

双七他克林对青光眼模型大鼠视神经的保护作用

方家华^{1,2}, 宋小云¹, 胡蓉¹, 刘俊贤¹, 许银娥¹

引用:方家华,宋小云,胡蓉,等. 双七他克林对青光眼模型大鼠视神经的保护作用. 国际眼科杂志 2020;20(6):956-959

基金项目:湖南省自然科学基金面上项目(No.2017JJ2287);湖北省自然科学基金重点项目(No.2014CFA065)

作者单位:¹(410005)中国湖南省长沙市第一医院眼科;²(434000)中国湖北省荆州市第一人民医院眼科

作者简介:方家华,毕业于华中科技大学,博士,主任医师,科主任,研究方向:青光眼、视网膜疾病。

通讯作者:方家华. nmhuman@163.com

收稿日期:2019-09-16 修回日期:2020-05-09

摘要

目的:观察双七他克林对青光眼模型大鼠的视神经保护作用。

方法:选取雄性成年SD大鼠24只,随机分成对照组、手术组、双七他克林组和美金刚胺组,通过右眼巩膜上静脉注射高渗盐水(对照组大鼠右眼仅进行上巩膜静脉穿刺)制作青光眼模型后,对照组和手术组大鼠给予正常饮水,双七他克林组和美金刚胺组大鼠饮水中每天分别添加0.5mg/kg双七他克林和5mg/kg美金刚胺,持续5wk。定期测量眼压,造模后5wk处死大鼠,取右侧视网膜进行免疫荧光染色,检测视网膜神经节细胞数目和视网膜神经纤维层厚度。

结果:造模后模型大鼠右眼眼压均显著升高,至造模后1mo,均高于28mmHg。手术组大鼠右眼视网膜神经节细胞数较对照组明显减少(79.83±9.58个 vs 119.50±8.26个, $P<0.01$),神经纤维层厚度明显变薄(6.64±0.50μm vs 13.40±0.60μm, $P<0.01$),而双七他克林(109.00±7.04个)和美金刚胺(107.33±8.57个)能够抑制青光眼所致的视网膜神经节细胞减少,且双七他克林能够抑制青光眼所致的视网膜神经纤维层萎缩(12.26±0.78μm)。

结论:双七他克林能够抑制青光眼所致视网膜神经节细胞数目减少及神经纤维层萎缩。

关键词:双七他克林;美金刚胺;大鼠;青光眼;神经保护

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.6.06

Neuroprotective effects of bis (7) -tacrine in rat model with glaucoma

Jia-Hua Fang^{1,2}, Xiao-Yun Song¹, Rong Hu¹, Jun-Xian Liu¹, Yin-E Xu¹

Foundation items: Natural Science Foundation of Hunan Province (No.2017JJ2287); Natural Science Foundation of Hubei Province (No.2014CFA065)

¹Department of Ophthalmology, the First Hospital of Changsha, Changsha 410005, Hunan Province, China; ²Department of

Ophthalmology, the First People's Hospital of Jingzhou, Jingzhou 434000, Hubei Province, China

Correspondence to: Jia-Hua Fang. Department of Ophthalmology, the First Hospital of Changsha, Changsha 410005, Hunan Province, China; Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Jingzhou, Jingzhou 434000, Hubei Province, China. nmhuman@163.com

Received: 2019-09-16 Accepted: 2020-05-09

Abstract

• AIM: To assess the neuroprotective effect of bis (7) -tacrine in experimental Sprague - Dawley (SD) rat glaucoma.

• METHODS: Totally 24 rats were randomly divided into control group, operated group, 0.5mg/kg bis (7) -tacrine group and 5mg/kg memantine group. Unilateral elevation of intraocular pressure (IOP) was produced by hypertonic saline injection into an episcleral vein. Animals were orally dosed daily with bis (7) -tacrine or memantine. IOP was measured in both eyes of animals per 3d, and the number of retinal ganglion cells and the thickness of nerve fiber layer axon bundle were measured at 5wk.

