, 将蛋白转移至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1h, TBST 快洗一次, 加入相应一抗孵育过夜, 4℃, TBST 液洗涤 3 次, 加入相对应的二抗室温孵育 1h, TBST 液洗涤 3 次, 进行荧光显色 10min。实验重复 3 次。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达水平 取各组大鼠视网膜组织, 按照 Trizol 说明书提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 采用 PCR 仪进行扩增, 所用引物序列: Bax: 上游: 5'-TCCACCAAGAAGCTGACGAG-3', 下游: 5'-GTCCAGCCCATGATGGTTCT-3'; Bcl-2: 上游: 5'-TTCTTTGAGTTCGGTGGGGTC-3', 下游: 5'-TTCTTTGAGTTCGGTGGGGTC-3'; 内参 GAPDH: 上游: 5'-GATGCTGGTGCTGAGTATGRCG-3', 下游: 5'-GTGCTGCAGGATGCATTGCTCTGA-3'。扩增条件: 92℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 54s, 共 32 个循环, 74℃ 延伸 3min。所得结果直接在荧光定量操作系统中进行比较分析, 目标基因的相对定量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。实验重复 3 次。

统计学分析: 运用 SPSS15.0 统计软件分析。计量资料采用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本采用单因素方差 (One - way ANOVA) 进行分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 校正的 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼球组织形态变化情况 青光眼模型的高眼压使视网膜神经产生压迫性损伤, 造成大量神经元死亡, 胞膜破裂, 细胞核聚集, HE 染色不均匀。正常对照组视神经纤维排列整齐紧密, 无炎性细胞; 青光眼模型组的视神经纤维排列不整齐, 可见纤维间质水肿与空泡; 干细胞组的视神经纤维排列无规律, 可见纤维间质水肿与空泡; 银杏内酯 B 组的视神经纤维排列无规律, 多见纤维间质水肿与

