

引文格式:向征,石赞懿,谭钢.一氧化氮(NO)对角膜神经再生的影响作用[J].眼科新进展,2022,42(10):769-774.

doi:10.13389/j.cnki.rao.2022.0158

### 【实验研究】

## 一氧化氮(NO)对角膜神经再生的影响作用<sup>△</sup>

向 征 石 贇 懿 谭 钢

作者简介: 向征 (ORCID: 0000-0002-3032-7915), 男, 1996 年 4 月出生, 湖南常德人, 硕士。研究方向: 角膜病。E-mail: 457173719@qq.com

**通信作者:**谭钢 (ORCID:0000-0002-4205-2015),男,1978 年 9 月出生,湖南人,博士,主任医师。研究方向:角膜病。E-mail:tangang99@hotmail.com

收稿日期:2021-11-03

修回日期:2022-07-22

本文编辑：董建军

△ **基金项目:**国家自然科学基金项目(编号:81100648,82171031);湖南省自然科学基金资助项目(编号:2021JJ30620);湖南省卫生健康委员会科技计划资助项目(编号:20201966)

作者单位:421005 湖南省衡阳市,  
南华大学附属第一医院眼科

**【摘要】** 目的 探讨一氧化氮(NO)对角膜神经再生的影响作用。方法 本研究以亚硝酸钠( $\text{NaNO}_2$ )作为外源性NO供体,在细胞实验中以小鼠神经母细胞瘤细胞(Neuro-2a)为研究对象。采用不同浓度的 $\text{NaNO}_2$ 处理Neuro-2a细胞并筛选出NO的最佳神经营养浓度。在动物实验中,将30只SD大鼠随机分组,10只作为NC组,其余20只大鼠建立角膜碱烧伤模型,再随机分为PBS组和NO组,每组10只。从碱烧伤当天开始,PBS组给予PBS治疗,NO组给予 $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$ 与PBS混合治疗。用荧光素钠染色后观察并记录大鼠角膜上皮愈合情况,计算角膜上皮愈合率。用CCK-8检测细胞活性,流式细胞术检测细胞凋亡率,免疫荧光法检测细胞神经元标记物的表达。于大鼠角膜碱烧伤处理后7 d取大鼠角膜上皮组织,分别采用实时荧光定量PCR和Western blot法检测每组角膜上皮中神经元标志物 $\beta$ III-微管蛋白和神经生长因子(NGF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、睫状神经营养因子(CNTF)的表达水平。结果  $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$ 处理Neuro-2a细胞24 h后可显著提高细胞活性;使用浓度为 $0.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NaNO}_2$ 处理Neuro-2a细胞24 h后,测得细胞凋亡率分别为18.60%、13.00%、19.48%;与 $0.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率降低( $P < 0.01$ )。与 $0.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组Neuro-2a细胞 $\beta$ III-微管蛋白、MAP2和SMI312三种神经元标志物相对表达量均增加(均为 $P < 0.05$ )。碱烧伤后1 d、3 d、7 d,与PBS组相比,NO组大鼠角膜上皮愈合率均升高(均为 $P < 0.05$ )。与NC组相比,PBS组和NO组大鼠角膜组织各神经营养因子mRNA的相对表达量均增高(均为 $P < 0.05$ )。与PBS组相比,NO组大鼠角膜组织NGF、GDNF、CNTF mRNA的相对表达量均增高(均为 $P < 0.05$ )。与NC组相比,PBS组和NO组大鼠角膜组织 $\beta$ III-微管蛋白、NGF、GDNF、CNTF蛋白的表达意义(均为 $P < 0.05$ )。结论 气体信号分子NO能促进神经细胞的生长以及相关神经类型中,局部应用外源性NO进行治疗,可对角膜上皮和角膜神经产生明显的营养作用。

**【关键词】** 角膜碱烧伤;一氧化氮;角膜神经再生;神经生长因子

【中图分类号】R772.2

角膜感觉神经的分布十分丰富,主要由三叉神经的眼支经睫状神经到达角膜,将感觉从眼表传递到大脑<sup>[1]</sup>。角膜神经在维持眼表内环境平衡方面起着至关重要的作用<sup>[2]</sup>。角膜神经不仅通过精细的感觉机制来保护眼表,而且还通过各种神经营养因子保护角膜上皮的完整性。神经纤维的任何损伤都可能导致神经营养性角膜疾病,包括神经营养性角膜病<sup>[3]</sup>和神经性疼痛<sup>[4]</sup>。目前,外用神经生长因子(NGF)滴眼液对于治疗神经营养性疾病有着良好的疗效,NGF滴眼液中包含的神经营养因子在角膜神经再生过程中发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。在体内,角膜上皮细胞和角膜神经纤维生成的神经营养因子影响着角膜神经的存活以及再生<sup>[6]</sup>。因此,研究角膜神经再生过程中神经营养因子的表达水平具有重要意义。

