

引文格式:杨丹,余德立,孙宝飞,康朝胜,孙江龄,余资江. 五花血藤提取物对大鼠视网膜缺血再灌注损伤中凋亡相关因子表达的影响[J]. 眼科新进展,2020,40(9):806-810. doi:10.13389/j.cnki.rao.2020.0184

【实验研究】

# 五花血藤提取物对大鼠视网膜缺血再灌注损伤中凋亡相关因子表达的影响<sup>△</sup>

杨丹 余德立 孙宝飞 康朝胜 孙江龄 余资江

**作者简介:**杨丹 (ORCID: 0000-0003-2109-0693),女,1985年11月出生,辽宁台安人,博士,讲师。研究方向:神经损伤与修复。E-mail:stefanie111@126.com  
**通信作者:**余资江 (ORCID: 0000-0001-6482-7777),男,1968年11月出生,湖南双峰人,博士,教授。研究方向:神经损伤修复。E-mail:yzj0112@126.com

**收稿日期:**2020-04-30  
**修回日期:**2020-07-17  
**本文编辑:**臧赫

**△基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号:81760573);贵州省科学技术厅资助项目(编号:黔科合 LH[2015]7345)  
**作者单位:**550025 贵州省贵阳市,贵州医科大学基础医学院人体解剖学教研室(杨丹,孙宝飞,康朝胜,余资江);550001 贵州省贵阳市,贵州中医药大学临床二系眼科(余德立);550001 贵州省贵阳市,贵阳市口腔医院(孙江龄)

**【摘要】 目的** 探讨五花血藤提取物(sargentodoxa cuneata extracts,SCE)对大鼠视网膜缺血-再灌注损伤(RIRI)中凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响。**方法** 选取健康清洁级成年 SD 大鼠 90 只,随机分成对照组、RIRI 组与 SCE 组,每组 30 只。于 RIRI 后 6 h、12 h、24 h、48 h 与 72 h 时,每组分别随机处死 6 只大鼠进行相关实验。通过 Nissl 染色观察各组大鼠视网膜神经细胞形态学的变化,免疫组织化学法检测各组大鼠视网膜内各细胞层凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达。**结果** 对照组视网膜神经节细胞内 Nissl 小体丰富,染色较深,呈块状分布;RIRI 组 Nissl 小体较对照组少,染色浅且分布不均;SCE 组染色情况均较 RIRI 组有所改善。Bcl-2 蛋白在对照组中几乎不表达,在 24 h RIRI 组中其阳性表达开始增强,48 h 时达到高峰,在 SCE 组各个时间点上 Bcl-2 蛋白阳性表达均多于 RIRI 组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。Bax 蛋白在对照组中略有表达,在 12 h RIRI 组中其阳性表达持续增多,24 h 时达到高峰,在 SCE 组各个时间点上 Bax 蛋白阳性表达均低于 RIRI 组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。Caspase-3 蛋白在对照组中几乎不表达,在 6 h RIRI 组中表达开始升高,12 h 时达到高峰,在 SCE 组各个时间点上 Caspase-3 蛋白阳性表达均低于 RIRI 组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。**结论** SCE 可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达的同时下调 Bax、Caspase-3 蛋白的表达来发挥抗凋亡作用,从而对大鼠 RIRI 起到保护作用。**【关键词】** 视网膜缺血-再灌注损伤;五花血藤提取物;Bcl-2;Bax;Caspase-3  
**【中图分类号】** R774.1

