

黄芩苷锌对改善缺血性视神经损伤中氧化应激反应及 激活血源性因子修复血神经屏障的作用和机制

任仲坤¹, 杨智勇¹, 李园园¹, 刘旭², 蔡传英³, 张荣平^{2*}, 杨晖^{2*}

(1. 昆明医科大学 生物医学工程中心, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学 第一附属医院, 昆明 650032;
3. 昆明医科大学 药学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:**探讨黄芩苷锌(HBZn)改善缺血性视神经损伤模型中氧化应激损伤及修复血神经屏障(BNB)的作用及机制。**方法:**单侧夹闭颈总动脉法建立小鼠视神经损伤模型,随机分为缺血损伤组、假手术组、黄芩苷锌组(3.75, 6.5, 13 mg·kg⁻¹),黄芩苷组及葡萄糖酸锌(zinc gluconate)组。超微电镜观察视神经细胞线粒体的结构;比色法检测缺血损伤2 h后各组小鼠血浆中超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),髓过氧化物酶(MPO)的变化。RNA 实时荧光定量 PCR 检测基质金属蛋白酶(MMPs)/基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)的 mRNA 表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)测定视神经组织中免疫球蛋白 G(IgG)(缺血后 12 h),纤维蛋白原(Fibrinogen,缺血后 28 h),MMP-9(缺血后 2 d)蛋白表达水平。**结果:**黄芩苷锌(6.5 mg·kg⁻¹)组能保护缺血导致的线粒体损伤,增强机体的抗氧化应激能力,激活 SOD 活性,降低 MDA, MPO 水平。能修复血神经屏障, IgG, Fibrinogen, MMP-9 等血源性因子蛋白表达量增加,调节 MMPs/TIMPs 的平衡。**结论:**黄芩苷对缺血性视神经损伤有保护作用,作用明显优于单独用药的等摩尔浓度 HB 组和等摩尔浓度锌的葡萄糖酸锌组,其作用机制可能与保护线粒体,抑制小鼠视神经组织中血源性因子 IgG, Fibrinogen, MMP-9 的激活,抑制 MMPs 家族的表达,调节 MMPs/TIMPs 的平衡和异常沉积来修复血神经屏障有关,同时证明黄芩苷和锌的络合物增强了单体抗氧化应激和缺血性损伤的能力。

[关键词] 黄芩苷锌; 视神经损伤; 氧化应激; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 髓过氧化物酶; 免疫球蛋白 G; 纤维蛋白原; 基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0124-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210124

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1126.052.html>

[网络出版时间] 2017-08-09 11:26

Effect of HBZn in Repairing BNB in Mice by Alleviating Anti-oxidative Stress and Activating Hematogenous Factors in Optic Nerve Injury

REN Zhong-kun¹, YANG Zhi-yong¹, LI Yuan-yuan¹, LIU Xu², CAI Chuan-ying³,
ZHANG Rong-ping^{2*}, YANG Hui^{2*}

(1. Biomedical Engineering Center, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;
2. The First Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650032, China;
3. School of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of baicalin zinc (HBZn) in repairing BNB in mice by alleviating anti-oxidative stress and activating hematogenous factors in optic nerve injury. **Method:** A model of

[收稿日期] 20170615(009)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B00);云南省教育厅指导性项目(2017ZDX157);云南省教育厅项目(K132044);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项(2015FB010);云南省南药协同创新项目

