

中药青光安对急性高眼压兔视网膜组织结构及细胞凋亡的影响

东长霞^{1,2}, 彭俊³, 彭清华¹, 曾志成^{1,4}

基金项目: 中国湖南省教育厅科研基金重点资助项目 (No. 06A052); 中国湖南省卫生厅科研基金资助项目 (No. 204084)

作者单位: ¹(410007) 中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院眼科学重点学科; ²(264000) 中国山东省烟台市, 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院眼科; ³(421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学医学院; ⁴(424400) 中国湖南省桂阳县人民医院眼科

作者简介: 东长霞, 女, 中西医结合眼科硕士, 现就职于青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院眼科, 研究方向: 眼底病、青光眼。

通讯作者: 彭清华, 男, 教授, 主任医师, 博士, 博士生导师, 1999年获教育部全国高等院校青年教师奖, 2000年获湖南省人民政府优秀博士学位论文奖, 2001年获上海颜德馨中医药人才奖, 2005年获湖南省青年科技奖, 2003年度卫生部有突出贡献中青年专家, 第二届全国百名杰出青年中医, 2008年入选湖南省121人才工程第一层次, 2002年享受国务院政府特殊津贴, 兼中国中西医结合学会眼科专业委员会副主任委员、世界中医药学会联合会眼科分会常务理事、中华中医药学会眼科分会常务委员、湖南省中西医结合眼科专业委员会主任委员, 主要从事中西医结合防治眼底病、青光眼和眼表疾病的研究。pqhz_520@163.com

收稿日期: 2009-10-08 修回日期: 2009-12-21

Effects of qingguangan on retinal structure and apoptosis in rabbit eyes with acute ocular hypertension

Chang-Xia Dong^{1,2}, Jun Peng³, Qing-Hua Peng¹, Zhi-Cheng Zeng^{1,4}

Foundation items: Science Research Foundation Key Project of Education Office of Hunan Province, China (No. 06A052); Science Research Foundation Project of Health Office of Hunan Province, China (No. 204084)

¹Key Discipline of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China; ²Department of Ophthalmology, Yantai Yuhuangding Hospital, Affiliated hospital of Medical College of Qingdao University, Yantai 264000, Shandong Province, China; ³Medical School NanHua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ⁴Department of Ophthalmology Guiyang County People's Hospital, Guiyang 424400, Hunan Province, China

Correspondence to: Qing-Hua Peng. Key Discipline of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. pqhz_520@163.com

Received: 2009-10-08 Accepted: 2009-12-21

Abstract

• **AIM:** To explore the effects of qingguangan on retinal structure and apoptosis in rabbit eyes with acute ocular hypertension.

• **METHODS:** Forty-nine rabbits were divided into 7 groups randomly, 7 rabbits in each group. Group A₁ and A₂ belonged to qing-guangan group. Group B₁ and B₂ belonged to eyesight-improving bolus of noble dendrobium group. C₁ and C₂ were model group. Group D was blank control group. After administrated qingguangan intragastrically for one week rabbits were filled normal saline into anterior chamber to make acute ocular hypertension model. Then after rabbits were administrated qingguangan intragastrically for one week and two weeks all were killed. Retinal structure changes were observed in light microscope and transmission electron microscope, while apoptosis was observed in light microscope.

• **RESULTS:** Retinal structures were not different in one week and two weeks. Layers of the retina model group and eyesight-improving bolus of noble dendrobium group were disorder and cell numbers decreased. The number of apoptotic bodies of two groups were more than those of qingguangan group. Ganglion nuclear membrane of two groups were less clear. Most of mitochondria were swelling and there was condensation phenomenon, rough endoplasmic reticulum dilation. But changes above mentioned in qingguangan group were not obvious.

• **CONCLUSION:** Qingguangan has the effects of protecting retinal structure and reducing apoptosis.

• **KEYWORDS:** qingguangan granule; method of benefiting qi and activating blood and diuresis; acute ocular hypertension model; retinal structure; apoptosis

Dong CX, Peng J, Peng QH, *et al.* Effects of qingguangan on retinal structure and apoptosis in rabbit eyes with acute ocular hypertension.

Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi) 2010;10(1):51-54

摘要

目的: 探讨中药青光安对兔实验性急性高眼压后视网膜组织结构及细胞凋亡的影响。

方法: 将49只家兔随机分为7组, 每组7只。其中A₁和A₂为青光安组; B₁和B₂为石斛夜光丸组; C₁和C₂为模型组; D组为空白对照组。青光安连续灌胃1wk后用前房内灌注生理盐水法制成急性高眼压模型。再连续灌胃1wk和2wk处死动物, 用光镜和透射电镜观察视网膜超微结构的变化, 光镜观察视网膜细胞凋亡情况。

结果: 1wk和2wk视网膜组织结构差别不大。模型组和石

斛夜光丸组视网膜各层结构紊乱,细胞数量不同程度减少,其凋亡小体数量明显多于青光安组,A组与B,C组比较,差异有非常显著统计学意义($P < 0.01$)。模型组和石斛夜光丸组的神经节细胞核膜欠清,大多数线粒体肿胀,有固缩现象,粗面内质网扩张;青光安组上述改变不明显。**结论:**青光安具有保护视网膜组织结构,减少细胞凋亡的作用。

关键词:青光安颗粒剂;益气活血利水法;急性高血压模型;视网膜组织结构;细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.01.015

东长霞,彭俊,彭清华,等. 中药青光安对急性高血压兔视网膜组织结构及细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志 2010;10(1):51-54

0 引言

青光眼视功能损害的病理基础是视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)及其纤维的变性、萎缩和丧失,能量代谢障碍和自由基及其代谢产物都是青光眼视功能损害的相关因素,青光眼 RGC 的死亡方式是凋亡^[1,2]。青光眼治疗最终目的是阻止视神经的损害,保护视功能。因此青光眼的理想治疗是既能降低眼压,增加局部血流量,又可预防视网膜神经节细胞的凋亡以及促进损伤的轴突再生。目前,通过手术或药物可成功地控制眼内压,但在青光眼视网膜神经节细胞的保护与再生治疗方面,目前尚无比较公认的有效治疗方法。我们探讨具有益气活血利水功效的中药复方——青光安颗粒剂对实验性急性高血压模型兔视网膜组织结构及细胞凋亡的治疗作用及其机制如下。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年中国大白兔 49 只,雌雄各半,体质量 2.0~2.5kg,无眼部疾病。医动字号:20-003,由湖南中医药大学动物实验中心提供。造模前,Schoitz 眼压计测量眼压 1.60~2.40kPa。青光安颗粒剂(由黄芪、茯苓、白术、地龙、红花、赤芍等益气活血利水中药按现代制剂工艺制成),由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供,使用时研粉末,用温开水配制成 250g/L 混悬液。石斛夜光丸,由浙江天一堂药业公司提供,使用时研粉末,用温开水配制成 120g/L 混悬液。原位细胞凋亡检测试剂盒,由华美生物工程公司提供。Schiotz 眼压计,由苏州医疗器械厂生产;H-600 透射电镜,由中南大学湘雅医学院电镜室提供;恒温水浴箱、玻璃匀浆器、加液枪,由湖南中医药大学分子生物学实验室提供;光学显微镜、显微摄像机,由湖南中医药大学微生物组织学教研室提供。

1.2 方法 取家兔 49 只,随机分为 7 组,每组 7 只。其中 A₁ 和 A₂ 组为青光安组,用青光安颗粒剂的混悬液 2.5g/kg 灌胃;B₁ 和 B₂ 为石斛组,用石斛夜光丸的混悬液 1.2g/kg 灌胃;C₁ 和 C₂ 为模型组,用相当量的蒸馏水灌胃;D 为空白对照组。药物剂量是按照人与动物体表面积等效剂量比率表计算,以成人临床常用剂量的 2 倍给药,1 次/d。灌胃并用 2.5g/L 氯霉素滴眼液滴眼,1wk 后参照赵桂秋等^[3]的方法造模。造模后每天灌胃,并点眼药各 1 次。A₁,B₁ 和 C₁ 于术后 1wk 用空气栓塞法处死,其余 4 组于术后 2wk 用空气栓塞法处死。处死后即刻在冰上摘取眼球(1 个