视网膜缺血-再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury,RIRI)是视网膜在缺血损伤的基础上,恢复血流灌注后并不缓解视网膜细胞的损伤,反而加剧了细胞的死亡使损伤更严重的现象。近年来,RIRI 已成为临床上广泛关注的问题<sup>[1]</sup>。RIRI 的机制十分复杂,包括氧自由基学说、一氧化氮学说、钙通道学说、炎症反应学说、兴奋性氨基酸学说、基因调控学说和细胞凋亡学说等<sup>[2-3]</sup>,而细胞凋亡学说近几年成为研究的重点<sup>[4-7]</sup>。目前研究发现,RIRI 中存在着神经细胞凋亡现象,且凋亡是视网膜神经细胞丢失的重要因素之一<sup>[8-9]</sup>。细胞凋亡过程受到多种基因调控,主要有 Bcl-2 家族、Fas 家族、Caspase 家族和 p53 基因等<sup>[10]</sup>。五花血藤又名大血藤、红藤等,系木通科植物五花血藤的茎。研究表明,五花血藤提取物没食子酸(epigallocatechin-3-gallate,EGCG)可以通过阻断一氧化氮合酶的产生对视网膜神经节细胞起到保护作用,进而对 RIRI 起到治疗作用<sup>[11]</sup>。而我们前期的研究结果也表明,五花血藤提取物(sargentodoxa cuneata extracts,SCE)可促进 RIRI 后神经节细胞中超微结构的恢复,并能激活抗细胞凋亡因子 survivin 从而起到一定的抑制凋亡的作用<sup>[12]</sup>,但是其具体的抗凋亡机制还不是十分明确。因此,本

研究通过采用 SCE 实验性防治大鼠 RIRI,观察其对 RIRI 后凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白的表达影响,进一步阐明 SCE 对 RIRI 的保护作用及其可能的抗凋亡机制,以期为临床应用该药治疗视网膜缺血性疾病提供药理学实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 选取健康清洁级成年 SD 大鼠 90 只,体质量 180 ~ 250 g,雌雄不限,由贵州医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(黔)(2002-0001)]。随机分为对照组、RIRI 组与 SCE 组。其中 SCE 组于造模前 3 d 给予 SCE 灌胃,每天 2 次(剂量为  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),灌胃持续到取材当日。对照组与 RIRI 组灌服相同剂量的生理盐水。

**1.2 五花血藤提取物的制备** 采取乙醇搅拌回流提取方法<sup>[13]</sup>,过滤之后旋转蒸发浓缩,浓缩液预冻后冻干。每次取提取物适量,用蒸馏水制备成含生药  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液,无菌密封后置入  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

**1.3 主要仪器与试剂** LEICA RM2016 转轮切片机(上海莱卡仪器有限公司),OLYMPUS BH-2 显微镜(日本 OLYMPUS 公司),精密电子天平(德国 Sartori-

us 公司)。五花血藤(贵州中医药大学第二附属医院中药房),妥布霉素滴眼液(美国爱尔康公司),盐酸丙美卡因滴眼液(比利时 s. a. Alcon-Couvreur n. v. 公司),兔 SP 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中山金桥生物技术有限公司),兔抗 Bcl-2 (c21)、兔抗 Bax (p-19)、兔抗 Caspase-3 (p11) 抗体及多聚赖氨酸(武汉博士德生物工程有限公司)。

**1.4 大鼠 RIRI 模型的建立** 利用升高眼压法来制造大鼠 RIRI 模型<sup>[14]</sup>。大鼠称体质量后给予 10 g · L<sup>-1</sup>戊巴比妥钠(40 mg · kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉。将大鼠侧卧位固定于实验台上,选取右侧眼球,滴加盐酸丙美卡因滴眼液表面麻醉后,将一端连有生理盐水注射液的 5 号头皮针从大鼠颞侧角膜缘斜刺入眼前房,固定针头并打开注射器。使输液瓶与眼球垂直距离为 150 cm,眼压升高至 110 mmHg(1 kPa = 7.5 mmHg),这时可见大鼠瞳孔散大,巩膜变白。持续 60 min 后,拔出针头,可见大鼠球结膜及巩膜颜色迅速恢复正常,检眼镜下视网膜血供恢复,瞳孔回缩。术中及术后间断滴加妥布霉素滴眼液防止角膜干燥及预防感染。

**1.5 大鼠标本的制作** RIRI 组和 SCE 组分别于 RIRI 后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h,对照组于相应时间点过量麻醉大鼠后给予心脏灌注 40 g · L<sup>-1</sup>多聚甲醛溶液处死大鼠各 6 只,立即取出眼球,经 Bouin 液于 4 ℃ 冰箱中固定 24 h。从冰箱中取出标本后用流水冲洗 24 h,之后再由蒸馏水浸泡三次,每次 10 min。取出后放于干净滤纸上用眼科剪去掉角膜(保留晶状体以保持其形态),修剪平整后放入体积分数 75% 酒精中过夜,随后梯度脱水、石蜡包埋,连续切片,切片厚度为 5 μm。