• RESULTS: Elevated IOP were induced in 3 glaucoma groups. Compared with control group, the retinal ganglion cells decreased from 119.50±8.26 to 79.83±9.58 and the thickness of axon bundle come down from 13.40±0.60 μm to 6.64±0.50 μm in operated group. However the number of the retinal ganglion cells was 109.00±7.04 in bis (7) -tacrine group and 107.33±8.57 in memantine group individually. The thickness of axon bundle was 12.26±0.78 μm in bis (7) -tacrine group and 10.13±1.19 μm in memantine group individually.

• CONCLUSION: Both bis (7) -tacrine and memantine inhibited retinal ganglion cells loss, but only bis (7) -tacrine decreased the thickness declining of axon bundle.

• KEYWORDS: Bis (7) -tacrine; Memantine; rat; glaucoma; neuroprotection

Citation: Fang JH, Song XY, Hu R, et al. Neuroprotective effects of bis (7) -tacrine in rat model with glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(6):956-959

0 引言

青光眼是一种不可逆致盲性眼病,可导致视神经萎缩甚至失明,视网膜神经节细胞是受损的主要靶细胞,其轴突组成视神经。目前针对青光眼的主要治疗方法是降低眼压。但是,有研究显示,即使患者眼压降低到正常范围内,视神经损害仍然继续发展,因此需要给予神经保护治

疗^[1]。相对于单一靶点药物,多靶点药物具有更好的神经保护作用。双七他克林是一种人工合成的多靶点药物,具有抑制胆碱酯酶、N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid,NMDA)受体、一氧化氮合酶、钙通道等多种药理作用^[2]。前期实验结果显示,双七他克林通过抑制NMDA受体抑制谷氨酸引起的视网膜神经节细胞损伤^[3-4],体内实验证实双七他克林对大鼠视网膜缺血再灌注损伤具有保护作用^[5]。美金刚胺是一种NMDA受体抑制剂,在美国已进入青光眼视神经保护的Ⅲ期临床试验,但评估试验结束后被停止进入Ⅳ期临床试验,尚未应用于临床^[6]。本研究通过制作青光眼大鼠动物模型,观察双七他克林的视神经保护作用,并与美金刚胺进行对比。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:成年健康雄性SD大鼠24只,出生12wk,体质量280~320g,购于湖南斯莱克景达实验有限公司(合格证号:1107271911002941),饲养温度18℃~25℃,湿度40%~70%。主要试剂:双七他克林购自Cayman公司,美金刚胺购自Sigma公司,鼠源性Brn3a一抗购自Millipore公司,鼠源性βⅢ-tubulin一抗购自Covance公司,羊抗鼠二抗(含488nm或546nm荧光探针),Triton X-100购自Dow公司。主要仪器设备:冰冻切片机(Leica,CM1950),荧光显微镜(Leica,AF6000)。动物实验通过长沙市第一医院伦理委员会审查。

1.2 方法

1.2.1 大鼠青光眼模型的制作 将24只SD大鼠随机分为4组,即对照组、手术组、双七他克林组和美金刚胺组,每组各6只。配置浓度为1.75mol/L的高渗氯化钠溶液,用孔径0.22μm的过滤器过滤后备用。手术组、双七他克林组和美金刚胺组大鼠采用10%水合氯醛腹腔麻醉,暴露右眼上巩膜静脉,在解剖显微镜下,用33G注射针插入到右眼上巩膜静脉,使用Hamilton微量注射器缓慢注射高渗氯化钠溶液50μL,仅注射1次。模型制作后检测眼压,清醒状态下,结膜囊点奥布卡因滴眼液表面麻醉后使用TonoPen眼压计测量眼压,每3d测量1次,若眼压≥28mmHg,右眼眼压比左眼高5mmHg,则视为模型制作成功^[6]。对照组大鼠右眼仅进行上巩膜静脉穿刺,不注射高渗氯化钠溶液。