[第一作者] 任仲坤, 博士, 主治医师, 从事神经系统疾病临床与实验研究, Tel: 15911632537, E-mail: rzk841@126.com

[通讯作者] * 张荣平, 博士, 教授, 从事药物化学研究, Tel: 0871-65922934, E-mail: zhrpkm@163.com

* 杨晖, 硕士, 讲师, 从事免疫药理学基础研究, Tel: 0871-65922934, E-mail: yanghuiurz@126.com

optic nerve injury in mice was established by unilateral interlocking carotid artery, and the mice were divided into 7 groups, namely ischemia group, sham operated group, HBZn group (3.75, 6.5, 13 mg·kg⁻¹), HB group, and zinc gluconate group. Each group was administered by gavage for 5 days before operation. Optic nerve crush injury was made on every group, except for sham group. Mitochondrias were observed under electron microscope; superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and myeloperoxidase (MPO) of plasma were measured by colorimetric. The expressions of immunoglobulin G (IgG), Fibrinogen and matrix metallo protein9 (MMP-9) were detected by Western blot. MMPs/TIMPs were detected by qPCR. **Result:** HBZn can effectively prevent the injury of mitochondria, reduce the concentrations of MDA and MPO, increase the concentration of SOD, compared with HB group and zinc gluconate group ($P < 0.05$). HBZn can reduce the expressions of IgG, Fibrinogen and MMP-9 more effectively than ischemia group, suppress the expression of the MMPs family and adjust the balance of MMPs/TIMPs. **Conclusion:** HBZn can protect the optic nerve injury in mice, and its mechanism may be correlated with the ability to resist oxidative stress and the activating MMP-9, IgG and Fibrinogen. HBZn has better anti-oxidative and repairing abilities than monomer baicalin and trace element zinc.

[**Key words**] baicalin zinc (HBZn); optic nerve injury; oxidative stress; superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde (MDA); myeloperoxidase (MPO); immunoglobulin G (IgG); Fibrinogen; matrix metalloprotein-9 (MMP-9)

视神经是一个独立的组织,它通过视网膜将信息传输至视皮质,由视神经胶质和视网膜神经节细胞的轴索组成^[1]。有研究报道缺血缺氧导致的氧化应激损伤能导致视神经节细胞的轴突损伤继而影响线粒体功能引起细胞凋亡^[2]。也有研究报道提示免疫球蛋白 G (IgG),基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)及纤维蛋白原(Fibrinogen)等血源性因子在缺血性疾病中呈现高表达状态。因此 MMP 家族, Fibrinogen 及 IgG 在缺血性疾病功能修复治疗中可否能作为新的药物靶点成为人们关注的热点。

黄芩苷锌(HBZn)是由黄芩苷(HB)与二价锌离子(Zn²⁺)形成的配合物。本课题组在曹治权教授提出的中药有效成分的配位学说^[3]的基础上设计合成了络合物 HBZn(已申请专利,专利号 CN100998576A),黄芩苷是中药黄芩的提取物,具有很强的抗氧化性,微量元素锌也具有强抗氧化性。本课题组前期研究表明络合物黄芩苷锌抗消化性溃疡机制中抗炎抗氧化应激及黏膜修复作用明显,且强于配体黄芩苷及微量元素锌单独作用^[4-5]。因此本实验将黄芩苷锌作用于缺血性视神经损伤模型小鼠,进一步探讨其对缺血性神经性疾病的保护作用 and 机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 HBZn(相对分子质量为 632.38,含锌量 10.35%,昆明医科大学药学院提供,批号 040616);HB(相对分子质量 446.36,西安小草植物科技有限公司,批号 21967-41-9);葡萄糖

酸锌(zinc gluconate,ZG,相对分子质量 455.686,含锌量 14.28%,海南制药厂有限公司,批号 4668-02-4);戊巴比妥钠(分析纯,北京普博斯生物,批号 20120609);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20141209,20150107,20150102);RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(美国 Sigma 公司,批号分别为 NO.83913,NO.GE27-9261-01);抗 IgG, Fibrinogen, MMP-9 抗体,β-肌动蛋白(β-actin)(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab171870,ab6666,ab38898,ab6276)。

1.2 动物 清洁级昆明种小鼠,210 只雄性,体重(18~22)g,由昆明医科大学实验动物学部提供,合格证号 SCXK(滇)2005-0009。实验的开展取得了昆明医科大学实验动物伦理委员会批准(编号 LA-2013-254)。

1.3 仪器 SpectraMax i3x 型多功能酶标仪(美谷分子仪器有限公司);GT16-3 型高速台式离心机(北京时代北利有限公司);749521-0590 型微量组织匀浆器(美国 Kimble 公司);1645070 型电泳仪,Trans-Blot SD 型转移电泳槽,70-3848 型半干转模仪,GelDox XR 凝胶成像系统,CFX96 型荧光定量 PCR(qPCR)仪(美国伯乐公司);HT7700 型透射电子显微镜(日立高新公司)。