**1.6 大鼠视网膜 Nissl 染色** 从恒温箱中取出处理好的切片立即放入二甲苯中透明两次,每次 5 min。梯度酒精脱水(体积分数 100% 酒精 5 min、体积分数 95% 酒精 5 min),然后立即用蒸馏水清洗。待切片晾干后进行焦油紫染色 3 min,蒸馏水清洗 2 次,体积分数 70% 酒精(即刻),经观察后放入二甲苯中 3 min,中性树脂封片,显微镜观察其形态结构。

**1.7 大鼠视网膜免疫组织化学染色** 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)免疫组织化学法检测大鼠视网膜中 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白的表达。具体方法如下:将切片常规脱蜡至水,甲酸抗原修复 5 min,体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 10 min 灭活内源性酶,滴加山羊血清封闭液,室温 15 min,加入一抗(1 : 100)4 ℃ 冰箱中过夜。取出室温静置 30 min 复温,滴加生物素化二抗,37 ℃ 恒温箱中放置 40 min。DAB 显色,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,显微镜观察。其中对照组一抗采用 0.01 mmol · L<sup>-1</sup> PBS 代替。

**1.8 统计学方法** 各组实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 19.0 统计学软件处理,对所得数据进行单因

素方差分析,两组间比较采用  $q$  检验。检验水准:  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

**2.1 大鼠视网膜 Nissl 染色结果** 对照组中视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)内 Nissl 小体丰富,染色较深,呈块状分布;RIRI 组中 RGC 内 Nissl 小体减少,染色浅且分布不均;SCE 组染色情况较 RIRI 组有所改善(见图 1)。

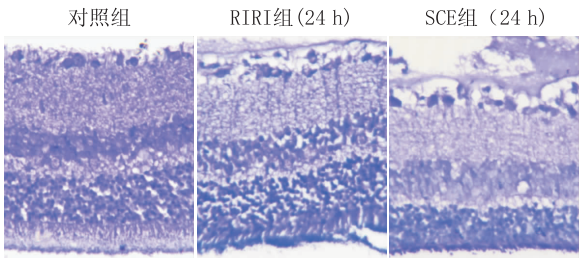


图 1 各组大鼠视网膜 Nissl 染色结果(×200)

**2.2 大鼠视网膜免疫组织化学染色结果** Bcl-2 蛋白的阳性表达为黄色或棕黄色颗粒,主要在细胞浆中表达。Bcl-2 蛋白在对照组视网膜中几乎不表达,在 6 h、12 h 的 RIRI 组中阳性表达持续升高,24 h 时表达开始增强,48 h 时达到高峰。SCE 组 Bcl-2 蛋白表达随时间延续而增多,阳性细胞染色较深,但在各个时间点上阳性表达均多于 RIRI 组。两组各时间点比较差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )(见表 1、图 2A 和图 3)。

Bax 蛋白的阳性表达为黄色或棕黄色颗粒,主要在细胞浆中表达。Bax 蛋白在对照组略有表达,但不明显,在 6 h 时的 RIRI 组中视网膜组织可见阳性表达,主要表现在神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)和神经纤维层(nerve fiber layer, NFL),12 h 时阳性表达持续增多,24 h 时表达达到高峰,主要表达于 GCL、NFL、内核层及内丛状层,48 h 时表达减少,72 h 时仍有表达延续。SCE 组 Bax 蛋白在各个时间点上阳性表达均低于 RIRI 组,细胞浆染色较浅,每高倍视野阳性细胞表达均较 RIRI 组有所下降,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )(见表 2、图 2B 和图 4)。

