

米诺环素对急性视神经炎大鼠视网膜神经节细胞的保护作用

张 静¹, 李平华²

作者单位:¹(637000)中国四川省南充市,川北医学院附属医院眼科;²(400016)中国重庆市,重庆医科大学附属第一医院眼科
作者简介:张静,硕士,研究方向:白内障、青光眼、视神经疾病。
通讯作者:李平华,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:白内障、青光眼。 azhang777@yahoo.com.cn
收稿日期:2010-10-13 修回日期:2010-12-10

Effects of minocycline on retinal ganglion cell of experimental optic neuritis in rats

Jing Zhang¹, Ping-Hua Li²

¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China;

²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Ping-Hua Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. azhang777@yahoo.com.cn

Received: 2010-10-13 Accepted: 2010-12-10

Abstract

• AIM: To investigate the effect of minocycline on retinal ganglion cells (RGCs) of experimental optic neuritis in Wistar rats.

• METHODS: Twenty-two female experimental Wistar rats were assigned to two groups randomly: normal control group and experimental group. Then the rats of experimental group were assigned to three groups randomly: experimental control group (EAE group), minocycline group, methylprednisolone group (MP group). We observed the pathological changes of optic nerve and retina, detected the apoptosis of RGCs by TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method.

• RESULTS: In EAE group, the optic nerve fibers showed bulb-like degeneration, the axis irregularity swelling, a quantity of inflammatory cell infiltrating under light microscope, the axons showed bulb-like degeneration, myelin sheaths were loose, microtubule and microfilament disappeared under electron microscopy, the animal model we induced showed typical pathological changes of the optic nerve in EAE. Demyelination occurred in the optic nerve. The area percentage of axons: there was very significant difference ($P < 0.01$), when EAE group, minocycline group and MP group compared with normal control group. There was significant difference ($P < 0.05$), when minocycline group and MP group compared with EAE group. There was little apoptosis of RGCs in

normal rats. There was very significant difference ($P < 0.01$), when EAE group, minocycline group and MP group compared with normal control group. There was significant difference ($P < 0.05$), when EAE group and MP group compared with minocycline group, as well as MP group compared with EAE group.

• CONCLUSION: The pathological changes of optic nerve in EAE model are consistent with demyelinated optic neuritis, the EAE animal model can be used for the research of demyelinated optic neuritis. Minocycline can reduce axonal degeneration in demyelinated optic neuritis, which effect is similar with methylprednisolone. Minocycline can inhibit the apoptosis of RGCs that form the axons of optic nerve in demyelinated optic neuritis, but methylprednisolone does not have any effects on the survival of RGCs in demyelinated optic neuritis.

• KEYWORDS: optic neuritis; retinal ganglion cells; minocycline; methylprednisolone

Zhang J, Li PH. Effects of minocycline on retinal ganglion cell of experimental optic neuritis in rats. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):43-45

摘要

目的:探讨米诺环素对大鼠视神经炎视网膜神经节细胞(RGCs)的影响,并与甲基强的松龙比较。

方法:选取22只雌性Wistar大鼠随机分为正常对照组和实验组,实验组又分为实验对照组(EAE组)、米诺环素组、甲基强的松龙组(MP组)。HE染色观察视神经病理改变,TUNEL法检测RGCs凋亡率。

结果:EAE组视神经纤维空泡样变性,轴突不规则肿胀,大量炎性细胞浸润,轴突内空泡样变性,髓鞘松解脱落,微丝微管消失,EAE大鼠视神经病理变化符合脱髓鞘性视神经炎改变。正常大鼠几乎未见RGCs凋亡,EAE组、米诺环素组、MP组较正常组相比,差异均有显著统计学意义($P < 0.01$),EAE组、MP组较米诺环素组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),MP组与EAE组间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:采用豚鼠脊髓匀浆诱导建立大鼠EAE模型,其视神经病理学改变符合脱髓鞘性视神经炎的表现。米诺环素可抑制脱髓鞘性视神经炎RGCs凋亡,而甲基强的松龙对脱髓鞘性视神经炎RGCs无直接保护作用。

关键词:视神经炎;视网膜神经节细胞;米诺环素;甲基强的松龙

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.015

张静,李平华.米诺环素对急性视神经炎大鼠视网膜神经节细胞的保护作用.国际眼科杂志2011;11(1):43-45

0 引言

多发性硬化症 (MS) 是人类中枢神经系统较为常见的自身免疫性疾病,我国以急性 MS 常见,常表现为球后视神经炎,严重影响视力。目前发现,神经元和轴索变性是 MS 和视神经炎的主要病理改变之一,在疾病早期就开始发生,是临床上出现进行性神经功能障碍的主要因素,且可能与病情的严重程度及患者的预后密切相关^[1]。甲基强的松龙是临床上治疗 MS 和视神经炎的经典药物,但临床报道其治疗效果差别很大。最近有实验发现,甲基强的松龙可增加视网膜神经节细胞 (RGCs) 凋亡^[2]。这些发现要求我们寻找一种新的方案阻止神经元及轴突损伤。米诺环素 (minocycline) 是第二代半合成的四环素类广谱抗生素,作为抗生素已成功应用于临床治疗痤疮、性传播疾病及风湿性关节炎等疾患。近年发现米诺环素除具有广谱抗菌活性外,在多种神经疾病模型中显示一定的神经元保护作用^[3,4]。但米诺环素对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 大鼠神经元凋亡有无预防或治疗作用则尚未见报道。我们的实验旨在探讨米诺环素对 EAE 大鼠视神经炎 RGCs 凋亡的影响,并与甲基强的松龙作比较。