2 方法

2.1 模型建立及分组 根据课题组前期工作基础^[4-6],在 HBZn 对消化性溃疡保护作用机制研究的

实验结果中得出 HBZn 的最佳有效剂量为 $6.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。因此实验分组为 HBZn ($3.8, 6.5, 13 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组; 黄芩苷组 ($4.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); ZG 组 ($9.28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 假手术组 (Sham-operated) 给予等体积溶媒 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 缺血损伤组 (Ischemia) 灌胃同假手术组。各组小鼠连续灌胃 5 d, 造模前 30 min 给药 1 次, 采用结扎单侧 (左侧) 颈总动脉的方法造模^[7], 1% 的戊巴比妥钠 ($0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉, 沿颈部正中做长约 1 cm 切口, 分离皮下组织, 暴露至气管, 向气管左侧深部组织分离左侧颈总动脉, 用血管夹夹闭左侧颈总动脉, 开始计时, 30 min 后移除血管夹, 逐层关闭切口。假手术组不夹闭颈总动脉。夹闭左侧颈总动脉后直接检眼镜下 (托吡卡胺散瞳) 观察小鼠左眼底视网膜色苍白, 视网膜动脉血流完全中断提示造模成功, 解除血管夹后见视网膜颜色呈橘红色, 视网膜动脉血流恢复, 提示形成再灌注。

2.2 比色法检测小鼠血浆中 SOD, MDA, MPO 水平 取小鼠腹主动脉血, 分离血浆, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 根据试剂盒使用说明操作步骤处理血浆, 应用全自动电化学发光仪 (美国罗氏 COBAS) 检测。

2.3 电镜切片 造模后 2 h 将各组小鼠用 1% 的戊巴比妥钠腹腔注射过量麻醉处死, 立即摘取左侧眼球, 保留视神经 $0.5 \sim 1 \text{ mm}$, 将标本置于电镜固定液中 (由昆明医科大学电镜室提供) 固定 24 h。剪除角膜, 晶状体摘除, 清除玻璃体, 流水缓慢冲洗标本进行电镜切片, 电镜下观察各分组视网膜组织形态病理学变化。

2.4 Real-time PCR 检测 MMPs, TIMPs mRNA 的表达 用 RNA 提取试剂盒提取小鼠视神经组织中 RNA; 逆转录试剂盒逆转录后, 以适量反转录所得的为模板在聚合酶催化下进行扩增。引物合成及 DNA 测序由上海捷瑞生物有限公司完成。所用引物、退火温度、扩增片段长度及扩增条件见表 1。扩增条件为预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min, 进入循环, $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 4 min, 退火 1 min , $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min, 30 个循环后, $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 终末延展 8 min, 将 PCR 产物置于 1.5% 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 随后放于凝胶图像分析系统行吸光度 A 扫描。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠视神经组织中 IgG, Fibrinogen, MMP-9 蛋白表达 用蛋白提取试剂盒提取小鼠视神经总蛋白, 上样蛋白均平衡总量为 $40 \text{ } \mu\text{g}$, 室温下进行 12% SDS-PAGE 丙烯酰胺凝胶电泳, 湿转法转至 PVDF 膜上, 孵育相应的一

表 1 MMPs, TIMPs and β -actin 的引物序列
Table 1 Primers of MMPs, TIMPs and β -actin

基因	引物序列	扩增片段长度 / bp	退火温度 / $^\circ\text{C}$
MMP-2	上游 5'GGAGGCACGATTGGTCTG-3'	299	55
	下游 5'TTGTTTCCGCATGGTCT-3'		
TIMP-2	上游 5'CCAAAGCACTGAGCGAGAA-3'	386	56
	下游 5'CATCCAGAGGCACTCATCC-3'		
MMP-9	上游 5'GCCTGGCACATACTAGGCC-3'	379	64
	下游 5'CTTCCTAGCCAGCCGGC-3'		
TIMP-1	上游 5'CTGTTGTTCGCTGTGGCTG-3'	305	54
	下游 5'TGCAGTTTCCAGCAATGAG-3'		
β -actin	上游 5'TCCCTCAAGATTGTCAAGAA-3'	164	58
	下游 5'AGATCCACAACGGATACATT-3'		

