

## 加兰他敏介导 Nrf2/HO-1 信号通路对慢性高血压大鼠视网膜神经节细胞损伤的保护作用

米娜瓦尔·哈帕尔<sup>1</sup>, 地力努尔·吐尔逊江<sup>2</sup>, 满尔哈巴·海如拉<sup>2</sup>

1. 新疆医科大学第一附属医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐 830001

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830001

**摘要:** 目的 探讨加兰他敏介导核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/血红素氧合酶-1 (HO-1) 信号通路对慢性高血压大鼠视网膜神经节细胞 (RGCs) 损伤的影响及其机制。方法 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、加兰他敏组、加兰他敏+ML385 组, 每组 12 只。假手术组大鼠进行手术操作但不烙闭巩膜静脉, 其余各组大鼠采用巩膜上静脉烙闭法建立慢性高血压大鼠模型。加兰他敏组大鼠 ip 4 mg/kg 加兰他敏溶液; 加兰他敏+ML385 组大鼠 ip 4 mg/kg 加兰他敏溶液和 30 mg/kg ML385。采用便携式动物眼压计测定眼压; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察视网膜组织形态及 RGCs 数量; TUNEL 染色检测 RGCs 凋亡情况; 试剂盒法检测视网膜组织中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 水平; Western blotting 法检测视网膜组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达。结果 与模型组相比, 加兰他敏组大鼠眼压降低, 视网膜组织病理损伤得到改善, RGCs 数量增多, RGCs 凋亡率降低, 视网膜组织中 SOD、CAT 活性以及 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平平均升高, MDA 含量降低 ( $P < 0.05$ )。与加兰他敏组相比, 加兰他敏+ML385 组大鼠眼压升高, 视网膜组织病理损伤加重, RGCs 数量减少, RGCs 凋亡率升高, 视网膜组织中 SOD、CAT 活性以及 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平平均降低, MDA 含量显著升高 ( $P < 0.05$ )。结论 加兰他敏可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻慢性高血压大鼠 RGCs 损伤。

**关键词:** 青光眼; 慢性高血压; 加兰他敏; 视网膜神经节细胞; 核因子 E2 相关因子 2/血红素氧合酶-1 信号通路; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)08-1850-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.08.007

## Protective effect of galanthamine mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway on retinal ganglion cell injury in rats with chronic ocular hypertension

MINAWAER Hapaer<sup>1</sup>, DILINUER Tuersonjiang<sup>2</sup>, MANERHABA Hairula<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, China

2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Pharmacy, Urumqi 830001, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of galanthamine mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway on RGCs injury in rats with chronic ocular hypertension and its mechanism. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, galanthamine group, galanthamine + ML385 group, with 12 rats in each group. The rats in the sham operation underwent surgical procedures without cauterizing the scleral veins, while the rats in the other groups used cauterization of the superior scleral veins to establish the chronic ocular hypertension rat model. Galanthamine group rats ip 4 mg/kg galanthamine solution, galanthamine + ML385 group of rat ip 4 mg/kg galanthamine solution and 30 mg/kg ML385. The intraocular pressure was measured by portable animal tonometer, retinal tissue morphology and the number of RGCs were observed by HE staining. The apoptosis of RGCs was detected by TUNEL staining, the levels of MDA, SOD, and CAT in retinal tissue were measured by kit method. The expression of Nrf2 and HO-1 proteins in retinal tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the intraocular pressure was decreased of rats in galanthamine group, pathological damage of retinal tissue was improved, the number of RGCs were increased, the apoptosis rate of RGCs were decreased, the activities of SOD, CAT and the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in retinal tissue were increased, while the content of MDA in retinal tissue was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the galanthamine

收稿日期: 2023-05-23

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2022D01C312)

作者简介: 米娜瓦尔·哈帕尔, 女, 硕士, 研究方向为心血管药理学。E-mail: cent1229@163.com

group, the intraocular pressure was increased of rats in galanthamine + ML385 group, the pathological damage of retinal tissue was aggravated, the number of RGCs were decreased, the apoptosis rate of RGCs were increased, the activities of SOD, CAT and the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in retinal tissue were decreased, while the content of MDA in retinal tissue was increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Galanthamine may alleviate RGCs injury in chronic ocular hypertension rats by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway.