表 1 各组大鼠视网膜 Bcl-2 蛋白表达结果

| $(\bar{x} \pm s, n = 6)$ |           |              |               |
|--------------------------|-----------|--------------|---------------|
| RIRI 后时间                 | 对照组       | RIRI 组       | SCE 组         |
| 6 h                      | 0.2 ± 0.2 | 23.2 ± 1.2 * | 28.0 ± 1.4 ** |
| 12 h                     | 0.3 ± 0.2 | 31.7 ± 1.6 * | 36.0 ± 0.9 ** |
| 24 h                     | 0.3 ± 0.2 | 39.3 ± 1.4 * | 41.5 ± 1.9 ** |
| 48 h                     | 0.2 ± 0.2 | 43.2 ± 1.2 * | 46.2 ± 1.5 ** |
| 72 h                     | 0.5 ± 0.2 | 28.0 ± 1.4 * | 30.0 ± 1.4 ** |

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与 RIRI 组相比,\*\* $P < 0.05$



Caspase-3 蛋白的阳性表达为黄色或棕黄色颗粒,主要在细胞核中表达。对照组几乎不表达,在6 h 时的 RIRI 组中表达有所上升,12 h 时表达达到高峰,48 h 时阳性表达下降,72 h 时仍可见少量表

表 2 各组大鼠视网膜 Bax 蛋白表达结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| RIRI 后时间 | 对照组       | RIRI 组       | SCE 组         |
|----------|-----------|--------------|---------------|
| 6 h      | 2.5 ± 0.4 | 19.5 ± 0.6 * | 17.3 ± 1.0 ** |
| 12 h     | 2.3 ± 0.4 | 23.5 ± 1.0 * | 21.2 ± 1.2 ** |
| 24 h     | 2.0 ± 0.4 | 39.5 ± 1.0 * | 31.7 ± 1.0 ** |
| 48 h     | 2.3 ± 0.4 | 34.5 ± 1.0 * | 30.2 ± 1.5 ** |
| 72 h     | 2.2 ± 0.3 | 23.0 ± 1.5 * | 20.8 ± 1.5 ** |

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与 RIRI 组相比, #  $P < 0.05$

达。SCE 组 Caspase-3 蛋白的阳性表达在各个时间点上均低于 RIRI 组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )(见表 3、图 2C 和图 5)。

表 3 各组大鼠视网膜 Caspase-3 蛋白表达结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| RIRI 后时间 | 对照组        | RIRI 组       | SCE 组         |
|----------|------------|--------------|---------------|
| 6 h      | 0.17 ± 0.2 | 8.0 ± 1.4 *  | 5.5 ± 1.0 **  |
| 12 h     | 0.33 ± 0.2 | 33.3 ± 1.2 * | 25.0 ± 1.4 ** |
| 24 h     | 0.50 ± 0.2 | 17.3 ± 2.1 * | 11.5 ± 1.0 ** |
| 48 h     | 0.33 ± 0.2 | 14.5 ± 1.0 * | 11.8 ± 1.2 ** |
| 72 h     | 0.17 ± 0.2 | 9.5 ± 1.0 *  | 6.7 ± 1.6 **  |