抗 (Rabbit IgG, 1:2 000); (Anti-Fibrinogen antibody 1:1 000); (Anti-MMP-9 antibody, 1:2 000); Anti-TIMP-1 antibody-Carboxyterminal end (1:2 000); $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, TBST 清洗 3 次, 加二抗 (稀释比例为 1:2 000) 室温孵育 1 h。通过 Image-Pro Plus 图像分析系统分析目的条带, 以各组 β -actin 条带的积分吸光度 IA 标化其蛋白的表达量。

2.6 统计学方法 数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 计量数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据间的统计采用 One-way ANOVA 分析方法, 组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HBZn 对缺血视神经小鼠血浆中 SOD, MDA, MPO 水平的影响 与假手术组相比, 模型组 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$), MPO 与 MDA 水平升高 ($P < 0.05$)。HBZn 中剂量组能有效升高血浆中的 SOD 活性, 降低 MDA, MPO 水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。等摩尔浓度的黄芩苷组及等摩尔浓度锌葡萄糖酸锌组也能升高小鼠血浆中的 SOD 活性, 降低 MDA 和 MPO 水平, 但不及 HBZn ($6.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 明显。提示 HBZn 的抗氧化应激作用明显强于黄芩苷单体及微量元素锌的单独作用, 即黄芩苷和锌的结合增强了黄芩苷单体的抗氧化应激能力。HBZn 3 个剂量组间比较, 中剂量组对 SOD 的升高及对 MDA 的降低作用明显优于低、高剂量组。但中剂量组降低 MPO 活性与低、高剂量组相比差异不明显, 无统计学意义。见表 2。

3.2 HBZn 对小鼠神经细胞中线粒体的影响 电镜下观察各组小鼠视神经的超微结构变化, 正常视神经由轴突及完整包绕在轴突外的密度较高的

表 2 HBZn 对视神经损伤小鼠血清中 SOD, MDA, MPO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

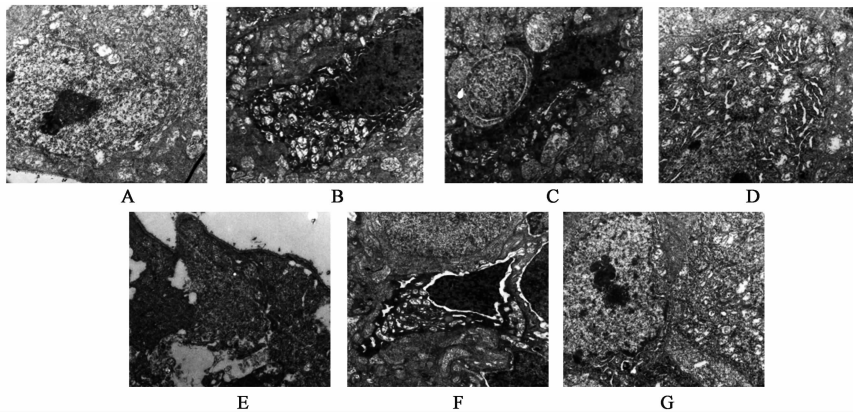
Table 2 Effect of HBZn on levels of SOD, MDA and MPO in serum of mice with optic nerve injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MPO/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	22.093 ± 0.09	0.911 ± 0.06	36.095 ± 0.09
模型	-	7.033 ± 0.10 ²⁾	2.391 ± 0.03 ²⁾	102.212 ± 0.13 ²⁾
HBZn	3.75	6.751 ± 0.06 ²⁾	2.191 ± 0.11 ²⁾	55.116 ± 0.06 ^{1,4)}
	6.5	17.627 ± 0.11 ^{1,3)}	1.071 ± 0.02 ³⁾	47.121 ± 0.11 ⁴⁾
	13.0	10.124 ± 0.32 ²⁾	3.751 ± 0.19 ¹⁾	40.252 ± 0.07 ⁴⁾
黄芩苷	4.6	12.094 ± 0.13 ^{1,3)}	3.541 ± 0.04 ¹⁾	75.077 ± 0.11 ^{2,3)}
葡萄糖酸锌	9.28	8.153 ± 0.11 ²⁾	4.003 ± 0.22 ^{2,3)}	60.053 ± 0.21 ^{2,4)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3,4 同)。