表 1 急性高血压后兔视网膜 TUNEL 阳性细胞数

($n = 14, \bar{x} \pm s, n/10HP$)

分组	1wk	2wk
青光安组	1.47 ± 0.87 (A ₁)	1.33 ± 0.82 (A ₂)
石斛夜光丸组	4.40 ± 0.76 ^b (B ₁)	4.40 ± 0.60 ^b (B ₂)
模型组	15.73 ± 0.90 ^b (C ₁)	14.67 ± 0.82 ^{a,b} (C ₂)

^a $P < 0.05$ vs 1wk; ^b $P < 0.01$ vs 青光安组。

眼球为 1 份标本),在冰环境中环角膜缘切开,弃去眼前节、晶状体和玻璃体,外翻眼球壁。将眼球壁沿矢状轴一分为二剪开,鼻侧 1/2 用 40g/L 多聚甲醛固定,作 HE 染色和 TUNEL 染色观察;颞侧 1/2 用 25g/L 戊二醛和 10g/L 锇酸双固定,作电镜观察。将鼻侧固定的眼球壁按原位细胞凋亡检测的步骤依次灭活、消化修复、标记、显色,最后苏木素复染。常规封片后光镜观察视网膜 TUNEL 阳性细胞并计数。每一切片被标记的细胞约计数 15 个高倍镜视野,然后以每 10 个高倍镜下被标记的平均细胞数来表示。将 25g/L 戊二醛固定的眼球壁标本作电镜送检。10g/L 锇酸后固定 1h,梯度丙酮脱水,EPON-812 环氧树脂浸泡,包埋,切成超薄片,醋酸双氧铀柠檬酸铅电子染色后做透射电镜观察。

统计学分析:所有数据均输入微机,采用 SPSS 13.0 统计软件包处理,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示;计量资料进行方差齐性检验后,方差齐者两两比较用 q 检验,方差不齐者用秩和检验。

2 结果

2.1 急性高血压后兔外眼变化情况 造模时 A, B, C 3 组模型眼均呈现眼球变硬,瞳孔散大,球结膜水肿、充血,角膜水肿、雾状混浊的变化。球结膜水肿、充血在 4~5d 内消失,角膜水肿均于次日消失。D 组眼球未发现明显变化。

2.2 病理学变化 急性高血压后 2wk 各组视网膜的结构形态要比 1wk 时要好,但差别不大。空白对照组视网膜结构完整,层次清楚,细胞排列紧密,无空泡。青光安组视网膜结构完整,层次清楚,细胞数量也有不同程度减少和空泡样变, A₂ 和 A₁ 组差别不大(图 1A)。石斛夜光丸组较青光安组视网膜结构差,层次欠清,细胞数量有较多减少和空泡样变, B₂ 和 B₁ 组差别不大(图 1B)。模型组视网膜各层结构紊乱,层次不清。视网膜各层细胞尤其是节细胞数量锐减,细胞排列疏松,可见大量水泡和变性组织。C₂ 与 C₁ 组差别不大(图 1C)。

2.3 细胞凋亡检测 空白对照组视网膜结构完整,三层细胞层次清楚;未发现明显呈棕黄色的 TUNEL 阳性细胞。青光安组仅极个别眼球发现视网膜细胞呈均匀的淡染色,未发现明显的 TUNEL 阳性细胞(图 2A)。石斛夜光丸治疗组可发现较多 TUNEL 阳性细胞(图 2B)。模型组视网膜各层细胞(外核层、内核层、神经节细胞层)均可见较多的 TUNEL 阳性细胞,尤其以外核层较多(图 2C)。C₂ 与 C₁ 组相比, TUNEL 阳性细胞数有所减少,差异具有显著性($P < 0.05$, 表 1); A₂ 与 A₁ 组相比, B₂ 与 B₁ 组相比, TUNEL 阳性细胞数差别无统计学意义;同一试验点,模型组与石斛夜光丸治疗组的 TUNEL 阳性细胞数均明显高于

