

EGb761 对视神经损伤后视神经节细胞自噬的影响

乔 锋,成云翠,刘湘萍,陈 辉,毛少伟,邓叶华

(湖南省衡阳市中心医院,湖南 衡阳,421001)

[摘要] 目的:观察银杏提取物 EGb761 对大鼠视神经损伤后视网膜神经节细胞自噬活性及自噬流的影响,并探讨其作用机制。方法:将 48 只 SD 大鼠随机分为 EGb761 组和对照组,分别给予 EGb761 (150mg/kg·d) 和 0.9% 氯化钠注射液灌胃,均每天 1 次,直到处死。分别于损伤后第 7 天、第 14 天取材,采用免疫组化检测 2 组视网膜神经节细胞自噬相关蛋白 LC3B、自噬标记蛋白 p62 及自噬基因 Beclin-1 及 mTOR 通路蛋白 p-mTOR、p-S6 表达水平,腺病毒 GFP-mRFP-LC3 荧光瞬时转染技术检测自噬流表达。结果:与对照组相比,EGb761 组 LC3B 表达水平升高,p62、p-mTOR 和 p-S6 蛋白表达水平均下降(均 $P < 0.05$);2 组 Beclin-1 差异无统计学意义($P > 0.05$);2 组 GFP 和 mRFP 荧光点数比较,EGb761 组的红点多于对照组,黄点少于对照组(均 $P < 0.05$)。结论:EGb761 能够促进大鼠视神经损伤后视网膜神经节细胞自噬流,其机制可能与促进 mTOR 信号通路中的相关蛋白表达有关。

[关键词] EGb761;视网膜神经节细胞;自噬;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.11.065

Effect of EGb761 on the autophagy of ganglion cells after optic nerve damage

QIAO Feng, CHENG Yun-cui, LIU Xiang-ping, CHEN Hui, MAO Shao-wei, DENG Ye-hua

(Hengyang Central Hospital, Hengyang 421001, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of EGb761, a ginkgo extract, on the autophagy activity and autophagy flux of retinal ganglion cells after optic nerve damage in rats and its mechanism of action. Methods: A total of 48 Sprague-Dawley rats were randomly divided into EGb761 group and control group and were treated with EGb761 (150 mg/kg/day) or 0.9% sodium chloride injection by gavage once a day until being sacrificed. Samples were collected at 7 and 14 days after damage; immunohistochemistry was used to measure the expression of autophagy-related protein microtubule-associated protein light chain 3B (LC3B), autophagy marker protein p62, autophagic gene Beclin-1, and mTOR pathway proteins p-mTOR and p-S6, and adenovirus GFP-mRFP-LC3 transient transfection was used to measure the expression of autophagy flux. Results: Compared with the control group, the EGb761 group had a significant increase in the expression of LC3B and significant reductions in the expression of p62, p-mTOR, and p-S6 (all $P < 0.05$). There was no significant difference in Beclin-1 between the two groups ($P > 0.05$). As for the comparison of fluorescence spots of GFP and mRFP, the EGb761 group had more red spots and fewer yellow spots than the control group (both $P < 0.05$). Conclusion: EGb761 can promote autophagy flux of retinal ganglion cells after optic nerve damage in rats, possibly by promoting the expression of proteins involved in the mTOR signaling pathway.

[Key words] EGb761; retinal ganglion cell; autophagy; experimental study

视神经损伤常造成严重的视功能障碍,其最终结果以视网膜神经节细胞(Retinal Ganglion Cells, RGCs)的变性坏死为主,因此视神经损伤后对 RGCs 的保护成为患者预后的关键。银杏提取物 EGb761 是有效的自由基清除剂和一氧化氮合酶抑制剂,已在临床上显示出良好的视神经保护作用^[1]。病理条件下,自噬作为适应性应激反应能够有效促进细胞存活,对视神经损伤后 RGCs 的保护至关重要。本文通过检测 EGb761 对自噬相关蛋白 LC3B、自噬标记蛋白 p62

及自噬基因 Beclin-1 表达的影响,并观察 mTOR 通路相关蛋白 p-mTOR、p-S6 的变化,以探讨 EGb761 对 RGCs 自噬的影响和机制。

1 实验材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 48 只,体质量 250~300g(南华大学动物实验中心提供),雌雄兼用,眼部检查均未见异常。