髓鞘规则排列而成,大部分呈圆形或椭圆形,粗细均匀,可见含量丰富的微丝。轴突外的髓鞘呈层层相绕的环形致密结构,明暗相间无皱缩,断裂。如图 1 所示,模型组的视神经纤维蜕变消失,呈空泡样结构,可见大小不等密度较高的髓鞘或密度中等的呈退化状的髓鞘。HBZn 中剂量组视神经组织髓神经纤维大小不一,与损伤组织相比,视神经密度增高,轴突内微管微丝略增多,但仍分布

不均,部分线粒体肿胀,内外膜完整,可见少量糖元颗粒减少,受损程度略好转。HBZn 低、高剂量组则线粒体内外膜破裂,嵴结构较模糊不清,糖原颗粒减少;等摩尔浓度黄芩苷组部分线粒体肿胀,内外膜损伤明显,嵴结构较清晰,少量肌丝模糊有空泡变,糖元颗粒减少。等摩尔浓度葡萄糖酸锌组线粒体外膜溶解破裂,损伤明显,线粒体嵴消失,只见少量的糖元颗粒。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C~E. HBZn(3.37,6.5,13 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组; F. 黄芩苷组;G. 葡萄糖酸锌组(图 2 同)

图 1 HBZn 对各组小鼠视神经神经节细胞超微结构中线粒体的影响(电镜, $\times 15\ 000$)

Fig. 1 Effect of HBZn on mitochondria in cell ultrastructure of optic ganglia in mice under electron microscope (TEM, $\times 15\ 000$)

3.3 HBZn 对缺血后不同时间点视神经组织 MMPs

mRNA, TIMPs mRNA 表达的影响 与假手术组相比,模型组的 MMP-2, TIMP-2, MMP-9, TIMP-1 的 mRNA 表达是明显升高的 ($P < 0.05$), TIMP-2/MMP-2 和 TIMP-1/MMP-9 的表达失衡参与了视神经损伤的病理过程,HBZn 中剂量组 MMP-2, TIMP-2, MMP-9, TIMP-1 mRNA 升高不及其他组明显,但其 TIMP-2 mRNA/MMP-2 mRNA 明显大于其他组 ($P < 0.05$)。提示 HBZn 中剂量能抑制小鼠视神经组织中 MMP-2, MMP-9 mRNA 的表达,调节 TIMP-2/MMP-2 和 TIMP-1/MMP-9 的平衡。见

表 3。

3.4 HBZn 对视神经组织 IgG (12 h), Fibrinogen (28 h), MMP-9(2 d) 蛋白表达的影响

不同时相血源性因子 IgG(12 h), Fibrinogen(28 h), MMP-9(2 d) 的表达与同时相的假手术组相比表达明显升高 ($P < 0.05$), HBZn 中剂量组能明显降低 IgG (12 h), Fibrinogen(28 h), MMP-9(2 d) 的表达 ($P < 0.05$), 同时相的黄芩苷组和葡萄糖酸锌组也有所降低,但不及 HBZn 中剂量组明显。提示 HBZn 能有效抑制血源性因子 IgG(12 h), Fibrinogen(28 h), MMP-9(2 d) 的蛋白表达,修复 BNB。见表 4,图 2。