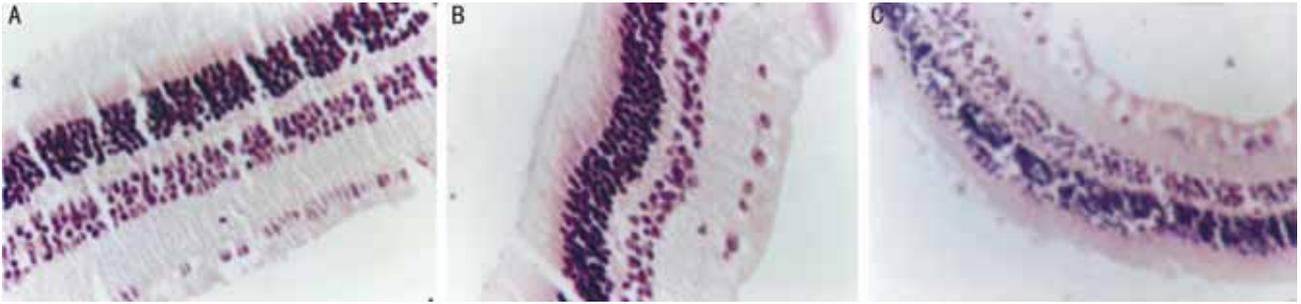


图1 兔视网膜结构(HE ×400) A:青光安组;B:石斛夜光丸组;C:模型组。

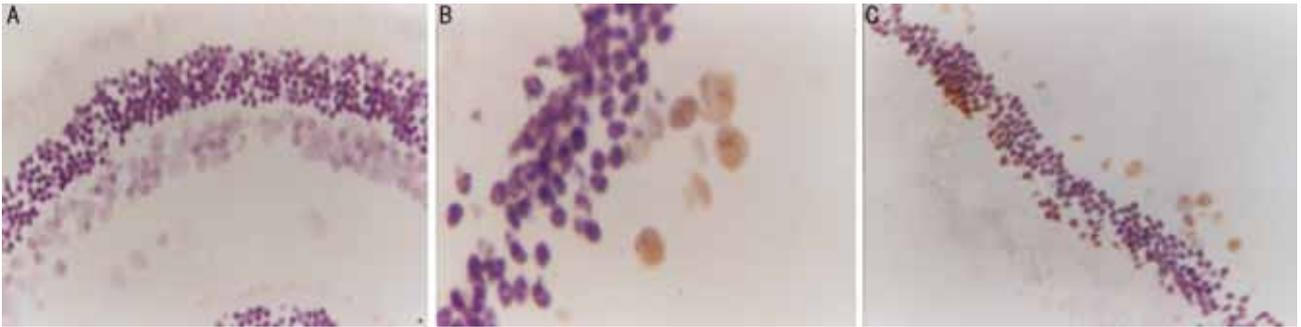


图2 兔视网膜细胞凋亡(TUNEL ×400) A:青光安组;B:石斛夜光丸组;C:模型组。

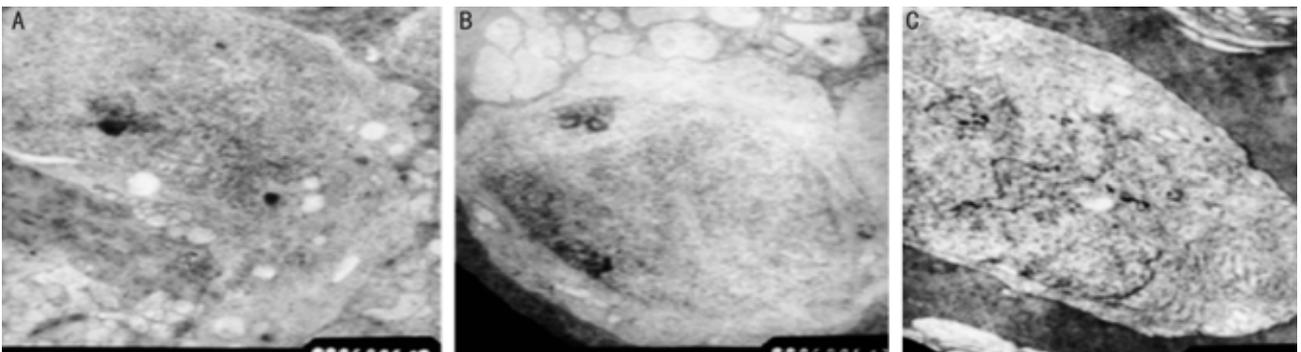


图3 兔视网膜超微结构变化(TEM ×10000) A:青光安组;B:石斛夜光丸组;C:模型组。

青光安组($P < 0.01$)。说明与石斛夜光丸相比,青光安组具有明显的保护视网膜的作用。

2.4 超微结构变化 空白对照组神经节细胞呈圆形或卵圆形,核膜清晰,染色质分布均匀,核仁明显。线粒体、粗面内质网丰富,结构正常;双极细胞超微结构正常。A₁和A₂组差别不大,大多数神经节细胞呈卵圆形或圆形,核膜欠清,染色质分布均匀,核仁明显。大多数线粒体嵴清晰,粗面内质网基本正常;双极细胞核膜欠清,线粒体改变不明显(图3A)。B₁和B₂组神经节细胞结构较模糊,核膜不清晰,整个细胞电子密度略有增高,线粒体轻微固缩,粗面内质网基本正常。模型组大多数神经节细胞核膜不清晰,部分细胞核扭曲,线粒体肿胀,嵴消失。双极细胞内线粒体肿胀,嵴消失,空泡样变,粗面内质网轻微扩张(图3B,C)。

3 讨论