**Key words:** glaucoma; chronic ocular hypertension; galanthamine; retinal ganglion cells; Nrf2/HO-1 signaling pathway; MDA; SOD

青光眼是由多因素引起的一种进行性视神经病变,是仅次于白内障的第二大常见致盲疾病<sup>[1]</sup>。视神经萎缩、视野缺损、视网膜神经节细胞(RGCs)丢失是青光眼的主要病理特征,病理性眼压升高是青光眼发生、发展最重要的危险因素之一,病理性眼压升高引起的不可逆神经损伤也是青光眼致盲的主要原因<sup>[2-3]</sup>。因此,青光眼的临床治疗主要集中在药物或手术方法降低病理性眼压<sup>[4]</sup>,但由于慢性高眼压直接或间接诱导了RGCs损伤,使得降低病理性眼压治疗并不能完全阻止青光神经变性的不可逆病程<sup>[5]</sup>。当前,探索预防和缓解RGCs损伤的新靶点和新疗法,降低疾病进展已成为青光眼治疗研究的重要方向。加兰他敏是一种小分子乙酰胆碱酯酶抑制剂和烟碱受体激动剂,其与烟碱受体变构位点相结合,可提高乙酰胆碱内在作用,同时能够增强大脑胆碱能系统活性,因此,加兰他敏在临床上被用于改善阿尔茨海默病患者的认知缺陷<sup>[6]</sup>。研究表明,加兰他敏具有神经保护作用,可改善神经毒剂诱导的神经胶质和生化变化<sup>[7]</sup>。Naguib等<sup>[8]</sup>研究报道,加兰他敏在爆炸诱导的间接创伤性视神经病变小鼠模型中可减轻视神经轴突变性减少以及视觉功能缺陷。加兰他敏可能是视神经病变的潜在有效治疗药物。然而,加兰他敏是否在青光眼相关的慢性高眼压所致RGCs损伤中发挥保护作用尚不清楚。因此,本研究以慢性高眼压大鼠模型为研究对象,探讨加兰他敏对慢性高眼压大鼠RGCs损伤的影响作用及相关分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,雌雄各半,6~8周龄,体重(180±20)g,由新疆医科大学实验动物中心提供,动物许可证号SCXK(新)2018-0002。饲养条件为通风良好,室温20~25℃,相对湿度55%~75%,12h/12h光暗循环,自由进食饮水。本实验经新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会批准后实施(审批号K202209-04)。

### 1.2 试剂和仪器

加兰他敏(质量分数≥98%,批号G125955-100mg)购自上海阿拉丁生化科技公司;核因子E2相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路抑制剂ML385(质量分数>99%,批号SML1833-25MG)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、增强型化学发光(ECL)试剂(批号HZ2144、HZ0164)购自上海沪震实业有限公司;TUNEL染色试剂盒(批号CA1040)购自北京杰辉博高生物技术有限公司;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(批号BLL100304E、BLL100322E、BLLX8426J)购自上海佰利莱生物科技有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂盒(批号FT-P91144T)购自上海梵态生物科技有限公司;Nrf2、HO-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(批号ab62352、ab305290、ab8245)以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(批号ab150077)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

ICARETONOVET型便携式动物眼压计(上海弗安企业发展有限公司);WFL-200Z型光学显微镜(深圳微特视界科技有限公司);MF53-M型倒置荧光生物显微镜(山东千司科学仪器有限公司);YK-SY96A型多功能酶标仪(山东云科智能科技有限公司);WD-9413C型多功能凝胶成像系统(山东欧莱博医疗器械有限公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 慢性高眼压大鼠模型的建立** 大鼠饲养1周适应环境后,将右眼定为实验眼,参照文献报道,采用巩膜上静脉烙闭法造模<sup>[9]</sup>:ip 3%戊巴比妥钠对大鼠进行全身麻醉,并用0.5%盐酸丙美卡因滴眼液行右眼表面麻醉。撑开大鼠右眼上下眼睑及颞侧眼睑,在距角巩膜缘约1mm处,于11点方向剪开球结膜,钝性分离筋膜,将角巩膜缘后3~4mm处发现的3支丛状、色暗红、较粗的巩膜静脉用止血器依次进行烙闭。近角巩膜缘段血管充血怒张,远