表 3 HBZn 对视神经组织 MMPs, TIMPs mRNA 表达的影响 (2 d) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of HBZn on level of MMPs, TIMPs mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MMP-2	TIMP-2	TIMP-2/MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-1/MMP-9
假手术	-	0.079 ± 0.020	0.099 ± 0.055	1.253 ± 0.0122	0.091 ± 0.022	0.110 ± 0.033	1.20 ± 0.102
模型	-	0.427 ± 0.021 ²⁾	0.357 ± 0.021 ²⁾	0.836 ± 0.018 ¹⁾	0.679 ± 0.021 ²⁾	0.379 ± 0.028 ²⁾	0.558 ± 0.118 ¹⁾
HBZn	3.75	0.284 ± 0.070 ^{1,3)}	0.247 ± 0.031 ^{1,3)}	0.869 ± 0.054	0.403 ± 0.070 ^{2,3)}	0.231 ± 0.019	0.573 ± 0.054 ¹⁾
	6.50	0.141 ± 0.020 ³⁾	0.156 ± 0.011 ³⁾	1.060 ± 0.076 ³⁾	0.139 ± 0.020 ^{1,4)}	0.129 ± 0.033 ³⁾	0.928 ± 0.076 ³⁾
	13.00	0.172 ± 0.120 ^{1,3)}	0.151 ± 0.019 ^{1,3)}	0.877 ± 0.060 ¹⁾	0.300 ± 0.011 ²⁾	0.281 ± 0.010	0.748 ± 0.117
黄芩苷	4.60	0.218 ± 0.026 ^{1,3)}	0.199 ± 0.051 ^{1,3)}	0.912 ± 0.023	0.407 ± 0.010 ^{2,3)}	0.291 ± 0.010	0.714 ± 0.116
葡萄糖酸锌	9.28	0.192 ± 0.021 ³⁾	0.187 ± 0.017	0.973 ± 0.057	0.396 ± 0.008 ²⁾	0.227 ± 0.035	0.635 ± 0.057 ¹⁾

表 4 HBZn 对小鼠视神经组织中 IgG (12 h), Fibrinogen (28 h), MMP-9 (2 d) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of HBZn on protein expressions of IgG (12 h), Fibrinogen (28 h), MMP-9 (2 d) in optic nerve tissues in mice. ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IgG/ β -actin(12 h)	Fibrinogen/ β -actin(28 h)	MMP-9/ β -actin(2 d)
假手术	-	0.116 ± 0.021	1.071 ± 0.013	0.911 ± 0.102
模型	-	4.217 ± 0.903 ²⁾	5.115 ± 0.160 ²⁾	5.021 ± 0.118 ²⁾
HBZn	3.75	3.005 ± 0.070 ²⁾	4.066 ± 0.170 ²⁾	4.324 ± 0.054 ²⁾
	6.5	1.951 ± 0.020 ^{1,4)}	1.197 ± 0.125 ⁴⁾	1.950 ± 0.076 ⁴⁾
	13	3.774 ± 0.120 ²⁾	2.558 ± 0.011 ^{1,3)}	3.770 ± 0.117 ^{2,3)}
黄芩苷	4.7	2.357 ± 0.041 ^{2,3)}	3.179 ± 0.112 ^{1,3)}	3.333 ± 0.116 ^{2,3)}
葡萄糖酸锌	9.28	3.223 ± 0.330 ²⁾	4.003 ± 0.033 ²⁾	3.695 ± 0.057 ^{2,3)}

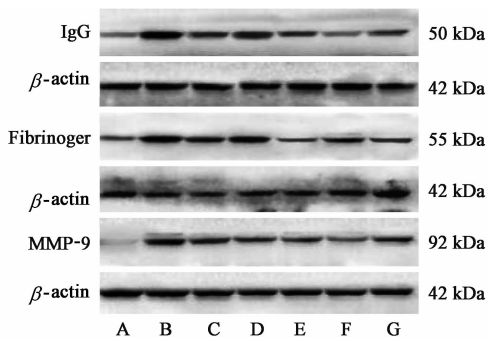


图 2 HBZn 对小鼠 IgG, Fibrinogen, MMP-9 蛋白表达的影响
Fig. 2 Effect of HBZn on levels of IgG, Fibrinogen and MMP-9 in mice