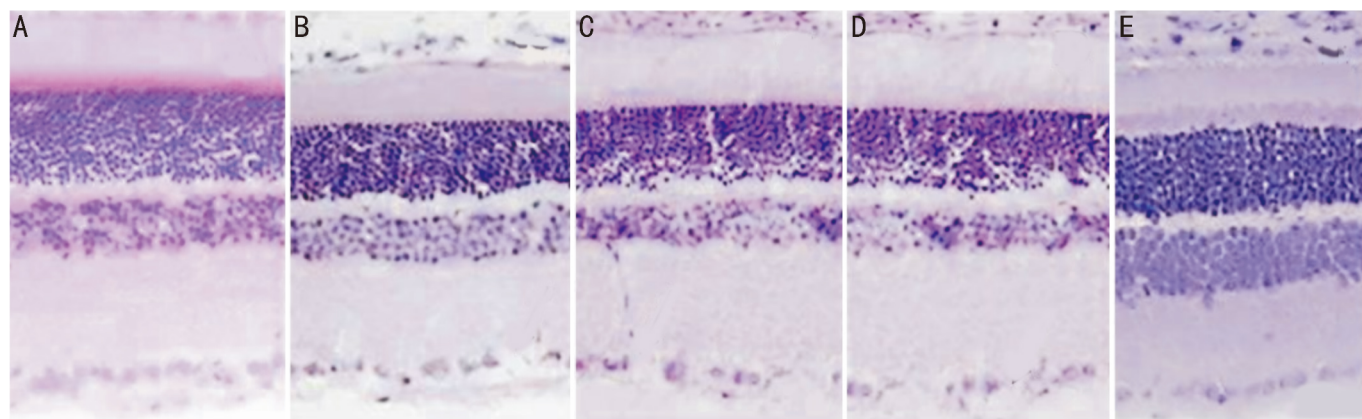


图 1 眼球组织形态变化(HE 染色×200) A: 正常对照组; B: 青光眼模型组; C: 干细胞组; D: 银杏内酯 B 组; E: 混合组。

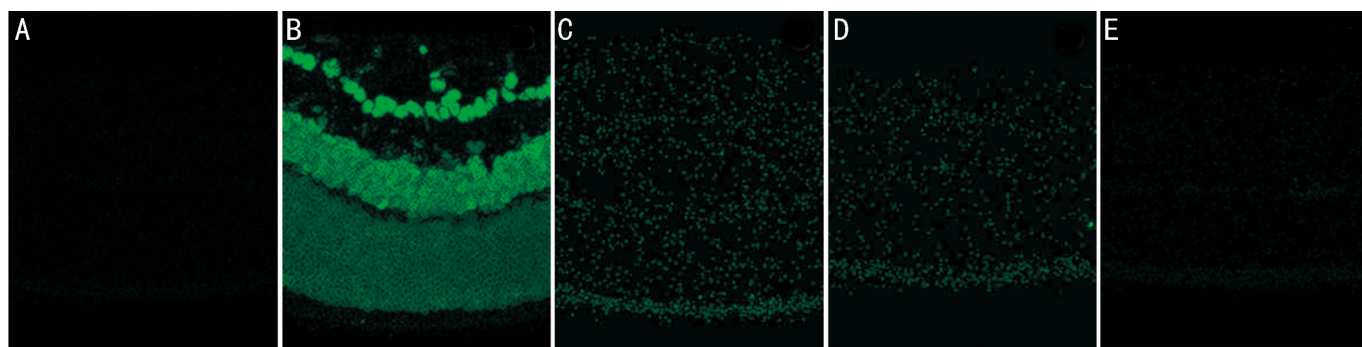


图 2 视网膜神经节细胞凋亡(TUNEL 染色×200) A: 正常对照组; B: 青光眼模型组; C: 干细胞组; D: 银杏内酯 B 组; E: 混合组。

空泡;混合组可见部分视神经纤维排列不整齐,纤维间质少见水肿与空泡(图 1)。

2.2 视网膜神经节细胞凋亡 正常对照组中的 TUNEL 信号呈阴性,凋亡率为(1.5 ± 0.11)%,青光眼模型组可见明显的 TUNEL 阳性信号,凋亡率为(54.67 ± 4.58)%;单独给予干细胞处理,凋亡率为(26.34 ± 2.31)%或银杏内酯 B 凋亡率为(18.67 ± 1.25)%,处理后 TUNEL 阳性信号弱于模型组;联合组凋亡率为(6.57 ± 0.61)%,TUNEL 阳性信号显著弱于干细胞组和银杏内酯 B 组,见图 2、3。

2.3 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 蛋白表达水平 Western blot 检测结果显示,与青光眼模型组相比,干细胞组、银杏内酯 B 组和混合组的 Bcl-2(GLA 组 0.31 ± 0.02 vs RSCs 组 0.56 ± 0.05 , GKB 组 0.60 ± 0.05 , RSCs+GKB 组 0.96 ± 0.07) 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),Bax(GLA 组 4.52 ± 0.24 vs RSCs 组 4.01 ± 0.18 , GKB 组 3.95 ± 0.15 , RSCs+GKB 组 2.35 ± 0.21)、Cleaved caspase-3(GLA 组 3.79 ± 0.21 vs RSCs 组 3.12 ± 0.24 , GKB 组 3.08 ± 0.18 , RSCs+GKB 组 2.42 ± 0.15)和 Cleaved caspase-9(GLA 组 4.31 ± 0.27 vs RSCs 组 3.59 ± 0.22 , GKB 组 3.54 ± 0.19 , RSCs+GKB 组 2.39 ± 0.14)蛋白表达显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中混合组的变化幅度最大,见图 4、5。

2.4 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达水平 与青光眼模型组相比,干细胞组、银杏内酯 B 组和混合组的 Bcl-2 mRNA 表达显著升高和 Bax mRNA 表达显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中混合组的变化幅度最大,见图 6。