角巩膜缘段血管血流消失,血管无连接点,且无新鲜出血,表明烙闭成功。术后检测大鼠的眼压超过 22 mm Hg (1 mm Hg=133 Pa) 即表示造模成功。术后用生理盐水冲洗术眼结膜囊,平复球结膜,用左氧氟沙星滴术眼,大鼠麻醉苏醒后入笼。术后 1 周以左氧氟沙星滴术眼,2 次/d。左眼不作处理。

**1.3.2 实验分组和给药干预** 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、加兰他敏组、加兰他敏+ML385 组,每组 12 只。假手术组大鼠进行与造模同样的操作但不烙闭巩膜静脉。模型组、加兰他敏组、加兰他敏+ML385 组大鼠均建立慢性高眼压模型。造模成功后,参照文献报道<sup>[10]</sup>并结合预试验结果进行给药干预,加兰他敏组大鼠 ip 4 mg/kg 加兰他敏溶液;加兰他敏+ML385 组大鼠 ip 4 mg/kg 加兰他敏溶液和 30 mg/kg ML385;假手术组和模型组大鼠均 ip 等体积的生理盐水,1 次/d,均连续给药 14 d。

**1.3.3 大鼠眼压测定** 大鼠清醒状态下采用便携式动物眼压计测定大鼠眼压,眼压为 3 次测试结果的平均值。分别测定造模前 3 d、造模后 30 min、造模后 1、7、14 d 大鼠眼压,测量时间为每天上午 10:00~11:00。

**1.3.4 样本采集** 给药结束后,对大鼠实施安乐死,完整取出眼球,每组分别取 6 只大鼠眼球置于 4% 多聚甲醛溶液固定,6 只大鼠眼球在显微镜下剥离视网膜组织,保存于-80 °C 冰箱备用。

**1.3.5 HE 染色** HE 染色观察视网膜组织形态及 RGCs 数量。取固定后的大鼠眼球进行石蜡包埋,沿大鼠眼球视神经长轴方向行连续切片,切片厚度为 5 μm。切片在 60 °C 烘烤 2 h 后,脱蜡至水,用苏木精染色 10 min,自来水洗涤 1 min,1% 盐酸乙醇分化 30 s,自来水洗涤后,1% 伊红染液染色 5 min,常规透明、封片,显微镜下观察视网膜组织形态以及大鼠 RGCs 数量。

**1.3.6 TUNEL 染色检测 RGCs 凋亡** 切片脱蜡、水化后,用蛋白酶 K 溶液于 37 °C 处理 15 min,清洗,置于 0.3% 过氧化氢溶液中室温孵育 30 min,清洗切片,滴加 50 μL TUNEL 混合液,37 °C 避光孵育 60 min,清洗后,加入 50 μL 链转化 POD 于 37 °C 孵育 30 min,滴加 DAB 显色液孵育 10 min,自来水冲洗,苏木素复染,脱水、透明、封片,在荧光显微镜下拍照。计算 RGCs 凋亡率。