4 讨论

缺血性视神经损伤是一个涉及视神经细胞能量代谢紊乱,氧化应激损伤及神经细胞凋亡等多个环节的复杂病理过程,损伤后血-神经屏障(BNB)及线粒体结构的修复起到关键作用^[8]。在电镜下观察到缺血损伤后 2 h 线粒体肿胀,内外膜损伤严重,扩张,部分嵴模糊,排列不整齐,肌浆网扩张,肌丝模糊空泡变,糖元颗粒减少,内质网肿胀,崩溃,自溶,可见凋亡小体,HBZn 能够有效的减少缺血缺氧造成的线粒体膜损伤,线粒体结构完整,有效的保护视神经损伤。缺血损伤疾病对血浆中 SOD,MDA 水平的检测目前已经成为损伤严重程度的评价指标之一,MDA 是脂质过氧化反应的主要产物之一。研究发现,HBZn 能够一定程度地降低小鼠血浆中 MDA,升高 SOD。MPO 水平与中性粒细胞活化密切相关,目前也

作为炎症指标用于缺血性疾病的检测,实验发现 HBZn 能够降低小鼠血浆中缺血缺氧损伤所致的 MPO 值升高。提示 HBZn 可能通过抑制中性粒细胞介导的炎症反应发挥神经细胞的保护作用。

在缺血损伤的同时,缺血部位破损血管中会有一组血源性因子溢出,这些因子由正常组织细胞和炎症及肿瘤细胞产生^[9-11],参与视神经损伤发生后 BNB 修复过程。主要包括 IgG, Fibrinogen 及 MMP-9 等。IgG 是血清中主要的抗体成分,量化 IgG 表达检测 BNB 的破坏和修复情况已成为周围神经系统损伤检验的常规方法^[12]。血液中的 IgG 透过 BNB 沉积于视神经,而血源性的纤维蛋白原在进入神经组织后转变为 Fibrinogen 沉积于神经组织内,最终导致轴突变性和脱髓鞘,加重 Wallerian 变性,不利于视神经再生^[13],IgG 表达量增多提示 BNB 缺损明显。Fibrinogen 正常生理情况下存在于血液中,视神经损伤后,血液中的纤维蛋白原透过 BNB 进入神经组织后,以 Fibrinogen 的形式沉积在神经组织,导致轴突变性和脱髓鞘,从而加重神经的 Wallerian 变性,阻碍神经的再生^[14]。笔者通过检测缺血损伤后 12 h 各组小鼠视神经组织 IgG 的表达水平发现,缺血损伤组视神经组织中 IgG 表达升高,HBZn 能有效降低 IgG 表达,作用明显优于单独作用的等摩尔浓度的黄芩苷组及等摩尔浓度锌的葡萄糖酸锌组;而通过检测缺血损伤后 28 h 各组 Fibrinogen,笔者发现缺血损伤组 Fibrinogen 的溢出明显,HBZn 组能

有效地降低 Fibrinogen 的溢出与沉积,减轻神经的 Wallerian 变性,使神经的再生作用明显。黄芩苷和葡萄糖酸锌组的作用不及 HBZn 组明显,由此看出 HBZn 可通过减少 IgG 和 Fibrinogen 的在 BNB 的沉积,减轻神经的 Wallerian 变性,促进神经的修复与再生。

线粒体对视神经缺血/再灌注损伤过程发挥着重要的调控作用^[15]。线粒体膜肿胀,细胞内结构破坏,外膜破裂,线粒体内蛋白溢出,均可引起细胞损伤。研究证实神经细胞缺血缺氧损伤过程会影起线粒体膜的脂质过氧化而造成神经功能缺损。MMPs 是一类依赖于细胞外锌离子的内肤酶家族,主要是降解细胞外基质蛋白,维持正常的 MMPs 是线粒体进行氧化磷酸化产生 ATP 的先决条件,是保证线粒体功能所必需,它在正常视神经组织中表达水平低下,损伤后上调,在轴突脱髓鞘和轴突延伸等诸多方面是重要的调节剂,在损伤后 28 h 达到高峰,随后又降低^[16]。MMP-9 是一类依赖锌和钙离子的蛋白酶家族,多以无活性的酶原形式分泌,可由血液中的单核细胞和巨噬细胞、滋养层细胞、血管内皮细胞等多种细胞产生,研究表明,MMPs 与 TIMP 在生理状态下,保持着一种动态平衡,协调降解与重建,维持组织结构的完整和内环境的稳定;MMPs 的过量发挥会加剧视神经组织的 Wallerian 变性,影响受损神经的修复与再生。MMPs 下降是线粒体功能紊乱的一个重要标志也是细胞凋亡早期的一个标志性事件^[17]。MMP-9, MMP-2 是 MMPs 家族成员中最具代表性的因子,本实验通过检测视神经缺血损伤 28h 后各组 MMP-9 的表达及 HBZn 对 MMPs/TIMPs 的调节作用发现 HBZn 对 MMPs 家族的抑制作用。