1.2 药物 EGb761 由德国史瓦伯(Schwabe)制药厂提供,树龄 3~5 年(批号:9840808);自噬相关蛋白 LC3B、p62、Be-

clin-1 相关一抗、mTOR 信号通路相关一抗购于美国 CST 公司;相关二抗购于美国 AMRESCO 公司;10% 水合氯醛溶液,由南华大学制药厂生产,南华大学科学实验中心提供;多聚甲醛固定液:多聚甲醛 8g、冰醋酸 10mL、丙酮 20mL、PBS 液 170mL、1mol/L 的 NaOH 溶液少许,自配。

1.3 主要仪器 手术显微镜(Yz-20T-III);眼科显微手术器械(苏州医疗器械厂生产);透射电镜(日本电子 JSM-7001F 扫描电子显微镜)。

2 实验方法

2.1 分组与给药 将实验大鼠按随机数字表法分为 EGb761 组和对照组,每组 24 只。手术显微镜下钝性分离暴露视神经,球后 3mm 处,用微型无创血管夹(加持力为 40g)夹闭视神经 30s 后松开,术后术眼无玻璃体腔出血、眼睑闭合良好者纳入实验。2 组均从伤后当日给药,每天 1 次,EGb761 组给予 EGb761(150mg/kg·d)溶于 1.5mL 0.9% 氯化钠注射液灌胃,对照组给予等量 0.9% 氯化钠注射液灌胃。

2.2 指标采集与检测

2.2.1 透射电镜下观察自噬体结构 视网膜组织学光镜下病理改变分别于损伤后第 7 天、第 14 天摘除眼球,4% 多聚甲醛固定 24h,通过视神经制备 5μm 厚的视网膜切片。HE 染色,光镜下观察拍照。透射电镜检测,消化细胞,PBS 漂洗 5min,离心收集细胞团,1% 锇酸及 2.5% 戊二酸双固定,包埋,超薄切片,透射电镜 3 万倍下观察自噬泡。

2.2.2 免疫组织化学观察视网膜神经节细胞自噬活性 视网膜组织切片脱脂,依次进行水化,去除过氧化物酶,抗原修复,羊血清封闭后,加入一抗 LC3B、p62 和 Beclin-1 抗体(1:200),4℃ 摇床孵育过夜,加入相应的二抗于 37℃ 恒温箱中孵育,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木精复染,梯度脱水,烤干封片。每张免疫组化片随机选取 10 个高倍视野,采用定量软件 Quantity One 4.25 分析结果,记录各组的光密度值。以积分光密度均值反映 LC3B、p62 和 Beclin-1 的相对蛋白表达量。实验重复 3 次。

2.2.3 视网膜神经节细胞 p-mTOR、p-S6 蛋白表达水平检测 采用免疫组织化学法检测 p-mTOR 和 p-S6 表达,加入相应抗体,计算其相对蛋白表达量。实验重复 3 次。

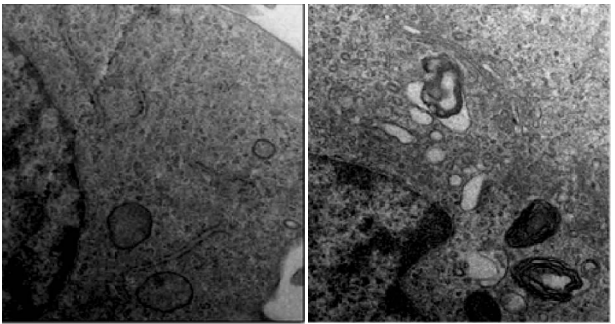
2.2.4 视网膜神经节细胞自噬流检测 采用 GFP-mRFP-LC3 免疫荧光技术。2 组细胞悬液接种到 24 孔板,用腺病毒 GP-mRFP-LC3 瞬时转染视网膜神经节细胞。在 400 倍荧光显微镜下观察,黄色斑点指示自噬流阻断,红色斑点指示自噬流活化。随机采集 300 个细胞的荧光图,统计叠加其黄色亮点和红色亮点个数。实验重复 3 次。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用组间比较成组设计定量资料的 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 透射电镜分析自噬泡 透射电镜下观察,与对照组相