$$\text{RGCs 凋亡率} = \text{RGCs 凋亡细胞数} / \text{RGCs 总细胞数}$$

**1.3.7 大鼠视网膜氧化应激水平检测** 取大鼠视网膜组织制成组织匀浆液,离心收集上清液,按照试剂盒说明书检测视网膜组织中 SOD、CAT、MDA 水平。

**1.3.8 Western blotting 法检测大鼠视网膜组织中 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达** 从大鼠视网膜中提取总蛋白,用 BCA 蛋白测定试剂盒定量蛋白质浓度。取定量蛋白质由 SDS-PAGE 分离,并转移到 PVDF 膜上。将膜在含 5% 脱脂干奶的阻断缓冲液中阻断 1 h,用 PBST 缓冲液清洗,并与 Nrf2 (1:500)、HO-1 (1:500)、GAPDH (1:1 000) 一抗在 4 °C 下孵育 1 h,用 PBST 清洗膜,与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h,用 PBST 清洗膜,以 ECL 试剂显影,凝胶成像系统采集图像。以 GAPDH 为内参对照,目的蛋白相对表达量以目的蛋白与 GAPDH 的灰度值之比表示。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,结果表示为  $\bar{x} \pm s$ ,若符合正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验;若不符合正态分布,采用非参数检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 加兰他敏对大鼠眼压的影响

造模后 30 min 和造模后 1 d,模型组、加兰他敏组、加兰他敏+ML385 组大鼠眼压较假手术组均显著升高 ( $P < 0.05$ ),造模后 7、14 d,与假手术组相比,模型组大鼠眼压显著升高 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,加兰他敏组大鼠眼压显著降低 ( $P < 0.05$ );与加兰他敏组相比,加兰他敏+ML385 组大鼠眼压显著升高 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 加兰他敏对大鼠视网膜病理形态的影响

假手术组大鼠视网膜结构完整,层次清晰,细胞排列整齐,RGCs 呈规则的圆形或椭圆形;模型组大鼠视网膜明显变薄,结构紊乱,RGCs 数目减少,形态不规则、且排列错乱,可见部分细胞核裂解、变性,内外核层排列疏松。加兰他敏组大鼠视网膜各层次结构较为规整,层次清晰,RGCs 形态大致正常,排列规则,内外核层排列稍紊乱,视网膜病理损伤较模型组明显减轻;加兰他敏+ML385 组视网膜结构较紊乱,RGCs 形态不规则,排列较错乱,内外核层排列疏松,视网膜病理损伤较加兰他敏组明显加重,见图 1。

表 1 加兰他敏对大鼠眼压的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )Table 1 Effect of galanthamine on Intraocular pressure in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	眼压/mm Hg				
		造模前 3 d	造模后 30 min	造模后 1 d	造模后 7 d	造模后 14 d
假手术	—	11.54±0.92	12.46±1.09	11.88±1.05	11.83±0.98	11.79±0.95
模型	—	11.48±0.95	30.57±3.46*	26.48±1.85*	26.10±1.54*	25.86±1.60*
加兰他敏	4	11.60±0.91	30.35±3.52*	25.73±1.69*	19.42±1.49#	16.89±1.31#
加兰他敏+ML385	4+30	11.57±0.89	30.49±3.63*	26.08±1.73*	23.50±1.54&	19.33±1.45&

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与加兰他敏组比较: & $P < 0.05$  (1 mm Hg=133 Pa)

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group; & $P < 0.05$  vs galanthamine group (1 mm Hg=133 Pa)

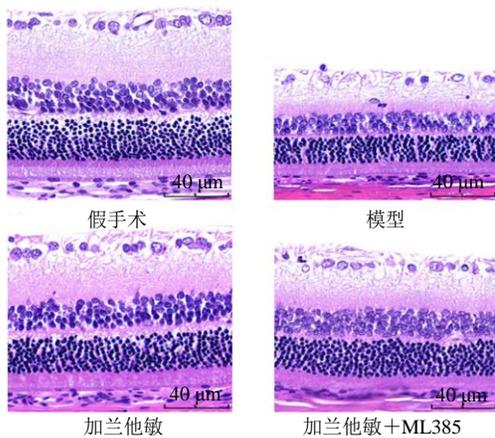
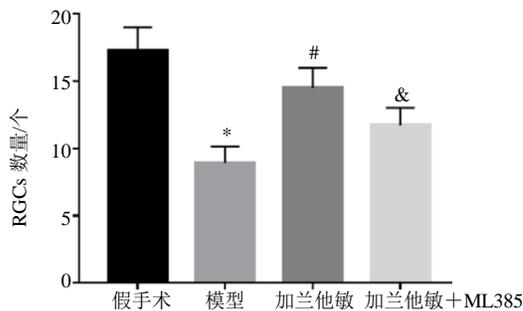