综上所述,新型络合物 HBZn 对实验性小鼠视神经损伤模型有很好的保护作用,作用优于单独的微量元素锌及黄芩苷单体的作用。同时该作用可能与抗氧化应激损伤,参与抑制血管源性因子 IgG, Fibrinogen, MMP-9 的表达,调节 MMPs/TIMPs 的平衡,修复 BNB 及恢复线粒体结构功能有关。

[参考文献]

[1] CHAN K C, ZHOU I Y, LIU S S, et al. Longitudinal assessments of normal and perilesional tissues in focal brain ischemia and partial optic nerve injury with manganese-enhanced MRI [J]. *Sci Rep*, 2017, 23 (7) : 43124-43136.

[2] Bebe F N, Panemangalore M. Biosafety of flavonoids in rats: effects on copper and zinc homeostasis and interaction with low level pesticide exposure [J]. *Biol*

Trace Elem Res, 2009, 129 (1/3) : 200-212.

[3] 曹志权. 微量元素与中医药 [M]. 北京: 北京中医药出版社, 1993: 79.

[4] 杨晖, 张荣平, 蔡传英, 等. 黄芩贰锌对冰醋酸致实验性大鼠胃溃疡的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 24 (1) : 321-323.

[5] 冯蕾, 刘旭, 杨晖. 黄芩苷锌稳定性影响因素实验研究 [J]. *昆明医科大学学报*, 2008, 29 (5) : 26-28.

[6] Bandyopadhyay B I, Bandyopadhyay S K. Protective effect of zinc gluconate on chemically induced gastric ulcer [J]. *Indian J Med Res*, 1997, 106 (1) : 27-32.

[7] Magarlit E, Satta S. Retina and optical nerve disease [J]. *Artif Organs*, 2003, 27 (11) : 963-974.

[8] CHEN Z, YU W, Strickland S. Peripheral regeneration [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2007, 30 (30) : 209-233.

[9] Busch S A, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, 17 (1) : 120-127.

[10] Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss [J]. *J Neurol Sci*, 2005, 233 (1/2) : 183-198.

[11] Vargas M, Barres B. Why is wallerian degeneration in the CNS so low [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2007, 30 (30) : 153-179.

[12] Liesz A, Roth S, Zom M, et al. Acquired immunoglobulin G deficiency in stroke patients and experimental brain ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2015, doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.021.

[13] Huebner E, Strittmatter S. Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2009, 48 (7) : 339-351.

[14] Sanderson T H, Raghunayakula S, Kumar R. Neuronal hypoxia disrupts mitochondrial fusion [J]. *Neuroscience*, 2015, 30 (20) : 71-78.

[15] Singh M H, Brooke S M, Zemlyak I, et al. Evidence for caspase effects on release of cytochrome c and AIF in a model of ischemia in cortical neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 469 (2) : 179-183.

[16] Dianat M, Sadeghi N, Badavi M, et al. Protective effects of co-administration of gallic acid and cyclosporine on rat myocardial morphology against ischemia/reperfusion [J]. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 2014, 9 (4) : e17186.

[17] Wongrakpanich A, Geary S M, Joiner M L. Mitochondria-targeting particles [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2014, 9 (16) : 2531-2543

[责任编辑 邹晓翠]