

银杏叶提取物对大鼠持续性高眼压下的视网膜神经节细胞活性的保护作用

李海龙¹, 李红²

作者单位:¹(410300)中国湖南省浏阳市眼科医院;²(421001)中国湖南省衡阳市,南华大学附属第二医院眼科

作者简介:李海龙,男,硕士,主治医师,研究方向:青光眼视神经保护。

通讯作者:李红,教授,主任医师,研究方向:青光眼和视光学。lihong5056@yahoo.com.cn

收稿日期:2011-02-28 修回日期:2011-04-26

Protective effect of extract of *Ginkgo biloba* leaves on retinal ganglion cells activity in continuous high intraocular pressure rats

Hai-Long Li¹, Hong Li²

¹Liuyang Eye Hospital, Liuyang 410300, Hunan Province, China;

²Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Hong Li. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. lihong5056@yahoo.com.cn

Received:2011-02-28 Accepted:2011-04-26

Abstract

• AIM: To investigate the protective effect of extract of ginkgo biloba leaves (EGb) on the activity of retinal ganglion cells (RGC) in the continuous high intraocular pressure (IOP) SD rats.

• METHODS: Totally 20 healthy SD rats were established continuous high IOP models by cauterizing two episcleral vessels in the left eye. Then 12 rats satisfying experimental level (IOP > 26mmHg) were selected and divided randomly into two groups, group A (control group) and group B (EGb treated group), 6 rats in each group. EGb was irrigated into the stomachs of rats in the treated group at the dose of 150mg/kg per day. The rat eyes were excised and made into eyeball samples after one month. The paraffin-embedded slides were stained with silver staining for nucleolar organizer region (AgNOR) to observe and count stained grains in RGC nucleus.

• RESULTS: Stained grains of RGC nucleus in model eye of group A was $1.33 \pm 0.07/\text{cell}$, and group B was $1.83 \pm 0.09/\text{cell}$. There was significant difference between group A and group B ($P < 0.05$). Stained grains were more in group B than group A. Stained grains in RGC nucleus of the high IOP with EGb treated subgroup were more than those of the simple high IOP eyes. Stained grains were obviously decreased in the high IOP eye according to the

normal IOP eye. Statistical significance was found between the high IOP eye and the normal IOP eye in the two groups ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Continuous high IOP in rats by cauterizing the episcleral vessels can result in the decrease of stained grains in RGC nucleus. EGb may have partial protective effect in RGC activity of high IOP rats.

• KEYWORDS: glaucoma; rat; retinal ganglion cells; neuroprotection; extract of *Ginkgo biloba* leaves

Li HL, Li H. Protective effect of extract of *Ginkgo biloba* leaves on retinal ganglion cells activity in continuous high intraocular pressure rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(6):970-972

摘要

目的:探讨银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba* leaves, EGb)对大鼠持续性高眼压损伤下的视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)活性的保护作用。

方法:健康SD大鼠20只,采用烧烙法,烙闭大鼠左眼2条浅层巩膜静脉,制作大鼠持续性高眼压模型,从中选出眼压稳定在实验要求(眼压 > 26mmHg)的大鼠12只随机分为A组(对照组)和B组(EGb治疗组)。治疗组予EGb每日150mg/kg灌胃治疗,对照组为空白对照,不做任何处理。1mo后处死大鼠摘取眼球,制作眼球标本,常规石蜡切片,AgNOR染色观察RGC细胞核内的银染颗粒。采用计算机图象分析系统对RGC细胞核内的银染颗粒进行定量分析。

结果:A组大鼠模型眼RGC细胞核内银染颗粒为 1.33 ± 0.07 个/细胞,B组为 1.83 ± 0.09 个/细胞,B组模型眼较A组模型眼RGC细胞核内银染颗粒多,其差异有显著性意义($P < 0.05$)。两组模型眼较正常眼的RGC细胞核内银染颗粒明显减少,其差异有显著性意义($P < 0.05$)。