图 1 加兰他敏对大鼠视网膜病理形态的影响 (HE, ×200)  
Fig. 1 Effect of galanthamine on pathological morphology of retina in rats (HE staining, ×200)

### 2.3 加兰他敏对大鼠 RGCs 数量的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠 RGCs 数量显著减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 加兰他敏组大鼠 RGCs 数量显著增多 ( $P < 0.05$ ); 与加兰他敏组相比, 加兰他敏+ML385 组大鼠 RGCs 数量显著减少 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。



与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与加兰他敏组比较: & $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group; & $P < 0.05$  vs galanthamine group

图 2 加兰他敏对大鼠 RGCs 数量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )  
Fig. 2 Effect of galanthamine on the number of RGCs in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

### 2.4 加兰他敏对大鼠 RGCs 凋亡的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠 RGCs 凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 加兰他敏组大鼠 RGCs 凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与加兰他敏组相比, 加兰他敏+ML385 组大鼠 RGCs 凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 3、4。

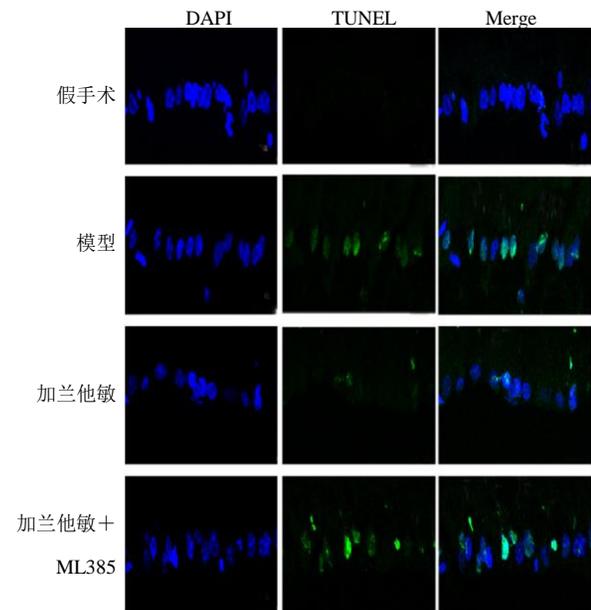
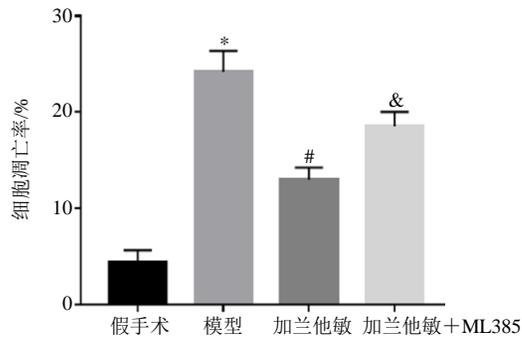


图 3 加兰他敏对大鼠 RGCs 凋亡的影响 (TUNEL 染色, ×400)

Fig. 3 Effect of galanthamine on apoptosis of RGCs in rats (TUNEL staining, ×400)

### 2.5 加兰他敏对大鼠视网膜组织氧化应激水平的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠视网膜组织中 SOD、CAT 活性均显著降低, MDA 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 加兰他敏组大鼠视网膜组织中 SOD、CAT 活性显著升高, MDA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与加兰他敏组相比, 加兰他敏+ML385 组大鼠视网膜组织中 SOD、CAT 活性均显著降低, MDA 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。



与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与加兰他敏组比较: & $P < 0.05$   
 \* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group; & $P < 0.05$  vs galanthamine group