气体信号分子一氧化氮(NO)是一种具有多种生物学功能的小信号分子,对机体的稳态平衡起到了重要的作用<sup>[7]</sup>。NO在细胞中有两大功能,调节和细胞毒性。在低浓度水平时,NO是一种发挥细胞保护作用的调节剂,而在高浓度水平时,它的作用以细

胞毒性为主。作为一种神经调节剂,NO 可以调节睡眠、食欲、体温、神经生长和基因表达<sup>[8]</sup>。NO 在伤口愈合中的作用已被研究了数十年,并在细胞和动物模型中被证明能促进角膜上皮伤口愈合。低浓度的NO 可以增加角膜上皮细胞的增殖和迁移能力,ERK 和 p38MAPK 信号通路均参与了这一过程。此外,动物实验显示角膜碱烧伤后局部应用 NO 可促进角膜创面愈合<sup>[9]</sup>。本研究探讨 NO 对角膜神经再生的影响。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 取 30 只成年清洁级雄性 SD 大鼠(南华大学动物实验中心),体重( $200 \pm 20$ )g,分笼饲养,环境温度设定为( $24 \pm 2$ )℃,不限水源和饲料,人工控制照明,保持 12 h 昼夜更替。动物使用合格证号:SCXK(湘)2019-0014。本研究动物处理遵循《实验动物管理条例》(2017 修订版)的规定。

### 1.1.2 细胞及主要试剂

小鼠神经母细胞瘤(Neuro-2a)细胞和MEM培养基购自中乔新舟生物科技有

限公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司,CCK-8 试剂盒购自德国 Biotech 公司,NGF、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)和睫状神经营养因子(CNTF)均购自美国 Abcam 公司,抗体  $\beta$  III-微管蛋白购自美国 CST 公司,MAP2 和 SMI312 抗体均购自北京 Biolegend 有限公司,NGF、脑源性神经营养因子(BDNF)、GDNF、色素上皮源性因子(PEDF)、CNTF 引物均购自上海生工生物工程有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将 Neuro-2a 细胞加入含体积分数 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素的 MEM 培养基中,放入  $75 \text{ cm}^2$  培养瓶内,置入  $37^\circ\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内培养。培养基每 2 d 更换 1 次,最后使用  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白酶进行消化处理。

**1.2.2 CCK-8 检测细胞活性** 收集对数生长期的 Neuro-2a 细胞,调整细胞密度并将细胞分布于 96 孔板中,每孔  $100 \mu\text{L}$ ,约  $1 \times 10^3$  个细胞。将细胞置于  $37^\circ\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h 至细胞贴壁。在细胞贴壁之后加入亚硝酸钠( $\text{NaNO}_2$ )处理细胞,浓度分别为  $0.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10\,000.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,处理时间为 6 h、24 h、48 h 和 72 h,每孔加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 试剂,孵育 2 h 后测定其在  $450 \text{ nm}$  处的光密度并计算出细胞活性。

**1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 将 Neuro-2a 细胞以每孔  $4 \times 10^6$  个铺于 6 孔板中,每孔用含  $\text{NaNO}_2$  的培养基处理 24 h,  $\text{NaNO}_2$  浓度分别为  $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。具体操作步骤如下:使用移液枪吸去各孔内液体,PBS 浸洗 3 次,加入适量的胰蛋白酶消化细胞,使细胞分离并吹散,随后加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化后,将细胞混匀收集于离心管中  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min;吸去上清弃掉,使用  $100 \mu\text{L}$   $1 \times$  结合缓冲液将  $1 \times 10^5$  个细胞重悬之后用流式细胞术上机专用试管收集;每管加入  $5 \mu\text{L}$  Annexin V-FITC 以及  $5 \mu\text{L}$  碘化丙啶工作液,混匀后置于室温避光反应 10 min,上述操作在冰上完成,配置完成之后尽快使用流式细胞仪进行分析,细胞凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。

**1.2.4 免疫荧光染色**  $\beta$  III-微管蛋白是神经元微管网络的一个组成部分,是神经元早期有丝分裂的标志物,与正在进行的神经发生相关<sup>[10]</sup>。神经元的细胞体和树突可表达 MAP2,其在神经发生中起关键作用<sup>[11]</sup>。SMI312 是一种泛轴突神经丝标记物,可选择性地对抗高度磷酸化的成熟轴突<sup>[12]</sup>。为了评估  $\beta$  III-微管蛋白、MAP2 和 SMI312 的表达,将 Neuro-2a 细胞接种于 24 孔板上,每组培养液中分别加入 0