1 材料和方法

1.1 材料 米诺环素 (美国 Sigma 公司),减毒百日咳菌苗 (上海生物制品研究所),完全福氏佐剂 (complete freunds adjuvant, CFA, 美国 Sigma 公司),TUNEL 试剂盒 (Roch 公司),豚鼠脊髓生理盐水匀浆 (自备)。雌性 Wistar 大鼠 22 只,6~8 周龄,体质量为 150~200g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法 实验随机分为正常对照组 ($n=5$) 和实验组 ($n=17$),实验组又分为实验对照组 (EAE 组),米诺环素组和甲基强的松龙组 (MP 组),其中 EAE 组 7 只,其余每组各 5 只。EAE 动物模型制备^[5]:用豚鼠脊髓与 CFA 制成的抗原匀浆四足足垫皮下 0.4mL/只,同时后足背皮内注射百日咳疫苗 0.1mL/只。米诺环素组自免疫后第 8d 起每天 ip 米诺环素 45mg/kg,MP 组自免疫后第 8d 起每天 ip 甲基强的松龙 20mg/kg。各组大鼠在免疫后 18d 处死,其中 EAE 组 2 只用于电镜观察视神经超微结构变化,其余大鼠用 40g/L 的多聚甲醛心脏灌注处死,取眼球及球后视神经 4mm 固定于 40g/L 的多聚甲醛中,石蜡包埋切片。视神经 HE 染色观察病理变化,从形态上判定脱髓鞘视神经炎模型建立。TUNEL 法原位检测凋亡细胞:根据试剂盒说明进行。实验中同时设不加原位末端标记反应液的阴性对照。结果判定:阳性细胞为细胞核棕黄色着色。高倍镜 ($\times 400$) 下随机选 5 个视野,计数凋亡的 RGCs 占整个视野 RGCs 的百分率,取 5 个视野的平均值为凋亡指数 (AI)。

统计学分析:应用 SPSS 11.5 统计软件包处理,计量资料数据以均数 \pm 标准差表示,两组间比较采用独立样本的 t 检验,多组之间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视神经病理改变 正常对照组视神经横切面呈类圆形,神经纤维束呈柱形均匀排列,染色均匀,其间有散在的神经胶质细胞,没有炎细胞浸润。EAE 组大鼠轴突变性降解,网状分层形成大量的空泡,淋巴细胞、单核细胞大量浸润,神经纤维变细小,断裂不连续,轴突数目较正常明显减少。EAE 组视神经横切面超微结构见轴突稀疏,排列紊乱,轴突肿胀,细胞器变性,髓鞘分层,呈洋葱皮样改变。

2.2 米诺环素对大鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响 正常大鼠视网膜几乎未见凋亡细胞, AI 为 $0 \pm 0.35\%$ 。EAE 组可见明显 RGCs 凋亡, AI 为 $40.55\% \pm 3.62\%$,与正常组间的差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。米诺环素干预使 RGCs 层的 TUNEL 阳性细胞数减少,其 AI 为 $13.21\% \pm 6.52\%$,与 EAE 组间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。MP 组 RGCs 层的 TUNEL 阳性细胞数明显增多,其 AI 为 $63.42\% \pm 7.83\%$,与米诺环素组和 EAE 组间的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明一定剂量的米诺环素干预能有效阻止 RGCs 凋亡发生,甲基强的松龙可增加 RGCs 凋亡。

3 讨论

本实验采用 Wistar 大鼠建立脱髓鞘性视神经炎动物模型,光镜下显示大鼠视神经大量炎细胞浸润,空泡样变性,轴突不规则肿胀,超微结构显示轴突内空泡样变性,髓鞘松解脱落,微丝微管消失等改变,视神经病理学改变符合脱髓鞘性视神经炎改变,从形态学上证实了由豚鼠脊髓与 CFA 制成的抗原匀浆诱导建立的 EAE 可以作为脱髓鞘性视神经炎的实验模型^[6]。

长期以来一直认为 MS 是以广泛的髓鞘脱失而轴突结构相对保存为特征的原发性脱髓鞘病变,MS 一系列症状的产生和髓鞘缺失有关。国外学者证实 MS 急性和慢性病灶中均存在轴突横断、丧失及神经元丢失等非脱髓鞘性病变。已有研究证明,在 MS 的早期就出现了轴突及神经元损伤,并且这种损害可能是临床上出现不可逆性神经功能障碍的主要因素,与病情的严重程度及患者的预后密切相关^[1]。因此,临床治疗中更应该重视对神经元的保护作用。