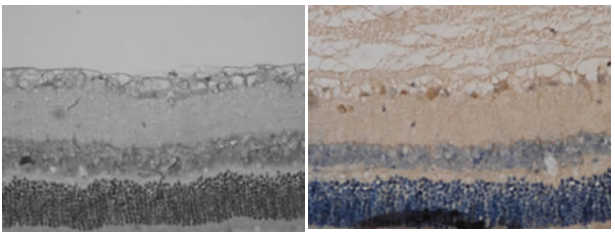
比,经 EGb761 处理后,EGb761 组细胞内可见明显的自噬体结构(白色空泡),自噬泡数量和大小均明显优于对照组。(见图 1)



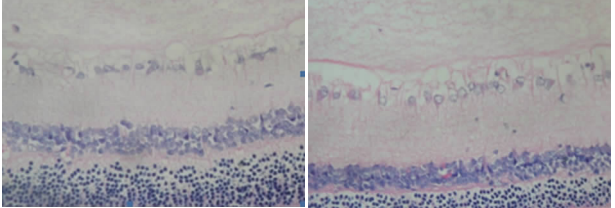
对照组 EGb761 组

图 1 透射电镜下观察自噬体结构

3.2 视网膜组织学光镜下病理改变 EGb761 组视网膜厚度变薄,RGCs 数量减少,可见部分细胞核变性,裂解;对照组视网膜萎缩,RGCs 数量显著低于实验组,RGCs 有较多空泡。(见图 2)



EGb761 组第 7 天 对照组第 7 天



EGb761 组第 14 天 对照组第 14 天

图 2 2 组光镜下视网膜组织病理改变

3.3 2 组 LC3B、p62、Beclin-1、p-mTOR、p-S6 蛋白相对表达量比较 EGb761 组 LC3B 表达量高于对照组,p62、p-mTOR、p-S6 表达量均低于对照组,差异均有统计学意义;2 组 Beclin-1 表达量差异无统计学意义。(见表 1)

表 1 2 组 LC3B、p62 和 Beclin-1 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3B	p62	Beclin-1	p-mTOR	p-S6
EGb761 组	3	0.896±0.009 ^a	0.276±0.016 ^a	0.269±0.044 ^b	0.101±0.021 ^a	0.182±0.037 ^a
对照组	3	0.279±0.021	0.533±0.031	0.268±0.026	0.410±0.023	0.319±0.025

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05,^b*P* > 0.05。

3.4 2 组视网膜神经节细胞双荧光自噬流检测结果比较 EGb761 组黄点少于对照组,红点多于对照组,差异均有统计学意义。(见表 2)

表 2 2 组 GFP 和 mRFP 荧光点数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	GFP 荧光点数(黄点)	mRFP 荧光点数(红点)
EGb761 组	5. 529 $\pm$ 2. 236 ^a	140. 197 $\pm$ 9. 109 ^a
对照组	61. 236 $\pm$ 4. 321	7. 368 $\pm$ 4. 347

注:与对照组比较,^a $P < 0. 05$ 。

4 讨 论

在神经损伤病理过程中,自噬作为一种保护机制扮演重要角色,同样参与视神经疾病的发生和发展^[2]。目前已证实病理状态下自噬对 RGCs 有保护作用,可增加创伤后细胞的存活数量^[3]。EGb761 具有清除氧自由基、稳定细胞膜、避免钙离子内流等药理作用,现广泛应用于视神经疾病的临床治疗。然而对于两者之间的联系及相关机制少见报道。鉴于此,本实验建立大鼠视神经损伤模型,通过该模型观察 EGb761 对视网膜神经节细胞自噬的调控作用。

目前认为 EGb761 在调控自噬上存在双重作用,即 EGb761 可强化自噬和抑制自噬,但主流倾向于 EGb761 诱导和促进 RGCs 自噬,从而产生保护效果^[4-5]。我们的实验结果发现,EGb761 不但可以减少视神经受损后 RGCs 的凋亡、延长 RGCs 的存活时间,而且可促进 RGCs 自噬,说明 EGb761 很可能通过加强自噬达到对视网膜神经节细胞的保护作用。为了研究自噬水平,我们检测了自噬体膜上的自噬相关蛋白 LC3B、自噬标记蛋白 p62 及自噬基因 Beclin-1。本研究结果证实,在病理损伤环境下,EGb761 可提高 RGCs 自噬水平(升高 LC3B、降低 p62)。