青光眼属中医眼科“五风内障”范畴。研究表明,原发性青光眼的发病机制是气血失和、脉络瘀滞、神水淤积于眼内导致精气不能升运于目,神光不得发越,即存在“血瘀水停”的发病机制^[4,5]。原发性青光眼患者术后“血瘀水停”的病理改变不会马上消失;青光眼患者视乳头颜色变淡或苍白是气阴两虚,目系失养所致;手术本身就是一种创伤,损伤脉络导致气血阴亏虚更甚。因此,青光眼患者术后的综合病理是气阴两虚、脉络淤滞、玄府闭塞、神

水瘀积。在治疗上宜益气养阴、活血利水,以开通玄府,畅达精气,使目系得以濡养,神光得以发越。在古方补阳还五汤的基础上加减创立了治疗青光眼的纯中药制剂——青光安颗粒剂。方中选用黄芪大补脾胃之元气,令气旺血行,瘀去络通;白术健脾益气、利水;赤芍、红花活血祛瘀,佐以地龙活血通络;车前子、茯苓配伍生地使其利而不伤阴。本方补气药与活血药相配,使气旺则血行,以奏益气活血利水而不伤正之功。青光安颗粒剂的前期实验研究表明,与丹参组相比,青光安颗粒剂能明显减少兔高眼压术后结膜下成纤维细胞的增殖和瘢痕的形成,维持滤过泡的基本形态,从而保持其正常的滤过功能,有效的预防青光眼术后眼压的回升^[6];增加急性高眼压后大鼠视网膜细胞色素氧化酶活性节细胞密度,提高CO活性节细胞的活性^[7]和加压后人眼小梁细胞的活性^[8]、抑制加压后人小梁细胞的凋亡^[9],能加速急性高眼压状态后视网膜组织中NO及谷氨酸的清除,对视神经轴突、视网膜神经节细胞和筛板组织结构有保护性作用^[10,11]。临床研究证实:青光安颗粒剂能改善患者的血液流变学,提高血管内皮细胞活性,降低血小板活化功能,降低血浆ET-1(内皮素-1)、血栓素、前列腺素的含量,改善眼部血液循环,从而能明显提高青光眼术后患者的视力,扩大视野,预防高眼压的产生^[12]。