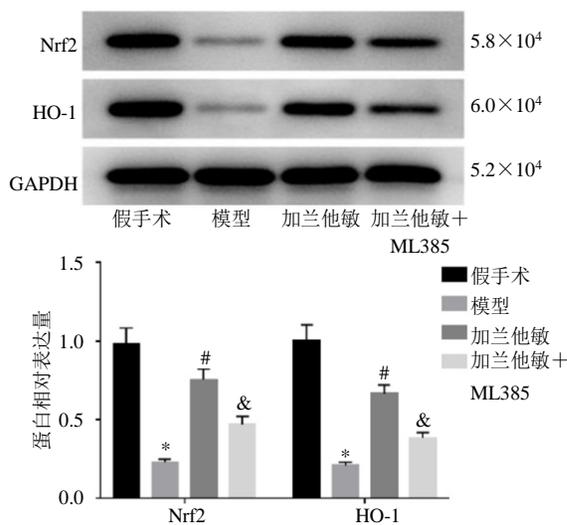
图 4 加兰他敏对大鼠 RGCs 凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )  
 Fig. 4 Effect of galanthamine on apoptosis rate of RGCs in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

表 2 加兰他敏对大鼠视网膜组织氧化应激水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effects of galanthamine on oxidative stress in retinal tissue of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mg <sup>-1</sup> )	CAT/(U·mg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> )
假手术	—	8.17 ± 1.62	11.53 ± 1.82	6.92 ± 0.75
模型	—	2.31 ± 0.86*	3.61 ± 1.06*	20.58 ± 0.95*
加兰他敏	4	6.54 ± 1.25#	9.87 ± 1.35#	12.43 ± 1.64#
加兰他敏+ML385	4+30	4.72 ± 1.08&	6.55 ± 1.17&	16.71 ± 0.83&

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与加兰他敏组比较: & $P < 0.05$   
 \* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group; & $P < 0.05$  vs galanthamine group



与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与加兰他敏组比较: & $P < 0.05$   
 \* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group; & $P < 0.05$  vs galanthamine group

图 5 加兰他敏对大鼠视网膜组织中 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )  
 Fig. 5 Effect of galanthamine on expression of Nrf2/HO-1 signaling pathway related proteins in rat retina ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

## 2.6 加兰他敏对大鼠视网膜组织中 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠视网膜组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 加兰他敏组大鼠视网膜组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与加兰他敏组相比, 加兰他敏+ML385 组大鼠视网膜组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

## 3 讨论

青光眼是全球不可逆失明的主要原因, 其特征是 RGCs 的逐渐丧失。有研究估计, 目前全球约有 60 万人患有青光眼, 随着人口老龄化的快速增长, 青光眼发病率呈持续升高趋势<sup>[11]</sup>。病理性眼压升高被认为是青光眼的关键危险因素, 因此许多学者通

常选择诱导病理性眼压升高来构建青光眼动物模型, 以了解其潜在病理<sup>[12-13]</sup>。本研究参照文献方法建立了慢性高眼压大鼠模型, 检测发现大鼠眼压升高、RGCs 丢失、视网膜组织可见明显病理损伤, 说明慢性高眼压模型建立成功, 可以模拟青光眼 RGCs 病理性损伤的过程。研究表明, 加兰他敏在血管认知障碍<sup>[14]</sup>、脊髓损伤<sup>[15]</sup>、创伤性脑损伤<sup>[16]</sup>等神经疾病的动物模型中可能具有神经元或神经保护作用。RGCs 是存在于视网膜内的主要细胞, 有助于视觉的产生和传输。由于 RGCs 不能再生, RGCs 的丢失会产生视觉缺陷, 包括不可逆的失明。RGCs 进行性变性是包括青光眼在内的视网膜退行性疾病的一个标志<sup>[17]</sup>。本研究探索加兰他敏在青光眼进展过程中对 RGCs 的影响作用, 结果显示, 加兰他敏干预模型大鼠后, 大鼠眼压明显降低, 视网膜组织病理损伤显著减轻, RGCs 数量明显增多。此外, 本研究检测 RGCs 的凋亡情况, 发现加兰他敏明显减少 RGCs 凋亡。表明加兰他敏在慢性高眼压诱导的 RGCs 损伤中提供保护作用。