结论:大鼠持续性高眼压可导致RGC细胞核内银染颗粒减少,而EGb对RGC活性有部分保护作用。

关键词:青光眼;大鼠;视网膜神经节细胞;神经保护;银杏叶提取物

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.06.010

李海龙,李红.银杏叶提取物对大鼠持续性高眼压下的视网膜神经节细胞活性的保护作用.国际眼科杂志2011;11(6):970-972

0 引言

一般认为,青光眼是由于眼内压力超过眼球内部组织(特别是视神经)所能承受的限度而引起视神经萎缩和视野缺损,其实质就是眼压与视神经耐受性不平衡,造成相对过高的眼压,使视神经轴浆流中断和局部血液循环发生障碍,诱发神经毒性物质的释放和蓄积,从而导致青光眼

性视神经病变的发生与发展。因此,采取手术或药物的方法降低“过高”的眼压成为青光眼治疗的主流,将眼压控制在“目标眼压”或者更低的水平。但是在一些眼压控制良好的患者中,视神经的损害并没有停止,通过基础和临床研究的积累和不断深入,人们对青光眼已经有了更深层次的认识,发现单纯从降低眼压的角度去治疗青光眼的视神经损害是远远不够的。现在倾向于认为青光眼视功能损害是多因素、多机制造成的结果,因此眼压降低以后的视神经保护成为 21 世纪青光眼治疗研究的方向和热点^[13]。银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba* leaves, EGb)是一种传统中药,它是从植物银杏叶中提取精制而成的纯天然药物。近年已经有研究表明,EGb 能延缓和减少大鼠慢性高眼压下视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)数目的凋亡^[4],我们研究 EGb 能否对持续性高眼压下的大鼠 RGC 神经元的活性形成保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 由南华大学动物部提供的健康 Sprague-Dawley 大鼠 20 只,雌雄不限,体质量 200 ~ 240g,8 ~ 12 周龄,经检查无明显歪颈,角膜透明,虹膜血管清晰,瞳孔等大等圆,对光反射灵敏。适应性驯养 3d 后,连续测量 3d 眼压,剔除平均眼压高于或低于正常眼压区间(8 ~ 20mmHg)者,挑出合格者纳入实验。银杏叶胶囊(三九药业黄石制药厂,0.15g/粒,含银杏叶提取物 40mg/粒)。

1.2 方法 制作大鼠持续性高眼压模型(左眼)^[5],从中选出眼压稳定,符合实验要求(眼压 > 26mmHg 为造模成功)的大鼠 12 只,随机分为 A 组(对照组)和 B 组(治疗组),每组 6 只。治疗组给予 EGb 每天 150mg/kg 进行灌胃治疗 1mo,每日上午一次性给全部药量。A 组为空白对照,正常喂养。每周测量眼压 1 次。各组实验期满后 30g/L 戊巴比妥钠 1.5mL/kg ip 深度麻醉大鼠,立即完整摘取眼球,并在 6:00 位角膜缘缝线标记,去除眼前节。中性甲醛固定,常规脱水,包埋,平行于视神经纵行剖开眼球,平行于眼球剖面通过视神经做 4 μ m 常规石蜡连续切片 2 张,切片脱蜡至水。双蒸水冲洗切片正反两面,浸染组织 2 次,每次 1min,用滤纸吸干周围水分。AgNOR 染液滴染(28 $^{\circ}$ C 室温,避光),25min,镜下观察,加观察时间共染 30min。双蒸水冲洗,洗去染料后浸洗 2 次,1min/次。无水乙醇冲洗并浸洗 2 次,1min/次。二甲苯与石炭酸以 4:1 混合,浸洗 1min。二甲苯冲洗 2 次,2min/次。中性树脂胶封片,观察 RGC 细胞核内的银染颗粒。切片标本选择视盘旁 3mm 部位,随机选择每个切片中的 3 个视野进行图象分析。AgNOR 染色片计数银染颗粒(计数 RGC 细胞核内银染颗粒总数和 RGC 个数,计算出单个节细胞内银染颗粒平均个数),求 3 个视野的平均值。