原发性青光眼是由于眼内压超过了眼球内部组织,特别是视神经所能承受的限度,导致视网膜、视神经损伤的一种眼病。其视功能损害的机制至今仍不十分明确,多数学者认为;青光眼是一种多因素共同参与的视神经病变。研究证实:青光眼机械压迫导致的轴浆运输阻滞、多种营养因子缺乏、缺血缺氧及再灌注损伤导致的能量代谢障碍、自由基代谢紊乱和兴奋性氨基酸的增高都是导致视功能损伤的相关因素^[3,13]。青光眼的病理改变基础是视网膜神经节细胞的缺失,其 RGC 的死亡方式是凋亡。这种有选择性的细胞死亡是否由于高血压后视网膜缺血或者其它机制造成的,目前仍有争论。有研究表明,细胞凋亡可见于 60, 120min 以上的视网膜缺血重新灌注性损伤^[14,15]。本实验急性高眼压后,模型组视网膜各层结构紊乱,层次不清;各层细胞尤其是节细胞数量锐减,细胞排列疏松,可见大量水泡和变性组织;其大多数神经节细胞核膜不清,染色质分布不均匀,较多细胞核线粒体肿胀,嵴消失。双极细胞内线粒体肿胀,嵴消失,空泡样变,粗面内质网轻微扩张;可发现明显的呈棕黄色 TUNEL 阳性细胞。青光安组视网膜细胞层次清楚,形态结构较正常,数量仅有少量减少;其神经节细胞大多呈卵圆形或圆形,染色质均匀,核仁明显,线粒体嵴清晰,内质网基本正常,双极细胞核膜清晰,线粒体正常;仅个别眼球发现视网膜细胞呈均匀的淡染色,未发现明显的 TUNEL 阳性细胞。本实验表明,细胞凋亡可发于视网膜的外核层,内核层及节细胞层,尤以外核层最多。青光安颗粒剂可以有效的保护视网膜组织,维持其细胞的形态结构正常,减少视网膜神经节细胞的凋亡。

参考文献

1 Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR. Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with

glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1989;107(5):453-464
2 Burke BW. Selective block of Y optic nerve fibers in the cat and the occurrence of inhibition in the lateral geniculate nucleus. *J Physiol* 1985; 364: 81-92
3 赵桂秋,孙为荣,杨湘娟,等.急性高眼压状态视网膜自由基损伤的动物实验. *中华眼科杂志* 1993;29(5):293-295
4 彭清华,朱文锋,罗萍.原发性闭角型青光眼血瘀水停的病理研究. *湖南中医药导报* 2000;6(9):16-18
5 彭清华,喻京生,陈艳芳,等.眼科围手术期的中医药治疗. *中国中医眼科杂志* 2009;19(3):172-175
6 罗萍,彭清华,李波,等.青光安颗粒剂对慢性高血压兔眼滤过性手术后作用的实验研究. *中国中西医结合杂志(基础理论研究专辑)* 2000;7(2):121-122
7 彭清华,罗萍,李波,等.青光安颗粒剂对实验性高血压大鼠视网膜节细胞代谢作用的研究. *湖南中医学院学报* 1997;17(2):53-55
8 彭清华,曾志成,李波,等.青光安颗粒含药血清对加压后人小梁细胞活性的影响. *国际眼科杂志* 2009;9(5):839-842
9 曾志成,彭清华,李波,等.中药青光安含药血清对体外加压后人小梁细胞凋亡的影响机制. *国际眼科杂志* 2009;9(6):1046-1049
10 赵海滨,彭清华,吴权龙,等.中药青光安对兔急性高血压视神经轴突保护作用的研究. *国际眼科杂志* 2009;9(12):2318-2321
11 李晓静,彭清华,曾志成,等.复方中药青光安对兔慢性高血压筛板结构及IV型胶原纤维含量的影响. *国际眼科杂志* 2009;9(12):2310-2314
12 彭清华,李建超.青光安治疗抗青光眼术后患者临床研究. *湖南中医学院学报* 2004;24(2):36-39
13 Nickells RW. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why and the maybe. *J Glaucoma* 1996;5(5):345-356
14 Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta A, et al. Retinal ischemia leads to apoptosis which is ameliorated by aurintricarboxylic acid. *Vision Res* 1997;37(24):3445-3451
15 Kuroiwa S, Katai N, Shibuki H, et al. Expression of cycle-related genes in clyng cells in retinal ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(3):610-617