3 讨论

青光眼主要以视神经损害和视野缺损为共同特征的一类疾病,已经公认病理性眼压增高是其主要的危险因

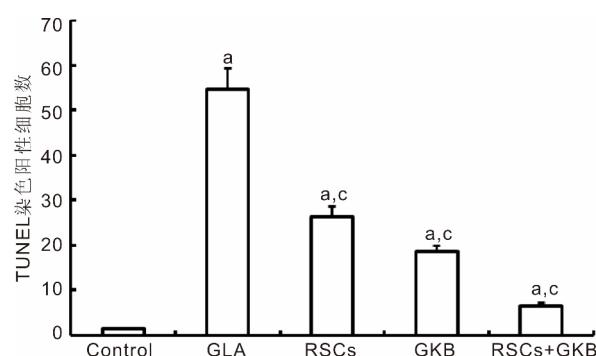


图 3 视网膜神经节细胞凋亡统计图 ^a $P < 0.05$ vs Control 组; ^{a,c} $P < 0.05$ vs GLA 组。

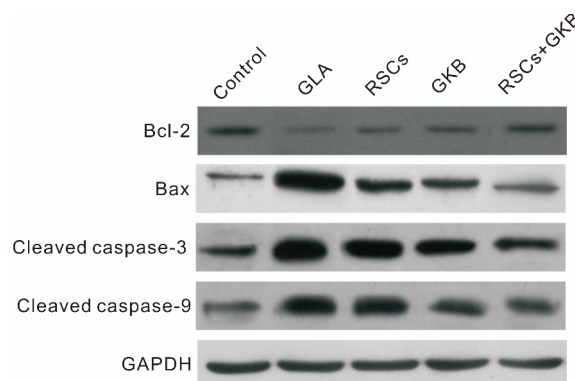


图 4 Western blot 检测大鼠视网膜组织 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 蛋白表达水平。

素,研究认为高眼压可使视神经视网膜组织及其微环境产生相应变化,出现大量的毒性物质,启动凋亡机制,导致视网膜神经节细胞产生进行性凋亡和视神经纤维不可逆的变性。Meyer 等^[8]研究发现,胚胎干细胞移植至小鼠视网

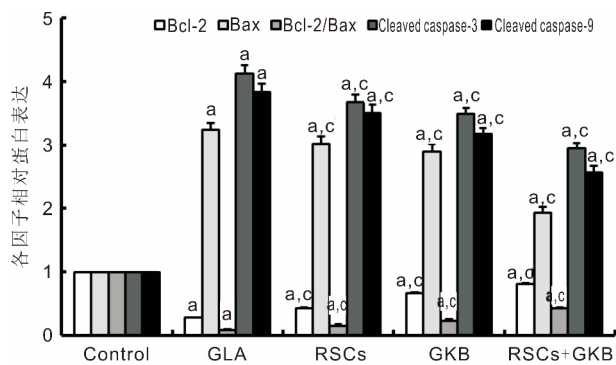


图5 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 蛋白表达水平变化 ^a $P < 0.05$ vs Control 组; ^c $P < 0.05$ vs GLA 组。

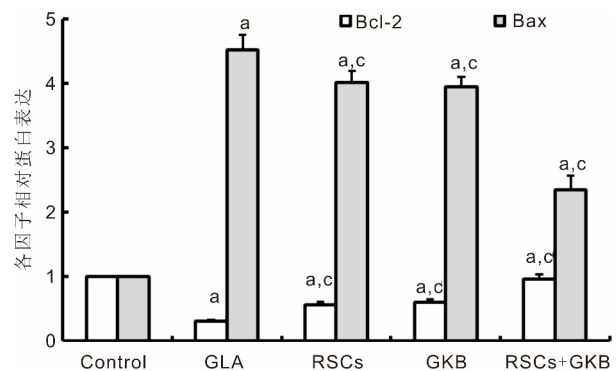


图6 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达水平变化 ^a $P < 0.05$ vs Control 组; ^c $P < 0.05$ vs GLA 组。