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与 RIRI 组相比, #  $P < 0.05$

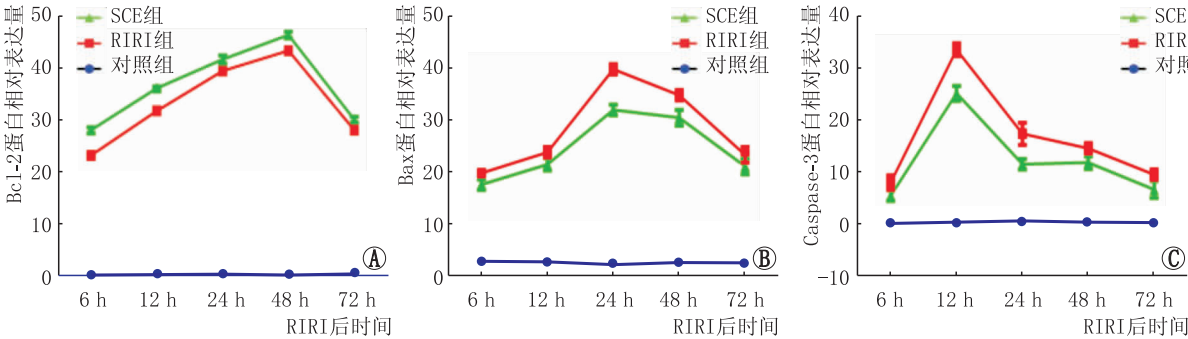


图 2 各组大鼠视网膜凋亡相关因子 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达趋势图

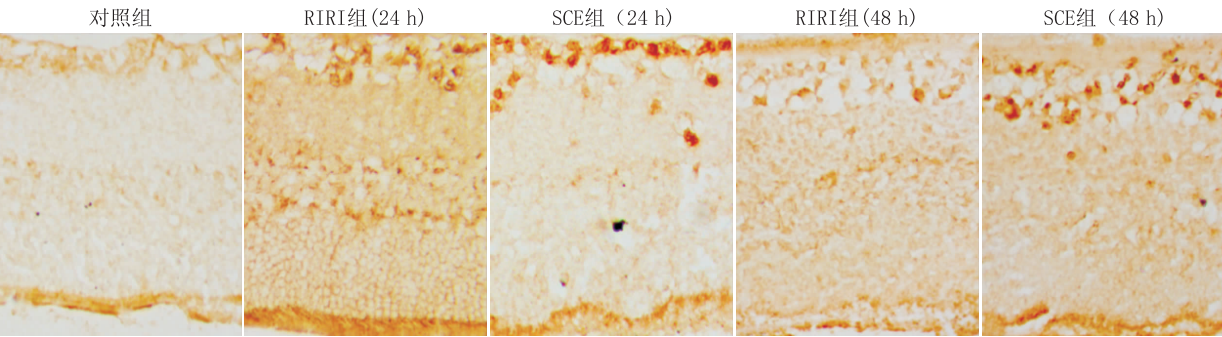


图 3 各组大鼠视网膜中 Bcl-2 蛋白免疫组织化学染色结果 (×200)

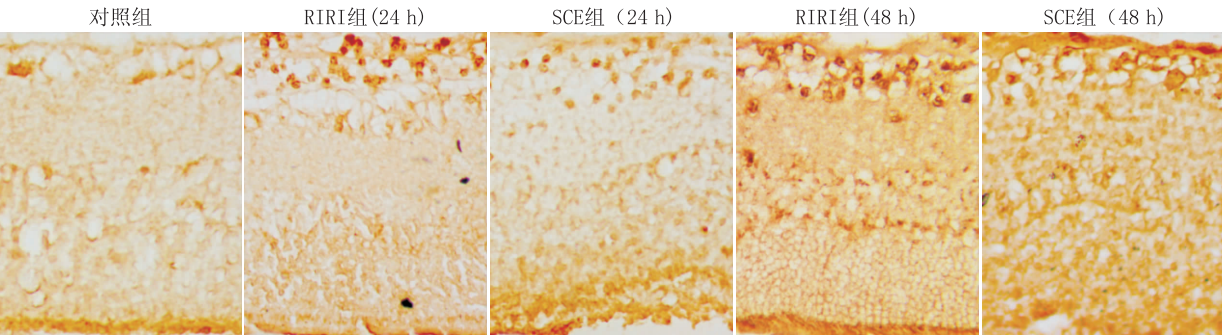


图 4 各组大鼠视网膜中 Bax 蛋白免疫组织化学染色结果 (×200)

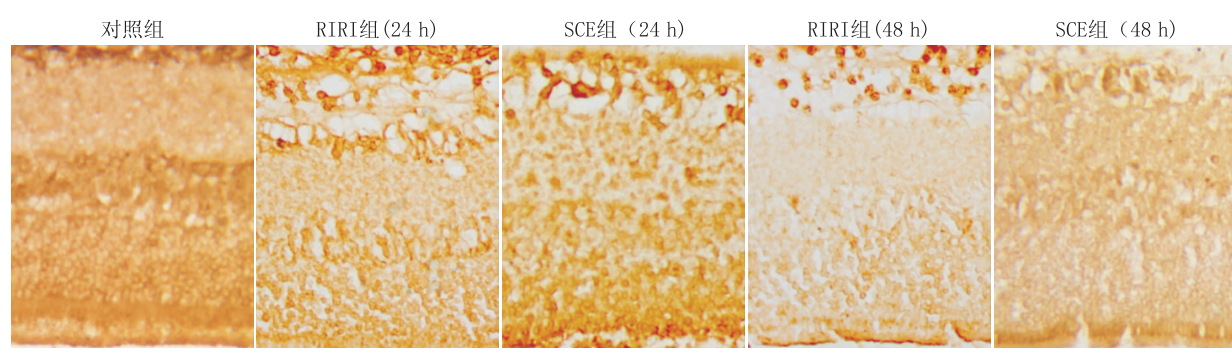


图5 各组大鼠视网膜中 Caspase-3 蛋白免疫组织化学染色结果(×200)