1.2.2 给药方式 造模后,对照组和手术组大鼠给予正常饮水,双七他克林组和美金刚胺组大鼠饮用水中每天分别添加0.5mg/kg双七他克林和5mg/kg美金刚胺,持续5wk。

1.2.3 免疫荧光染色 造模后5wk,10%水合氯醛腹腔注射深度麻醉大鼠,采用4%多聚甲醛进行心脏灌注,摘除右侧眼球,分离角膜并将其放置在4%多聚甲醛中过夜,然后用10%、20%、30%蔗糖梯度脱水,包埋剂包埋后放入-80℃冰箱保存。用冰冻切片机制作经过视神经的切片,厚度5μm,每个眼球选取3张连续切片使用Brn3a抗体对视网膜神经节细胞染色,βⅢ-tubulin抗体对视网膜神经节细胞的轴突进行染色。PBS漂洗3次,5%山羊血清(含0.2% Triton X-100)封闭1h。在4℃环境下,用Brn3a/βⅢ-tubulin一抗(稀释比例1:100)孵育24h。然后PBS漂洗3次,加入含DAPI的荧光二抗(稀释比例1:100),在4℃环境下孵育24h。PBS漂洗3次,甘油封片。在荧光显微镜下观察拍照,对从一侧锯齿缘经过视神经到另一侧锯

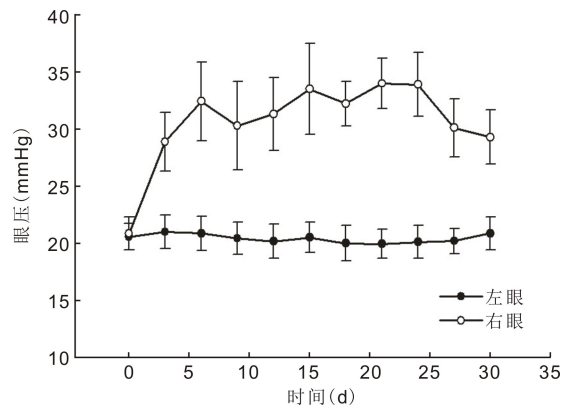


图1 青光眼模型大鼠的眼压情况。

齿缘的所有Brn3a染色阳性细胞进行计数,选取离视神经200μm的βⅢ-tubulin染色阳性视网膜神经节细胞的轴突,用Image J软件测量其厚度。

统计学分析:采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资料采用均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,若存在差异,则使用Dunnett-t检验进行对照组与其他三组的比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青光眼模型大鼠的眼压情况 制作青光眼模型后,模型大鼠右眼眼压均升高,造模3d后达到 28.92 ± 2.55 mmHg,6d后达到 32.45 ± 3.66 mmHg。造模后每3d检测一次眼压,连续监测1mo,模型大鼠右眼眼压均值均维持在28mmHg以上,且均比对侧眼眼压(20.34 ± 0.31 mmHg)高5mmHg及以上(图1),模型制作成功。

2.2 青光眼模型大鼠视网膜神经节细胞情况 免疫荧光染色结果显示(图2A),视网膜神经节细胞层(GCL)、内核层(INL)、外核层(ONL)细胞核DAPI染色均呈阳性(蓝色)。在GCL层可见两种细胞,其中Brn3a染色阳性和DAPI染色阳性的细胞(黄色)为视网膜神经节细胞。对照组、手术组、双七他克林组、美金刚胺组大鼠右眼从一侧锯齿缘经过视神经到另一侧锯齿缘的视网膜神经节细胞数分别为 119.50 ± 8.26 、 79.83 ± 9.58 、 109.00 ± 7.04 、 107.33 ± 8.57 个,差异有统计学意义($F = 24.31, P < 0.01$,图2B),其中手术组大鼠右眼视网膜神经节细胞数显著少于对照组,差异有统计学意义($P = 0.001$),双七他克林组和美金刚胺组大鼠右眼视网膜神经节细胞数亦少于对照组,但差异均无统计学意义($P = 0.106, 0.054$),表明双七他克林和美金刚胺能够抑制青光眼所致的视网膜神经节细胞减少。