膜后可融合至视网膜层内,分化成视网膜神经元,增加视网膜神经元的存活率。Johnson 等^[4]发现当骨髓基质干细胞移植至高眼压鼠后会产生多种神经营养因子,如保护神经节细胞的睫状神经营养因子(CNTF),刺激轴突生长的碱性成纤维生长因子(bFGF)。本研究发现联合应用干细胞和银杏内酯B改善青光眼大鼠视网膜神经的压迫性损伤,减少神经纤维间质水肿与空泡,比单独运用干细胞和银杏内酯B的效果好。与上述文献结果一致,提示银杏内酯B可能对干细胞的分化具有促进作用。

此外,TUNEL 凋亡实验结果显示,银杏内酯B联合干细胞能够减少青光眼视网膜神经节细胞的凋亡,提示银杏内酯B与干细胞具有协同作用,能够增加干细胞对青光眼视网膜神经节细胞凋亡的抑制作用。接着我们开始对其可能的作用机制进行研究。Bcl-2 家族主要参与线粒体凋亡信号通路,通过调节线粒体膜通透性起到双向调节作用^[1]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 之间比例的改变,影响其他蛋白的变化。Caspase 蛋白酶在哺乳动物细胞中介导凋亡,是触发细胞凋亡的关键酶,通过作用于细胞内蛋白质因子来调控细胞凋亡的过程^[12]。

caspase-9 在凋亡过程启动中具有重要作用,caspase-3 可直接使细胞发生凋亡,当细胞凋亡启动后,细胞中 Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 蛋白表达水平显著升高。研究发现,与单独运用干细胞或银杏内酯B相比,干细胞和银杏内酯B联用能显著降低视网膜神经节细胞的凋亡,可能与 Bcl-2 的因子表达显著上调,而 Bax、Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 因子表达显著下调有关。

综上所述,本实验为银杏内酯B协同干细胞治疗青光眼提供了实验基础。银杏内酯B作为一种安全有效的天然药物,值得广泛的关注与开发利用。

参考文献

- 1 Bianco A, Bisciglia L, Russo L, et al. High Mitochondrial DNA Copy Number Is a Protective Factor From Vision Loss in Heteroplasmic Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58(4): 2193-2197
- 2 Honda A, Kawano Y, Izu H, et al. Discrimination of Stem Cell Status after Subjecting Cynomolgus Monkey Pluripotent Stem Cells to Naïve Conversion. *Sci Rep* 2017; 7: 45285
- 3 Huma T, Hu X, Ma Y, et al. Kisspeptin-10 treatment generated specific GnRH expression in cells differentiated from rhesusmonkey derived Lyon NSCs. *Neuroscience* 2017; 349: 318-329
- 4 Pankratz MT, Li XJ, Lavaute TM, et al. Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage. *Stem Cells* 2007; 25(6): 1511-1520
- 5 Gao J, Chen T, Zhao D, et al. Ginkgolide B Exerts Cardioprotective Properties against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Regulating Reactive Oxygen Species, Akt and Calcium Signaling Pathways *In Vitro* and *In Vivo*. *PLoS One* 2016; 11(12): e0168219
- 6 Shu ZM, Shu XD, Li HQ, et al. Ginkgolide B Protects Against Ischemic Stroke Via Modulating Microglia Polarization in Mice. *CNS Neurosci Ther* 2016; 22(9): 729-739
- 7 Hawthorne R, Cromer BA, Ng HL, et al. Molecular determinants of ginkgolide binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem* 2006; 98(2): 395-407
- 8 罗瑶琴. 胚胎干细胞移植治疗视网膜色素变性的相关研究. 南昌大学 2013
- 9 Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, et al. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. *Stem Cells* 2006; 24(2): 274-283
- 10 Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(4): 2051-2059
- 11 Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2011; 18(9): 1414-1424
- 12 McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(4): a008656