### 3 讨论

RIRI 的机制复杂,近年来国内外研究进一步证明细胞凋亡与 RIRI 密切相关。细胞凋亡不是被动的过程,而是主动过程,它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用<sup>[15]</sup>。其中 Bcl-2 家族基因在细胞凋亡中起到重要作用,Bcl-2 是一原癌基因,通过编码 Bcl-2 蛋白发挥抑制细胞凋亡的作用<sup>[16]</sup>。Bax 是 Bcl-2 家族中的一员,发挥促凋亡作用,Bcl-2 和 Bax 通过自身组成同二聚体和彼此之间组成异二聚体的不同比例介导其对细胞存活的生物学效应<sup>[7,17]</sup>,并通过调控线粒体外膜通透性,控制体内凋亡基因和细胞色素 C 等的释放从而调控细胞是否存活<sup>[18]</sup>。在本实验中,Bax 蛋白在 RIRI 后 6 h 时开始表达,12 h 时各层表达明显增加,24 h 时表达达到高峰,48 h 时表达减弱,72 h 时仍可检测到 Bax 蛋白的表达。而 Bcl-2 蛋白随再灌注时间的延长,表达量持续增高,于 48 h 时达高峰,72 h 时表达出现下降。从实验数据我们可以看出,RIRI 组 6 h、12 h 时的 Bcl-2/Bax 比例上升,这与 Bcl-2 蛋白持续升高,自身形成二聚体有关。随后 24 h、48 h、72 h 时的 Bcl-2/Bax 比例是降低的,这时虽然 Bcl-2 蛋白持续升高,并达到高峰,但 Bax 蛋白的表达量在该时间点也达到一定高度,并维持较高水平,随着时间的推移,促凋亡因素占主导作用,Bcl-2 蛋白虽然可以通过阻止或降解细胞皱缩、染色质浓缩和 DNA 裂解的发生来缓解视网膜细胞的凋亡,但依旧无法阻止细胞凋亡的趋势。因此在 RIRI 组 72 h 时,我们可以看到损伤继续发展,RGC 计数下降,NFL 明显变薄,内核层细胞明显减少,部分结构不清晰等现象。研究表明,Bcl-2 作用于 Caspase-3 的上游,通过抑制 Caspase-3 而发挥抗凋亡作用。Bcl-2 又是 Caspase-3 的底物,Caspase-3 特异性降解后,其功能由抑制凋亡转为触发凋亡<sup>[19]</sup>。从结果中我们可以看到,Caspase-3 的激活并表达的高峰出现在 RIRI 的早期,随着再灌注时间的延长,Bcl-2 可通过下调 Caspase-3 的表达来发挥抗凋亡作用。

五花血藤是我国的传统中药,多分布于西南地

区。在近几十年的临床运用中,五花血藤主要与其他中草药配伍,用于治疗盆腔炎、子宫内膜异位症、阑尾脓肿等。研究发现,SCE 中多糖组分(PSC)A-1 和 PSCB-1 可通过下调诱导型一氧化氮合酶水平,显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞一氧化氮的释放,从而提高血清和肝脏超氧化物歧化酶活性来发挥抗炎作用<sup>[20]</sup>。研究还发现,SCE 能改善局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中炎症的反应,其机制可能是通过抑制凋亡途径增加营养因子对神经元的保护,减少神经细胞凋亡,激活脑细胞的自我保护从而改善海马和皮质区的组织病理学改变,减轻脑缺血再灌注损伤<sup>[21]</sup>。还有研究表明,SCE 可以下调 Bcl-2 和 Mcl-1 的同时上调 Bax 的表达来发挥抗凋亡作用,从而在 HepG-2 移植瘤中抑制肿瘤细胞的生长而起到抗癌效果,并对正常组织细胞没有明显的毒副作用<sup>[22]</sup>。鉴于 SCE 的上述作用,我们在实验中尝试性的运用该药来探索其对 RIRI 的机制,发现在 RIRI 的急性期给予 SCE 可在损伤早期通过上调 Bcl-2 蛋白、下调 Bax 及 Caspase-3 蛋白的表达来发挥其抗凋亡作用。