2.3 青光眼模型大鼠视网膜神经纤维层厚度情况 免疫荧光染色结果显示(图3A),在GCL层相邻的神经纤维层可见βⅢ-tubulin染色阳性的神经纤维(绿色)。对照组、手术组、双七他克林组、美金刚胺组大鼠右眼距离视神经200μm的视网膜神经纤维层厚度分别为 13.40 ± 0.60 、 6.64 ± 0.50 、 12.26 ± 0.78 、 10.13 ± 1.19 μm,差异有统计学意义($F = 80.527, P < 0.01$,图3B),其中手术组和美金刚胺组大鼠右眼视网膜神经纤维层厚度较对照组明显变薄,差异均有统计学意义($P < 0.01$),双七他克林组大鼠右眼视网膜神经纤维层厚度较对照组亦变薄,但差异无统计学意义($P = 0.063$),表明双七他克林能够抑制青光眼所致的视网膜神经纤维层萎缩。

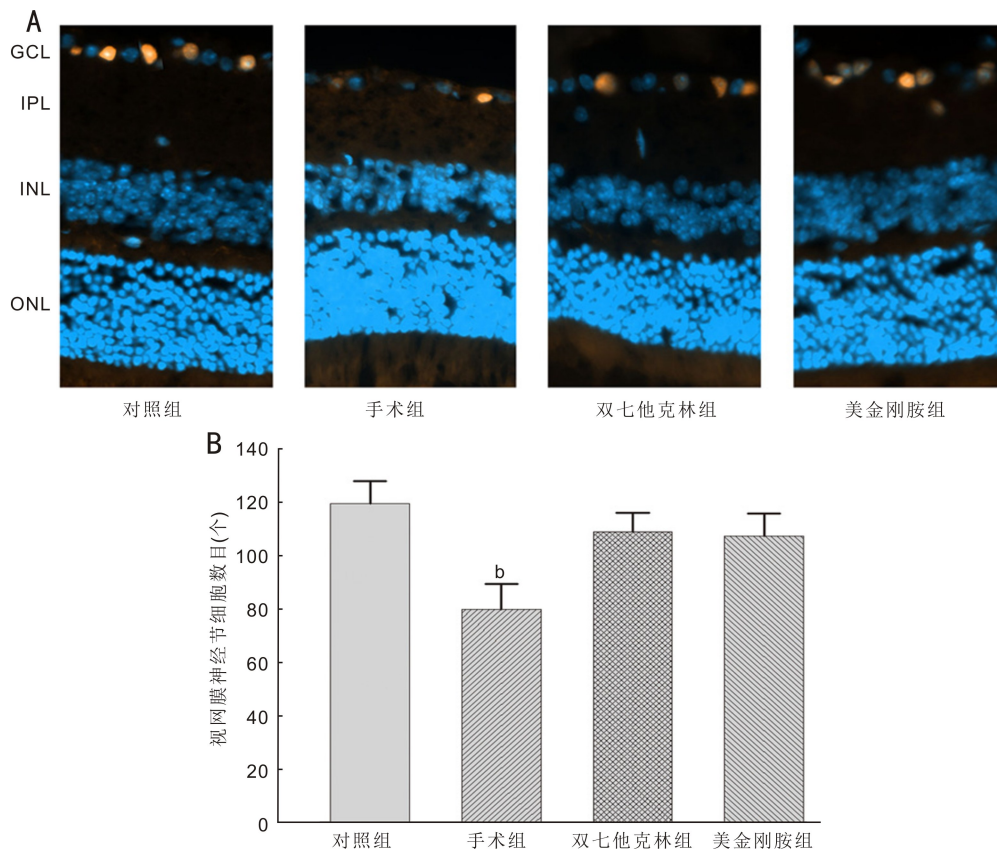


图2 视网膜神经节细胞免疫荧光染色结果 A:距离视神经200 μm 的免疫荧光染色图片($\times 100$)。GCL:节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;ONL:外核层。B:四组大鼠右眼视网膜神经节细胞数目比较。^b $P < 0.01$ vs 对照组。