视网膜中的氧化应激, 由衰老、谷氨酸兴奋性

毒性、高血糖和缺血引起,是青光眼、糖尿病视网膜病变等疾病的触发因素,视觉系统中光感受器、视网膜神经节神经元等对氧化损伤特别敏感<sup>[18]</sup>。研究发现<sup>[19]</sup>,病理性眼压升高诱导的氧化应激是 RGCs 凋亡、死亡或轴突再生过程中的关键组成部分。因此,调控视网膜氧化应激可能是保护 RGCs 免受病理性眼压升高所致损伤的有效途径。Sangaleti 等<sup>[20]</sup>研究发现,加兰他敏能够通过提高抗氧化酶 SOD、CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶活性减轻代谢综合征受试者的氧化应激。此外,Kandil 等<sup>[21]</sup>报道,鼻内加兰他敏/壳聚糖复合物纳米颗粒通过降低 MDA 含量、增强谷胱甘肽和 SOD 活性的抗氧化作用在大鼠大脑中发挥神经保护潜力。本研究中,慢性高眼压大鼠视网膜组织中 SOD、CAT 活性均降低,MDA 含量升高,存在显著的氧化应激反应,加兰他敏干预明显升高了 SOD、CAT 活性,降低了 MDA 含量。提示加兰他敏可能通过抗氧化作用减轻慢性高眼压大鼠视网膜组织损伤和 RGCs 损伤。

转录因子 Nrf2 是细胞响应氧化应激的中枢调节因子,正常情况下,Nrf2 与 kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 结合,在细胞质中以无活性的异源二聚体存在。当细胞受到氧化应激刺激时,异源二聚体复合物被破坏,Nrf2 被释放并转运到细胞核中,激活 HO-1 蛋白等一系列下游基因,在氧化应激下调节细胞防御<sup>[22-23]</sup>。大量证据表明,Nrf2 信号通路在青光眼进展中起着关键作用。有报道称,抗氧化剂曲美他嗪通过 Nrf2/HO-1 途径抑制急性青光眼小鼠 RGCs 的凋亡<sup>[24]</sup>。Wang 等<sup>[25]</sup>研究揭示,Nrf2/HO-1 信号通路的激活显著降低了青光眼慢性高眼压大鼠 RGCs 的凋亡和损伤,是预防青光眼 RGCs 变性的潜在靶点。本研究检测结果显示,慢性高眼压大鼠视网膜组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平较正常大鼠明显降低,提示慢性高眼压大鼠视网膜组织中 Nrf2/HO-1 信号通路处于抑制状态,在加兰他敏干预后大鼠视网膜组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平显著升高。该结果表明加兰他敏激活了慢性高眼压大鼠视网膜组织中 Nrf2/HO-1 信号通路。ML385 是一种新型特异性 Nrf2 抑制剂,本研究使用 ML385 作为 Nrf2/HO-1 通路的抑制剂来验证加兰他敏对慢性高眼压大鼠 RGCs 损伤的保护作用,结果显示,ML385 的干预明显减弱了加兰他敏对慢性高眼压大鼠 RGCs 损伤的改善作用。这表明加兰他敏可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路来减轻慢性高眼压大