综上所述,我们初步判断 SCE 对于大鼠 RIRI 有一定的治疗效果,能缓解 RIRI 后造成的神经细胞水肿等症状,同时激活抗细胞凋亡因子而起到一定的抑制凋亡的作用。本实验对于贵州传统中药的开发和利用提供了一定的药理学基础。

### 参考文献

[1] OSBORNE N N, CASSON R J, WOOD J P, CHIDLOW G, GRAHAM M, MELENA J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2004, 23(1): 91-147.

[2] ZHANG Y, CHO C H, ATCHANEYASAKUL L O, MCFARLAND T, APPUKUTTAN B, STOUT J T. Activation of the mitochondrial apoptotic pathway in a rat model of central retinal artery occlusion[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(6): 2133-2139.

[3] ZHOU C, LUO D, XIA W, GU C, LAHM T, XU X, et al. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) contributes to the neuroprotective effects of histone deacetylase inhibitors in retinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Neuroscience*, 2019, 418: 25-36.

[4] LIN L T, CHEN J T, TAI M C, CHEN Y H, CHEN C L, PAO S I, et al. Protective effects of hypercapnic acidosis on ischemi-



- a-reperfusion-induced retinal injury [J]. *PLoS ONE*, 2019, 14 (1): e0211185.
- [5] GONG Y, CAO X, GONG L, LI W. Sulforaphane alleviates retinal ganglion cell death and inflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation in a rat model of retinal ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2019, 33: 2058738419861777.
  - [6] SEONG H, RYU J, YOO W S, KIM S J, HAN Y S, PARK J M, et al. Resveratrol ameliorates retinal ischemia/reperfusion injury in C57BL/6J mice via downregulation of Caspase-3 [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42 (12): 1650-1658.
  - [7] LUO H, ZHUANG J, HU P, YE W, CHEN S, PANG Y, et al. Resveratrol delays retinal ganglion cell loss and attenuates gliosis-related inflammation from ischemia-reperfusion injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59 (10): 3879-3888.
  - [8] LIU W, XIA F, HA Y, ZHU S, LI Y, FOLORUNSO O, et al. Neuroprotective effects of HSF1 in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60 (4): 965-977.
  - [9] LI L, WANG Y, QIN X, ZHANG J, ZHANG Z. Echinacoside protects retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion-induced injury in the rat retina [J]. *Mol Vis*, 2018, 24: 746-758.
  - [10] DARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43 (6): 582-592.
  - [11] PENG P H, KO M L, CHEN C F. Epigallocatechin-3-gallate reduces retinal ischemia/reperfusion injury by attenuating neuronal nitric oxide synthase expression and activity [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86 (4): 637-646.
  - [12] 杨丹, 余德立, 余资江. 复方五花血藤对鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *眼科新进展*, 2014, 34 (8): 713-717.
  - [13] 毛永春, 崔承彬, 顾谦群. 中药大血藤化学成分和药理活性的研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2003, 15 (6): 559-562.
  - MAO S C, CUI C B, GU Q Q. Research advances in the chemical and biological studies on caulis sargentodoxac [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2003, 15 (6): 559-562.
  - [14] ETTAICHE M, FILLACIER K, WIDMANN C, HEURTEAUX C, LAZDUNSKI M. Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40 (3): 729-736.
  - [15] LIU L, SUN Q, WANG R, CHEN Z, WU J, XIA F, et al. Methane attenuates retinal ischemia/reperfusion injury via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways [J]. *Brain Res*, 2016, 1646: 327-333.
  - [16] ZHANG Y, YAN H. Effect of simvastatin on retinal Bcl-2/Bax expression and cell apoptosis in rats with ischemia-reperfusion injury [J]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2014, 50 (11): 826-832.
  - [17] CHEN Z, QIU P Y, MA C G. Dexmedetomidine preconditioning protects against retinal ischemia/reperfusion injury and inhibits inflammation response via toll-like receptor 4 (TLR4) pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1018-1024.
  - [18] XIONG S, XU Y, MA M, WANG H, WEI F, GU Q, et al. Neuroprotective effects of a novel peptide, FK18, under oxygen-glucose deprivation in SH-SY5Y cells and retinal ischemia in rats via the Akt pathway [J]. *Neurochem Int*, 2017, 108: 78-90.
  - [19] HU Y, LI H, LIU K, ZHANG Y, REN L, FAN Z. Protective effects of icaritin on human vascular endothelial cells induced by oxidized low-density lipoprotein via modulating caspase-3 and Bcl-2 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (5): 6835-6839.
  - [20] GUO L, MA R, SUN H, RAZA A, TANG J, LI Z. Anti-inflammatory activities and related mechanism of polysaccharides isolated from *Sargentodoxa cuneata* [J]. *Chem Biodivers*, 2018, 15 (11): e1800343.
  - [21] BAI M, LIU B, PENG M, JIA J, FANG X, MIAO M. Effect of *Sargentodoxa cuneata* total phenolic acids on focal cerebral ischemia reperfusion injury rats model [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26 (3): 569-576.
  - [22] WANG M H, LONG M, ZHU B Y, YANG S H, REN J H, ZHANG H Z. Effects of sargentgloryvine stem extracts on HepG-2 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17 (23): 2848-2854.