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaNO}_2$ ,培养 3 d。洗涤细胞,用  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛固定细胞,并用 Triton X-100 渗透、洗涤后,用体积分数 10% 山羊血清封闭,然后加入  $\beta$  III-微管蛋白、MAP2 和 SMI312 一抗孵育过夜。洗涤后加二抗孵育 1 h,最后使用 DAPI 染细胞核,在荧光显微镜下拍照。所有实验重复 3 次,验证可重复性。

**1.2.5 大鼠角膜碱烧伤模型建立、分组、角膜上皮愈合率计算** 建模前 3 d 大鼠角膜滴左氧氟沙星滴眼液,每天 4 次。将 30 只 SD 大鼠随机分组,10 只作为 NC 组,其余 20 只大鼠按照  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  给予  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  水合氯醛溶液腹腔注射麻醉,并给予盐酸奥布卡因滴眼液滴眼行表面麻醉 2 次,将用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 浸润过的实验滤纸置于大鼠右眼角膜中央 40 s,之后用生理盐水冲洗结膜囊 60 s,建立角膜碱烧伤模型,再随机分为 PBS 组和 NO 组,每组 10 只。从碱烧伤当天开始,PBS 组给予 PBS 治疗,NO 组给予  $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  与 PBS 混合治疗,每 6 h 滴 1 滴,持续 1 周。分别于碱烧伤后 1 d、2 d、7 d 拍摄右眼眼表照片。用荧光素钠染色后观察并记录大鼠角膜上皮愈合情况,计算角膜上皮愈合率。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测** 大鼠角膜碱烧伤处理后 7 d,进一步对收集的角膜上皮组织进行匀浆处理,对匀浆组织进行神经营养因子检测。角膜上皮神经营养因子 NGF、BDNF、GDNF、PEDF、CNTF mRNA 的相对表达量均以 GAPDH 基因作为内参。引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成。NGF 正向引物序列为 5'-TCATCCACCCAC-CCAGTCTTCC-3',反向引物序列为 5'-TCCGTGGCT-GTGGTCTTATCTCC-3';BDNF 正向引物序列为 5'-TGGAAGTTCGCAATGCCGAAGTAC-3',反向引物序列为 5'-TCCTTATGAACCGCCAGCCAATTC-3';GDNF 正向引物序列为 5'-CGCTGACCACTGACTC-CAATATGC-3',反向引物序列为 5'-AGTGCCGC-CGCTTGTTTATCTG-3';CNTF 正向引物序列为 5'-AGGTGACTTCCATCAGGCAATACATAC-3',反向引物序列为 5'-TGTTCAGAGAAGCACCATTAACTC-CTC';PEDF 正向引物序列为 5'-CAATCCTGACATCCACAGCACCTAC-3',反向引物序列为 5'-ACACAATTCTGGAGGCACTCTTGAAG-3'。扩增条件:95  $^\circ\text{C}$  预变性 15 s,95  $^\circ\text{C}$  变性 15 s,57  $^\circ\text{C}$  退火 30 s,74  $^\circ\text{C}$  延伸 30 s,进行 45 个循环;随后进行熔解曲线分析:95  $^\circ\text{C}$  反应 15 s,60  $^\circ\text{C}$  反应 30 s,95  $^\circ\text{C}$  反应 15 s,最后置于 4  $^\circ\text{C}$  直至实验结束。以 GAPDH 基因作为内参,用相对定量方法  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  进行计算,计算各基因 mRNA 的相对表达量。

**1.2.7 Western blot 检测蛋白表达水平** 采用 Western blot 检测角膜组织中各蛋白的表达水平,在角膜组织中加入裂解液及蛋白酶抑制剂混合后低温研磨并离心,取上清液,而后采用 BCA 法定量并配

平,最后于95℃煮10 min完成蛋白提取。配制上层浓缩胶、下层分离胶电泳分离蛋白后进行转膜;然后用50 g·L<sup>-1</sup>脱脂奶粉封闭2 h,加一抗稀释液(1:500),在4℃冰箱孵育1晚;第2天用TBST洗膜15 min×3次后加二抗稀释液(1:8000),常温孵育1 h并再用TBST漂洗3次后显影。以ImageJ软件处理图像,将目的条带与GAPDH内参所得比值作为蛋白相对表达水平,依次检测各组大鼠角膜组织中βⅢ-微管蛋白、NGF、GDNF、CNTF的蛋白表达水平。