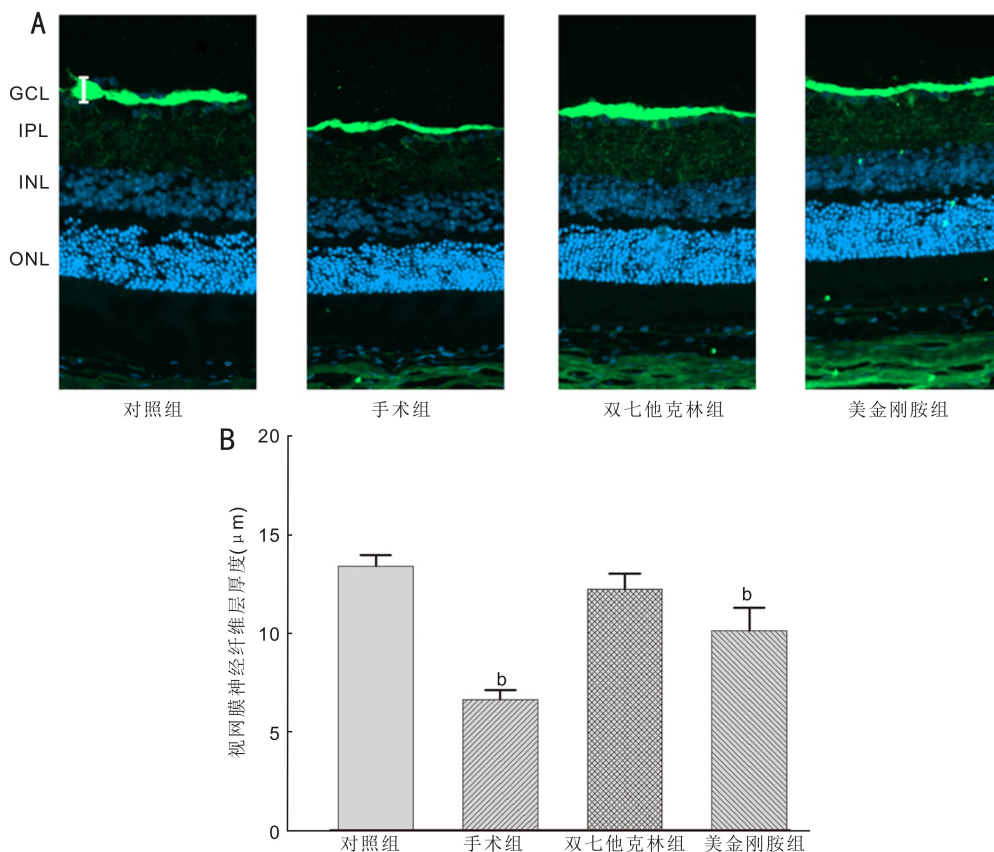


图3 视网膜神经纤维层厚度 A:距离视神经200 μm 的免疫荧光染色图片($\times 100$)。GCL:节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;ONL:外核层。B:四组大鼠右眼视网膜神经纤维层厚度比较。^b $P < 0.01$ vs 对照组。

3 讨论

本研究使用大鼠青光眼模型,在饮用水中加入药物,口服给药,证实多靶点药物双七他克林对视网膜神经节细

胞具有保护作用,可以抑制神经节细胞的数目下降及视网膜神经纤维层变薄,对青光眼模型大鼠具有视神经保护作用。

青光眼造成的视神经损伤是复杂的级联反应,视神经及视网膜组织等受损后,无法通过细胞分裂、增生而代偿凋亡或死亡的神经细胞^[7]。多靶点药物的药理作用可能与神经损伤具有一一对应或多阶段对应关系,其神经保护作用可能比单一靶点药物好^[8]。美金刚胺是 NMDA 受体阻止剂,其在体外实验及青光眼模型猴的实验中对视网膜神经节细胞损伤具有抑制作用,但是在进行到Ⅲ期临床试验时被终止,未应用于临床。