鼠 RGCs 损伤。

综上所述,加兰他敏能够减轻慢性高眼压所致 RGCs 损伤,对实验性青光眼具有神经保护作用。加兰他敏的 RGCs 保护作用可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Kang J M, Tanna A P. Glaucoma [J]. *Med Clin North Am*, 2021, 105(3): 493-510.
- [2] Roberti G, Oddone F, Agnifili L, et al. Steroid-induced glaucoma: Epidemiology, pathophysiology, and clinical management [J]. *Surv Ophthalmol*, 2020, 65(4): 458-472.
- [3] Razeghinejad R, Lin M M, Lee D, et al. Pathophysiology and management of glaucoma and ocular hypertension related to trauma [J]. *Surv Ophthalmol*, 2020, 65(5): 530-547.
- [4] Schuster A K, Erb C, Hoffmann E M, et al. The diagnosis and treatment of glaucoma [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(13): 225-234.
- [5] Gao J, Provencio I, Liu X. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in glaucoma [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 992747.
- [6] Liu Y, Zhang Y, Zheng X, et al. Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 112.
- [7] Golime R, Palit M, Acharya J, et al. Neuroprotective effects of galantamine on nerve agent-induced neuroglial and biochemical changes [J]. *Neurotox Res*, 2018, 33(4): 738-748.
- [8] Naguib S, Bernardo-Colón A, Cencer C, et al. Galantamine protects against synaptic, axonal, and vision deficits in experimental neurotrauma [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 134: 104695.
- [9] 韩双羽. 巩膜上静脉烙闭法建立大鼠慢性高眼压青光眼模型 [D]. 西安: 西安医学院, 2019.
- [10] 曾菲, 李强, 曾昇, 等. 氢溴酸加兰他敏介导 AMPK  $\alpha$ 1/Nrf2/HO-1 通路对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2020, 51(3): 337-343.
- [11] Artero-Castro A, Rodriguez-Jimenez F J, Jendelova P, et al. Glaucoma as a neurodegenerative disease caused by intrinsic vulnerability factors [J]. *Prog Neurobiol*, 2020, 193: 101817.
- [12] Gao J, Griner E M, Liu M, et al. Differential effects of experimental glaucoma on intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mice [J]. *J Comp Neurol*, 2022,

- 530(9): 1494-1506.
- [13] Nakagawa A, Sakai O, Tokushige H, *et al.* Development and characterization of a new rat ocular hypertension model induced by intracameral injection of conjunctival fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6593.
- [14] Battle C E, Abdul-Rahim A H, Shenkin S D, *et al.* Cholinesterase inhibitors for vascular dementia and other vascular cognitive impairments: A network meta-analysis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 2(2): CD013306.
- [15] Sperling L E, Pires Reis K, Nicola F, *et al.* Galantamine improves functional recovery and reduces lesion size in a rat model of spinal cord injury [J]. *Brain Res*, 2019, 1724: 146424.
- [16] Zhao J, Hylin M J, Kobori N, *et al.* Post-injury administration of galantamine reduces traumatic brain injury pathology and improves outcome [J]. *J Neurotrauma*, 2018, 35(2): 362-374.
- [17] Yuan F, Wang M, Jin K, *et al.* Advances in regeneration of retinal ganglion cells and optic nerves [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4616.
- [18] McMonnies C. Reactive oxygen species, oxidative stress, glaucoma and hyperbaric oxygen therapy [J]. *J Optom*, 2018, 11(1): 3-9.
- [19] Jassim A H, Fan Y, Pappenhagen N, *et al.* Oxidative stress and hypoxia modify mitochondrial homeostasis during glaucoma [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(16): 1341-1357.
- [20] Sangaletti C T, Katayama K Y, De Angelis K, *et al.* The cholinergic drug galantamine alleviates oxidative stress alongside anti-inflammatory and cardio-metabolic effects in subjects with the metabolic syndrome in a randomized trial [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 613979.
- [21] Kandil L S, Farid R M, ElGamal S S, *et al.* Intranasal galantamine/chitosan complex nanoparticles elicit neuroprotection potentials in rat brains via antioxidant effect [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2021, 47(5): 735-740.
- [22] Li B, Nasser M I, Masood M, *et al.* Efficiency of traditional Chinese medicine targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110074.
- [23] Liu X F, Zhou D D, Xie T, *et al.* The Nrf2 signaling in retinal ganglion cells under oxidative stress in ocular neurodegenerative diseases [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(9): 1090-1098.
- [24] Wan P, Su W, Zhang Y, *et al.* Trimetazidine protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(18): 2363-2375.
- [25] Wang X, Yuan Z L. Activation of Nrf2/HO-1 pathway protects retinal ganglion cells from a rat chronic ocular hypertension model of glaucoma [J]. *Int Ophthalmol*, 2019, 39(10): 2303-2312.

[责任编辑 高源]