**1.3 统计学方法** 采用统计学软件GraphPad Prism8进行实验数据处理,结果以均数±标准差表示,两组间比较采用*t*检验。检验水准:α=0.05。

表1 不同浓度NaNO<sub>2</sub>和处理时间Neuro-2a细胞活性

NaNO <sub>2</sub> 浓度	不同处理时间细胞活性/%			
	6 h	24 h	48 h	72 h
0.00 μmol·L <sup>-1</sup>	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
0.01 μmol·L <sup>-1</sup>	101.00±18.33	105.67±10.02	108.67±6.03	103.67±6.35
0.10 μmol·L <sup>-1</sup>	98.33±15.57	103.67±11.85	110.00±11.36	105.00±8.66
10.00 μmol·L <sup>-1</sup>	111.33±23.76	116.67±5.69*	120.67±7.77*	120.67±6.03*
100.00 μmol·L <sup>-1</sup>	93.33±20.53	105.67±19.86	93.33±5.69	99.00±4.58
1000.00 μmol·L <sup>-1</sup>	89.33±10.02	178.33±6.43*	53.00±5.29**	69.67±4.16**
10 000.00 μmol·L <sup>-1</sup>	96.00±9.54	34.00±6.24**	39.00±4.58**	41.33±5.77**

注:与0.00 μmol·L<sup>-1</sup>组相比,\**P*<0.05,\*\**P*<0.01。

**2.2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率** 使用浓度为0.00 μmol·L<sup>-1</sup>、10.00 μmol·L<sup>-1</sup>、1000.00 μmol·L<sup>-1</sup>的NaNO<sub>2</sub>处理Neuro-2a细胞24 h后,测得细胞凋亡率分别为18.60%、13.00%、19.48%;与0.00 μmol·L<sup>-1</sup>组相比,10.00 μmol·L<sup>-1</sup>组细胞凋亡率降低(*P*<0.01),当NaNO<sub>2</sub>浓度升高至1000.00 μmol·L<sup>-1</sup>时细胞凋亡率回升至0.00 μmol·L<sup>-1</sup>时的水平(*P*>0.05),甚至显示出细胞毒性作用(图1)。

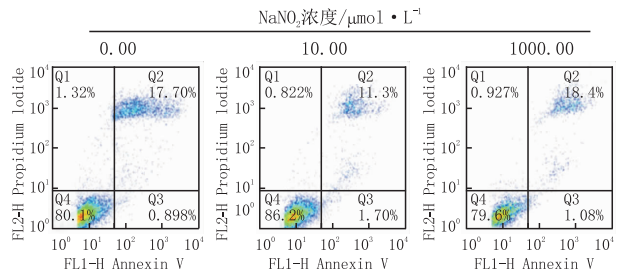


图1 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

**2.3 不同浓度NaNO<sub>2</sub>处理后Neuro-2a细胞神经元标志物的免疫荧光染色情况** 使用0.00 μmol·L<sup>-1</sup>、10.00 μmol·L<sup>-1</sup>、1000.00 μmol·L<sup>-1</sup>的NaNO<sub>2</sub>处理Neuro-2a细胞3 d后,观察βⅢ-微管蛋白(绿色)、MAP2(红色)和SMI312(红色)的免疫荧光染色结果显示:与0.00 μmol·L<sup>-1</sup>组相比,10.00 μmol·L<sup>-1</sup>组βⅢ-微管蛋白、MAP2和SMI312三种神经元

2 结果

2.1 CCK-8检测NO对Neuro-2a细胞活性的影响

该实验设置了7个NaNO<sub>2</sub>浓度梯度和4个时间梯度,其中10.00 μmol·L<sup>-1</sup>NaNO<sub>2</sub>处理Neuro-2a细胞24 h后可显著提高细胞活性;1000.00 μmol·L<sup>-1</sup>、10 000.00 μmol·L<sup>-1</sup>NaNO<sub>2</sub>处理Neuro-2a细胞6 h后对细胞活性无明显影响,24 h后可显著降低细胞活性。因此筛选出具有代表性的NaNO<sub>2</sub>浓度10.00 μmol·L<sup>-1</sup>、1000.00 μmol·L<sup>-1</sup>作为后续实验中的处理浓度(表1)。

标志物相对表达量均增加(均为*P*<0.05),1000.00 μmol·L<sup>-1</sup>组三种神经元标志物相对表达量均略有降低,但差异均无统计学意义(均为*P*>0.05)(图2)。