Beclin-1 可与多种因子相互作用,是细胞自噬的核心调控因子,同时是自噬体形成不可或缺的条件^[6-7],但对照组与 EGb761 组相比,Beclin-1 表达并无统计学差异,表明 EGb761 对自噬的影响并不依赖 Beclin-1 的表达。为了进一步探讨 EGb761 对自噬活性的调节机制,我们对 mTOR 信号通路进行研究。mTOR 信号通路是多条调节细胞自噬信号通路的汇聚点,对自噬的发生起重要作用^[8]。磷酸化 mTOR(p-mTOR)及磷酸化 S6(p-S6)的表达水平可反映 mTOR 通路激活程度^[9],p-mTOR 及 p-S6 表达下降提示 mTOR 信号通路抑制,造成显著激活自噬活性^[10]。本研究结果显示,EGb761 能通过抑制 mTOR 通路(p-mTOR、p-S6 表达下降),从而激活 RGCs 的自噬水平(LC3B 升高、p62 降低)。

自噬由吞噬、融合、降解等多个步骤组成,自噬流是这些步骤在细胞内的动态生物学过程^[11]。因此,通过检测自噬流来判断自噬的生物学功能将更加直观、准确。本实验结果显示,与对照组相比,EGb761 组的 GFP、mRFP 增多,提示 EGb761 促进了 RGCs 自噬小体和自噬溶酶体的升高,说明 EGb761 通过促进 RGCs 自噬小体的形成,从而提升自噬流水平。

综上所述,EGb761 可能通过抑制 mTOR 相关信号通路提升自噬流水平,从而促进了 RGCs 的存活。

参考文献

- [1] 李丽敏,程益清,孙健,等. 银杏叶提取物及其制剂指纹图谱和掺伪检验方法的建立[J]. 中成药,2016,38(7):1551-1556.
- [2] Hu L, Wang H, Huang L, et al. Crosstalk between autophagy and intracellular radiation response(Review)[J]. Int J Oncol, 2016, 10(5):3719.
- [3] Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy[J]. Exp Mol Med, 2012, 44(2):73-80.
- [4] 白钰,吕全胜,马晓丽. 银杏叶提取物对 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(16):1495-1498.
- [5] Seino M, Okada M, Shibuya K, et al. Differential Contribution of ROS to Resveratrol-induced Cell Death and Loss of Self-renewal Capacity of Ovarian Cancer Stem Cells[J]. Anticancer Res, 2015, 35(1):85-96.
- [6] Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes[J]. Biochimie, 2008, 90(2):313-323.
- [7] Habibie, Yokoyama S, Abdelhamed S, et al. Survivin suppression through STAT3/ β -catenin is essential for resveratrol-induced melanoma apoptosis[J]. Int J Oncol, 2014, 45(2):895-901.
- [8] Patel KR, Andreadi C, Britton RG, et al. Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(205):133-205.
- [9] Gatica D, Chiong M, Lavandero S, et al. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system[J]. Circ Res, 2015, 116(3):456-467.
- [10] Cheng BC, Huang HS, Chao CM, et al. Hypothermia may attenuate ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death by reducing autophagy[J]. Int J Cardiol, 2013, 168(3):2064-2069.
- [11] Miki H, Uehara N, Kimura A, et al. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells[J]. Int J Oncol, 2012, 40(4):1020-1028.

(收稿日期:2018-03-21)

红薯味美 食养有道(三)

(3)不宜生吃。因为生红薯中淀粉的细胞膜未经高温破坏,人体很难消化。同时,在煮红薯时,还应适当延长蒸煮的时间,这样更加有利破坏红薯中所含有的“气化酶”,食后才不会出现腹胀、烧心、打嗝、反胃、排气等不适感觉。(4)因人而异。以下几类人群尽量少食用红薯:一是有草酸性肾结石的人,因为红薯含有大量的草酸盐。二是慢性胃病、返流性食管炎和胃溃疡的人不要食用红薯,防止引起吐酸水和烧心感,使病情加重。三是脾胃虚弱的人不要食用红薯,防止引起腹部不适,甚至腹泻。
(http://www.cntcm.com.cn/yskp/2018-11/01/content_51996.htm)