## Effects of sargentodoxa cuneata extracts on apoptosis related factors expression in rat retina after ischaemic reperfusion injury

YANG Dan<sup>1</sup>, YU Deli<sup>2</sup>, SUN Baofei<sup>1</sup>, KANG Chaosheng<sup>1</sup>, SUN Jiangling<sup>3</sup>, YU Zijiang<sup>1</sup>

1. Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

2. Ophthalmology of 2nd Clinical, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

3. Guiyang Hospital of Stomatology, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

**Corresponding author:** YU Zijiang, E-mail: yzj0112@126.com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of sargentodoxa cuneata extracts (SCE) on the expression of apoptosis related factors Bcl-2, Bax and Caspase-3 in rats with retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI). **Methods** Ninety healthy and clean adult SD rats were randomly divided into control group, RIRI group and sargentodoxa cuneata extracts (SCE) group, 30 rats in each group. Then the 6 rats were sacrificed at 6h, 12h, 24h, 48h and 72h during reperfusion time for experiment. Nissl staining was used to observe the morphological changes of neural cells in each layer of retina in each group, and immunohistochemistry was used to detect the expression of apoptosis related factors Bcl-2, Bax and Caspase-3 in each layer of retina before and after SCE treatment. **Results** Nissl bodies were abundant, stained deeply and distributed in blocks in the control group. In the RIRI group, the nissl bodies were less than those in the control group, with light staining and uneven distribution. However, the staining of SCE group was better than that of the RIRI group. In the control group, the expression of Bcl-2 protein was almost non-existent, and the positive expression began to increase at 24 h after reperfusion, reaching the peak at 48 h after reperfusion. The positive expression of the SCE group was higher than that of the RIRI group at according time point (all  $P < 0.05$ ). Bax protein was slightly expressed in the control group, and the positive expression increased continuously after 12 h of reperfusion, reaching the peak at 24 h. The positive expression of SCE group was lower than that of the RIRI group at according time point (all  $P < 0.05$ ). In the control group, the expression of Caspase-3 protein was almost non-existent, it began to increase at 6h after reperfusion, reaching the peak at 12h. The positive expression in the SCE treatment group was lower than that in the model group in every period (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** SCE may up-regulate the expression of Bcl-2 protein and down-regulate the expression of Bax and Caspase-3 protein, so as to play the role of anti-apoptosis and protect the retinal ischemia-reperfusion injury in rats.

**[Key words]** retinal ischemia-reperfusion injury; sargentodoxa cuneata extracts; Bcl-2; Bax; Caspase-3