**2.4 NO在角膜伤口愈合中的作用** 基于前述细胞实验结果,NaNO<sub>2</sub>作用浓度为10.00 μmol·L<sup>-1</sup>时可显著提高细胞活性,在动物实验中采用该浓度局部治疗碱烧伤后大鼠角膜,结果显示:碱烧伤后1 d、3 d、7 d,与PBS组相比,NO组大鼠角膜上皮愈合率均升高(均为*P*<0.05),同时碱烧伤所致的角膜混浊得到明显改善,该结果进一步证实了NO对角膜损伤的修复作用(图3)。

**2.5 各组大鼠角膜组织中神经营养因子mRNA的表达** 在碱烧伤后7 d,采用实时荧光定量PCR检测角膜上皮神经营养因子NGF、BDNF、GDNF、PEDF、CNTF mRNA的相对表达量,结果显示:与PBS组相比,NO组大鼠角膜组织NGF、GDNF、CNTF mRNA的相对表达量均增高(均为*P*<0.05)(图4)。

**2.6 各组大鼠角膜组织中βⅢ-微管蛋白、NGF、GDNF、CNTF的蛋白表达情况** Western blot检测结果显示:碱烧伤后7 d,与NC组相比,PBS组和NO组大鼠角膜组织βⅢ-微管蛋白、NGF、GDNF、CNTF的蛋白表达水平均增高(均为*P*<0.05)。与PBS组相比,NO组大鼠角膜组织βⅢ-微管蛋白、NGF、GDNF、CNTF的蛋白表达水平均明显增高,差异均有统计学意义(均为*P*<0.05)(图5)。



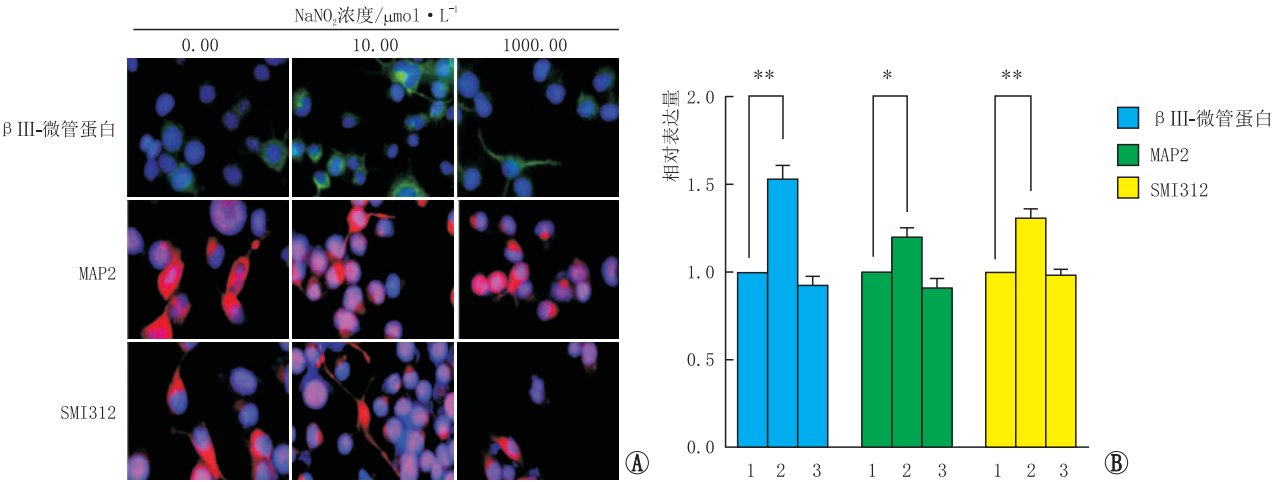


图2 不同浓度NaNO<sub>2</sub>处理后Neuro-2a细胞 $\beta$ III-微管蛋白(绿色)、MAP2(红色)和SMI312(红色)的免疫荧光染色结果和相对表达量 A:免疫荧光染色;B:相对表达量。两组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。B图中横坐标1、2、3分别表示0.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、10.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、1000.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。