米诺环素 (化学名:二甲胺四环素) 是一种半合成的第二代四环素类抗生素,临床上主要用于痤疮、性传播疾病及风湿性关节炎的治疗。近年发现,米诺环素较其它四环素类药物具有较高亲脂性,容易透过血-脑屏障到达 CNS。动物模型研究表明,米诺环素在脑中可以达到 50% 的血药峰浓度,因而在许多神经系统疾病模型中均显示有一定的神经元保护作用^[3,4]。我们的实验结果发现,米诺环素组大鼠 RGCs 的 AI 较 EAE 组有显著减少,并初步证实了米诺环素对脱髓鞘性视神经炎的神经元保护作用。但是我们对米诺环素的作用还是一个初步探索,未探讨米诺环素对视神经炎神经功能方面的作用,且远期作用效果尚不清楚。

甲基强的松龙是治疗 MS 和视神经炎的经典药物,虽然很多文献报道大剂量甲基强的松龙冲击疗法对于视神经炎有较好疗效,但许多有经验的临床医生发现,即使采用这种疗法,还是有许多患者预后很差,甚至视力丧失。因此,我们的实验选用甲基强的松龙作为对照,比较米诺环素和甲基强的松龙对脱髓鞘性视神经炎的作用,发现 MP 组 RGCs 的 AI 较 EAE 组及米诺环素组均有显著增加,提示甲基强的松龙不但不能减少脱髓鞘性视神经炎 RGCs 凋亡,甚至可能增加 RGCs 细胞凋亡。在 MS 和脱髓鞘性视神经炎急性期,炎性细胞浸润和髓鞘脱失是导致轴突及神经元损伤的主要原因,但轴突及神经元损伤从疾病早期开始发生,就一直贯穿于疾病全程,即使在炎症和脱髓鞘处于静止时仍然存在,当这种损伤达到一定阈值,超出神经系统的代偿能力时,就会出现不可逆的神经功能缺失,最终导致进展性的神经功能缺失。甲基强的松龙具有强抗炎、免疫抑制作用,但不具备神经元直接保护作用,这可

能是急性期应用激素不能有效减轻视神经炎和 MS 远期功能障碍的原因。

米诺环素除具有抗炎、免疫抑制作用外,还可抑制 RGCs 凋亡,因此米诺环素可以作为甲基强的松龙治疗脱髓鞘性视神经炎的辅助药物,增强神经保护。但米诺环素联合甲基强的松龙治疗,其用药剂量、时间、副作用及远期效果等还有待研究。

目前临床上对 MS 和急性视神经炎的治疗主要是针对免疫反应和炎症介质的释放而运用的免疫调节剂、免疫抑制剂和抗炎药物,虽然免疫治疗对于减少疾病的复发是有益的^[7],但并未显示有直接的神经保护作用^[8,9],因此对于脱髓鞘性视神经炎神经节细胞保护药物的研究是一个热点^[10]。最近,一系列的开放性和随机双盲对照研究都验证了米诺环素在神经系统疾病中的治疗作用。在对 Huntington 病和肌萎缩(脊髓)侧索硬化(ALS)临床实验中发现,口服米诺环素 100mg/d 或 200mg/d,用药 24wk 左右即可显示明确的治疗作用,用药安全,不良反应少,耐受性良好,且实验室指标的改善优于临床表现,对于难治性病例的治疗也有其继续研究的价值^[11]。

在神经系统疾病中米诺环素可通过多种途径发挥其神经保护作用,且经临床研究证明疗效确切,不良反应少。由此我们推断,米诺环素可能是治疗人类视神经炎的另一安全有效的药物,尽管该药在国内外治疗视神经炎的基础与临床研究尚未广泛开展,其治疗作用及不良反应还有待进一步观察,但是米诺环素用于视神经炎治疗的前景是广阔的。

参考文献

- 1 De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 2001;58(1):65-70
- 2 Diem R, Hobom M, Maier K, et al. Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway. *J Neurosci* 2003;23(18):6993-7000
- 3 Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, et al. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* 2003;126(Pt7):1628-1637
- 4 Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 2001;166(12):7527-7533
- 5 陈昆明,李剑敏,朱振国.豚鼠脊髓匀浆诱发大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎模型.温州医学院学报 2005;35(4):304-305
- 6 许娜,李平华.实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠视神经的病理学变化.重庆医科大学学报 2007;32(8):851-855
- 7 Noseworthy JH, Gold R, Hartung HP. Treatment of multiple sclerosis: recent trials and future perspectives. *Curr Opin Neurol* 1999;12(3):279-293
- 8 Hickman SJ, Kapoor R, Jones SJ, et al. Corticosteroids do not prevent optic nerve atrophy following optic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74(8):1139-1141
- 9 Parry A, Corkill R, Blamire AM, et al. Beta-interferon treatment does not always slow the progression of axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003;250(2):171-178
- 10 Bjartmar C, Trapp BD. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 2001;14(3):271-278
- 11 Thomas M, Ashizawa T, Jankovic J. Minocycline in Huntington's disease: a pilot study. *Mov Disord* 2004;19(6):692-695