双七他克林是由抗阿尔兹海默症的药物他克林衍生而来,具有多种药理作用。体外实验已经证实双七他克林对谷氨酸诱导的视网膜神经节细胞损伤有抑制作用,在视网膜缺血再灌注实验中,通过荧光金逆行标记视网膜神经节细胞^[3],证实双七他克林可以减少视网膜神经节细胞的凋亡。细胞电生理实验证实,双七他克林可以抑制 NMDA 受体^[4]。本研究在体外实验和急性视网膜缺血性损伤实验后使用慢性青光眼模型研究双七他克林的视神经保护作用,并使用 Brn3a 抗体对视网膜神经节细胞进行染色,Brn3a 在视网膜神经节细胞的细胞核表达^[9]。青光眼时眼压升高,玻璃体谷氨酸浓度增加,激活细胞膜的 NMDA 受体,使大量钙离子内流,激活细胞凋亡酶,引起视网膜神经节细胞凋亡,导致兴奋性损伤。本研究发现,双七他克林和美金刚胺对青光眼大鼠的视网膜神经节细胞数目减少均有抑制作用,可能与抑制 NMDA 受体减少兴奋性损伤有关。此外,双七他克林的视神经保护作用可能还与抑制一氧化氮合酶等药理机制有关。

视网膜神经节细胞的轴突向眼球后极部汇聚,组成视神经,高血压使视网膜神经节细胞死亡,轴突也发生萎缩,最终导致视神经萎缩。 β III-tubulin 是视网膜神经节细胞轴突的特异性染色剂^[10],越近视神经,轴突厚度越厚。本实验测定了离视神经 200 μ m 距离的神经纤维层厚度,结果显示双七他克林可以抑制神经纤维层的萎缩,这与双七他克林抑制视网膜神经节细胞数目减少的结果一致。

综上所述,本研究通过构建大鼠青光眼模型证实,双七他克林可以抑制青光眼所致视网膜神经节细胞的数目下降及视网膜神经纤维层变薄,对视神经具有保护作用,这对临床治疗青光眼具有潜在意义。

参考文献

- 1 Sena DF, Lindsley K. Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 1: CD006539
- 2 Li W, Mak M, Jiang H, et al. Novel anti-Alzheimer's Dimer Bis(7)-cognitin: cellular and molecular mechanisms of neuroprotection through multiple targets. *Neurotherapeutics* 2009; 6(1): 187-201
- 3 Fang JH, Wang XH, Xu ZR, et al. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage. *BMC Neurosci* 2010; 11: 31
- 4 Zhang ZH, Liu YW, Jiang FG, et al. Bis(7)-tacrine protects retinal ganglion cells against excitotoxicity via NMDA receptor inhibition. *Int J Ophthalmol* 2011; 4(2): 125-130
- 5 Li JB, Lu ZG, Xu L, et al. Neuroprotective Effects of Bis(7)-tacrine in a Rat Model of Pressure-Induced Retinal Ischemia. *Cell Biochem Biophys* 2014; 68(2): 275-282
- 6 Samsel PA, Kisiswa L, Erichsen JT, et al. A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(2): 1671-1675
- 7 海鸥, 郭莉, 郭春霞, 等. 光学相干断层扫描技术在原发性开角型青光眼早期诊断中的应用. *国际眼科杂志* 2018; 18(5): 909-911
- 8 Romero A, Marco-Contelles J, Ramos E. Highlights of ASS234: a novel and promising therapeutic agent for Alzheimer's disease therapy. *Neural Regen Res* 2020; 15(1): 30-35
- 9 Harper MM, Woll AW, Evans LP, et al. Blast Preconditioning Protects Retinal Ganglion Cells and Reveals Targets for Prevention of Neurodegeneration Following Blast-Mediated Traumatic Brain Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019; 60(13): 4159-4170
- 10 Pattamatta U, McPherson Z, White A. A mouse retinal explant model for use in studying neuroprotection in glaucoma. *Exp Eye Res* 2016; 151: 38-44