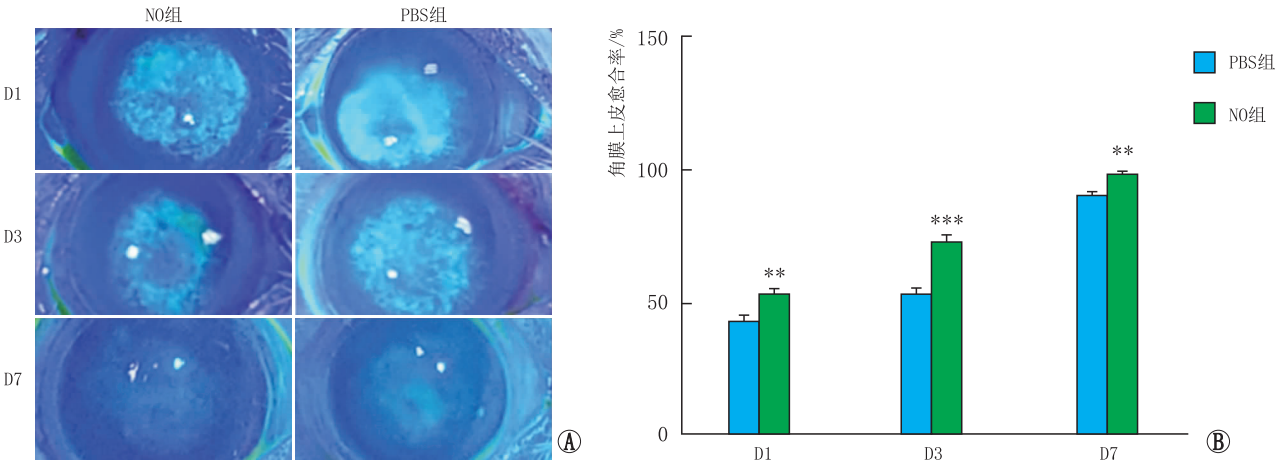


图3 NO在角膜伤口愈合中的作用 A:各组大鼠角膜碱烧伤后不同时间点角膜上皮愈合情况;B:各组大鼠角膜碱烧伤后不同时间点角膜上皮愈合率。与PBS组相比\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。D1、D3、D7分别表示碱烧伤后1 d、3 d、7 d。

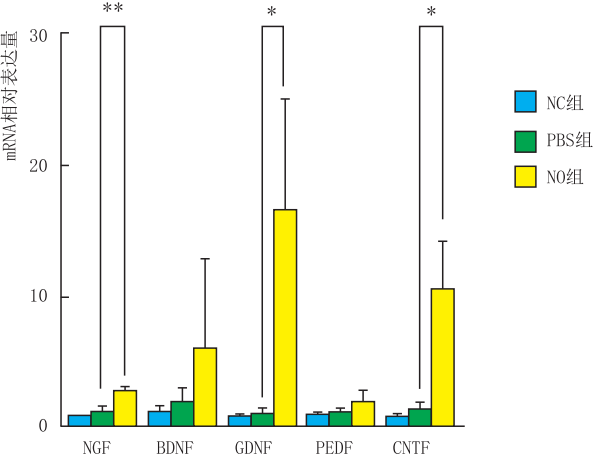


图4 碱烧伤后7 d,各组大鼠角膜组织中神经营养因子mRNA的表达 两组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

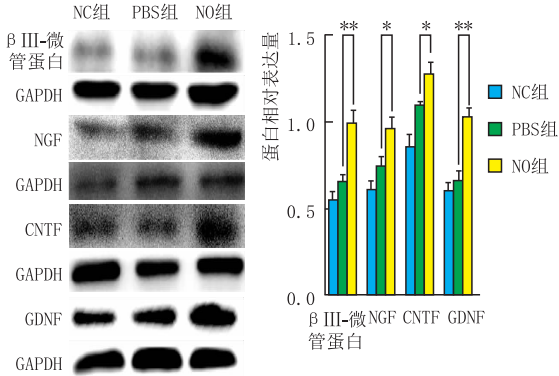


图5 各组大鼠角膜组织中 $\beta$ III-微管蛋白、NGF、CNTF、GDNF的蛋白表达情况 A:Western blot检测各组大鼠角膜组织中 $\beta$ III-微管蛋白、NGF、CNTF、GDNF的蛋白表达情况;B:蛋白相对表达量,两组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

神经营养因子是中枢和外周神经系统对神经元的生长以及成熟神经元的维持起重要作用的调节因子。目前人们对角膜神经受损后角膜神经再生的机制还知之甚少,但神经营养因子在角膜神经再生过程中的积极作用已经得到了证实。NGF、CNTF 和 GDNF 等神经营养因子能够结合角膜上皮中的相关受体,激活相关的信号通路,进而在角膜上皮的损伤修复以及角膜神经再生过程中发挥重要的作用<sup>[13]</sup>。研究发现,人重组 NGF 可促进中至重度神经营养性角膜疾病伤口的愈合<sup>[14]</sup>。因此,观察角膜神经再生过程中神经营养因子的表达水平是研究角膜神经再生的重要指标之一。

在中枢神经系统中,生理浓度的 NO 参与记忆的形成和脑血流量的调节,从而起到神经保护的作用。高浓度的 NO 介导神经毒性,导致神经退行性疾病和中风<sup>[15]</sup>。本次在细胞水平的实验结果提示:低浓度的 NO 可提高 Neuro-2a 细胞的细胞活性以及神经元标志物的表达,表现出明显的神经营养作用,而高浓度的 NO 则对于 Neuro-2a 细胞产生了明显的细胞毒性。我们推测,NO 可能是通过内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和神经型一氧化氮合酶(nNOS)共同发挥作用。eNOS 在脑血管内皮细胞和运动神经元中均含量丰富;在正常的生理过程中,eNOS 生成的 NO 可调节血液循环,并在长期电位增强中充当信使<sup>[16]</sup>。nNOS 在不同类型的外周神经细胞中均有表达,其在神经细胞和雪旺细胞中的表达也已在体外得到证实。当外周神经受到压力或损伤时,受损轴突周围的雪旺细胞会表达 nNOS<sup>[17]</sup>。因此,观察 eNOS 和 nNOS 的共同作用对角膜神经再生过程中神经营养因子表达的影响是本研究的关键。

基于前述细胞实验结果,我们筛选出  $\text{NaNO}_2$  的最佳神经营养浓度为  $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,以此浓度外用治疗大鼠角膜碱烧伤,结果显示:NO 对于角膜上皮损伤的修复有着显著的促进作用。为了研究角膜损伤修复过程中神经营养因子表达的变化,在碱烧伤后 7 d 我们对收集的大鼠角膜组织进行了实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测,结果表明:与 PBS 组相比,NO 组大鼠角膜组织神经元标志物  $\beta$  III-微管蛋白表达水平以及 NGF、GDNF、CNTF 这 3 种神经营养因子的 mRNA 和蛋白表达水平均增高。这说明在角膜上皮损伤修复的过程中,NO 显著促进了相关神经营养因子的生成,表现出明显的角膜神经营养作用。

综上所述,本研究发现,气体信号分子 NO 能促进神经细胞的生长以及相关神经元标志物的表达;

在大鼠角膜碱烧伤模型中,局部应用外源性 NO 进行治疗,可对角膜上皮和角膜神经产生明显的营养作用。以上结果表明,NO 很可能是治疗角膜神经病变的重要药物成分之一。

### 参考文献

- [1] SHAHEEN B S, BAKIR M, JAIN S. Corneal nerves in health and disease[J]. *Surv Ophthalmol*, 2014, 59(3): 263-285.
- [2] BELMONTE C, NICHOLS J J, COX S M, BROCK J A, BEGLEY C G, BEREITER D A, et al. TFOS DEWS II pain and sensation report[J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 404-437.
- [3] DUA H S, SAID D G, MESSMER E M, ROLANDO M, BENITEZ-DEL-CASTILLO J M, HOSSAIN P N, et al. Neurotrophic keratopathy[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 66: 107-131.
- [4] MOSHIRFAR M, BENSTEAD E E, SORRENTINO P M, TRIPATHY K, ROSENTHAL P, BORSOOK D. Ocular neuropathic pain[J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100(1): 128-134.
- [5] BIKBOVA G, OSHITARI T, BABA T, YAMAMOTO S. Neuronal changes in the diabetic cornea: perspectives for neuroprotection[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 5140823.
- [6] SACCHETTI M, LAMBIASE A. Neurotrophic factors and corneal nerve regeneration[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(8): 1220-1224.
- [7] KRÓL M, KEPINSKA M. Human nitric oxide Synthase-Its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 56.
- [8] KOUROSH-ARAMI M, HOSSEINI N, MOHSENZADEGAN M, KOMAKI A, JOGHATAEI M T. Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase[J]. *Rev Neurosci*, 2020, 31(6): 617-636.
- [9] PARK J H, JY K, KIM D J, KIM M, CHANG M, CHUCK R S, et al. Effect of nitric oxide on human corneal epithelial cell viability and corneal wound healing[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8093.
- [10] FERRUCCI M, BIAGIONI F, LENZI P, GAMBARDELLA S, FERRESE R, CALIERNO M T, et al. Rapamycin promotes differentiation increasing  $\beta$ III-tubulin, NeuN, and NeuroD while suppressing nestin expression in glioblastoma cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(18): 29574-29599.
- [11] SHAFIT-ZAGARDO B, KALCHEVA N. Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron[J]. *Mol Neurobiol*, 1998, 16(2): 149-162.
- [12] ULFIC N, NICKEL J, BOHL J. Monoclonal antibodies SMI 311 and SMI 312 as tools to investigate the maturation of nerve cells and axonal patterns in human fetal brain[J]. *Cell Tissue Res*, 1998, 291(3): 433-443.
- [13] CHEN J, CHEN P, BACKMAN L J, ZHOU Q, DANIELSON P. Ciliary neurotrophic factor promotes the migration of corneal epithelial stem/progenitor cells by up-regulation of MMPs through the phosphorylation of Akt[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25870.
- [14] BONINI S, LAMBIASE A, RAMA P, SINIGAGLIA F, ALLEGRETTI M, CHAO W, et al. Phase II randomized, Double-Masked, Vehicle-controlled trial of recombinant human nerve growth factor for neurotrophic keratitis[J]. *Ophthalmology*, 2018, 125(9): 1332-1343.
- [15] RIDNOUR L A, THOMAS D D, SWITZER C, FLORES-SANTANA W, ISENBERG J S, AMBS S, et al. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer[J]. *Nitric Oxide*, 2008, 19(2): 73-76.
- [16] ALLY A, POWELL I, ALLY M M, CHAITOFF K, NAULI S M. Role of neuronal nitric oxide synthase on cardiovascular functions in physiological and pathophysiological states[J]. *Nitric Oxide*, 2020, 102: 52-73.
- [17] SHEN A, GAO S, BEN Z, WANG H, JIA J, TAO T, et al. Identification and potential role of PSD-95 in Schwann cells[J]. *Neuro Sci*, 2008, 29(5): 321-330.

# Effect of gas signal molecule nitric oxide on corneal nerve regeneration

XIANG Zheng, SHI Yunyi, TAN Gang

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421005, Hunan Province, China

**Corresponding author:** TAN Gang, E-mail: tangang99@hotmail.com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of the gas signal molecule nitric oxide (NO) on corneal nerve regeneration. **Methods** In this study, sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) was used as an exogenous NO donor. In cell experiments, mouse neuroblastoma cells (Neuro-2a) were selected and treated with different concentrations of  $\text{NaNO}_2$  to screen out the optimal neurotrophic concentration of NO. In animal experiments, 30 SD rats were selected, and 10 of them were randomly divided into the normal control (NC) group. The remaining 20 rats were used to establish corneal alkali burn models and then were randomly divided into the PBS group and the NO group, with 10 rats in each group. From the day of alkali burn, rats in the PBS group were treated with PBS, and rats in the NO group were treated with  $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  mixed with PBS. After fluorescein sodium staining, the healing of corneal epitheliums in rats was observed and recorded, and its rate was calculated. The cell viability was detected by CCK-8, the cell apoptosis by flow cytometry, and the expression of neuronal markers by immunofluorescence. Rat corneal epithelial tissues were collected seven days after alkali burn, and the expression levels of  $\beta$  III-tubulin, nerve growth factor (NGF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), and ciliary neurotrophic factor (CNTF) in them were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blot.

**Results** The viability of Neuro-2a cells treated with  $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  for 24 h was significantly increased. The apoptosis of Neuro-2a cells treated with  $0.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and  $1000.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  for 24 h was 18.60%, 13.00%, and 19.48%, respectively. Compared with the  $0.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group, the apoptosis rate in the  $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group decreased ( $P < 0.01$ ), while the relative expression levels of  $\beta$  III-tubulin, microtubule-associated protein 2 and SMI 312 increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the PBS group, the corneal epithelial healing rate in the NO group significantly improved one, three and seven days after alkali burn (all  $P < 0.05$ ). Compared with the NC group, the relative mRNA expression of each neurotrophic factor in the PBS and NO groups increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the PBS group, the relative mRNA expression of NGF, GDNF and CNTF in the NO group increased (all  $P < 0.05$ ). Western blot results showed that seven days after alkali burn, the protein expression of  $\beta$  III-tubulin, NGF, GDNF and CNTF in the PBS and NO groups increased compared with the NC group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the PBS group, the protein expression of  $\beta$  III-tubulin, NGF, GDNF and CNTF in the NO group increased significantly (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The gas signal molecule NO can promote the growth of nerve cells and the expression of related neuronal markers. In the rat corneal alkali burn model, local application of exogenous NO can produce obvious nutritional effects on the corneal epitheliums and nerves.

**[Key words]** corneal alkali burn; nitric oxide; corneal nerve regeneration; nerve growth factor