统计学分析:运行 SPSS 13.0 统计软件处理。所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 眼压测量 最终入选实验的 12 只大鼠中,造模前左眼(模型眼)平均眼压为 13.17 \pm 2.52mmHg,右眼(对照眼)平均眼压为 12.83 \pm 1.95mmHg,造模前左眼与右眼眼压差异无显著性($P > 0.05$)。术后即刻模型眼眼压平均为 34.58 \pm 3.03mmHg,较术前眼压及对照眼眼压差异均有非常显著性($P < 0.01$),之后模型眼眼压稍有降低,但

表 1 造模前后大鼠双眼眼压及眼压差 ($\bar{x} \pm s$, mmHg, $n = 12$)

分组	模型眼	对照眼	眼压差
造模前	13.17 \pm 2.52	12.83 \pm 1.95	0.33 \pm 0.98
后即刻	34.58 \pm 3.03	13.00 \pm 1.81	21.58 \pm 3.94
后 3d	31.25 \pm 2.05	12.91 \pm 1.78	18.33 \pm 2.84
后 7d	31.16 \pm 1.80	13.08 \pm 2.11	18.08 \pm 2.47
后 14d	31.33 \pm 1.61	13.16 \pm 1.90	18.17 \pm 2.21
后 28d	30.92 \pm 2.19	12.75 \pm 1.66	18.16 \pm 0.89

与对照眼及自身术前眼压比较差异均有非常显著性($P < 0.01$),眼压差维持在 10mmHg 以上(表 1)。

2.2 RGC 细胞中的银染颗粒变化 光镜下可见细胞浆和细胞外组织被染成浅黄色,细胞核染成棕黄色,边界清楚,核内可见分散的一个或多个 AgNOR 小黑点,有时可见许多细小颗粒融合成不规则团块状(图 1)。B 组右眼及 A 组右眼的 RGC 细胞核内银染颗粒分布均匀,其数目分别是 2.92 \pm 0.33 和 2.94 \pm 0.32 个/细胞,两眼间差异无显著性意义($P > 0.05$);B 组左眼和 A 组左眼 RGC 细胞核内银染颗粒分别是 1.83 \pm 0.09 和 1.33 \pm 0.07 个/细胞,数目明显减少,与右眼相比,差异有显著性意义($P < 0.05$);其中 B 组左眼较 A 组左眼 RGC 细胞核内银染颗粒多,差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

EGb 是从植物银杏叶中提取精制而成的纯天然药物,其主要成份为黄酮类和萜内酯化合物,还含有有机酸、多糖、酚类、氨基酸、聚戊烯醇、甾类和微量元素等。国外较早生产的 EGb 商品名为金纳多(又名 EGb761),其有效成分主要是 24% 的总黄酮和 6% 的萜内酯化合物,最初运用于治疗神经元变性疾病,特别是以继发性神经细胞损害为特征的神经系统病变,如老年性痴呆、帕金森氏病等,取得了一定的疗效^[6,7]。在这个基础之上,我们假设 EGb 能够在视网膜上达到足够的药物浓度,那么它就很有希望用于保护 RGC,尽可能地减少 RGC 在高眼压下的活性损伤。众所周知,建立有效稳定的高眼压动物模型是进行青光眼实验研究的关键,目前建立青光眼动物模型的方法多种多样,国内外已有前房注入甲基纤维素、卡抱母、自体血、高渗盐水、 α -糜蛋白酶,激光诱导青光眼^[8],局部应用皮质醇诱导青光眼等。但是这些方法大多对房水、前房、小梁网等内眼环境和结构形成干扰,实验条件不易控制,眼压稳定性不好,眼压波动大,容易影响实验结果,而且造模成本有些还比较高,操作也较复杂。

我们采用的浅层巩膜静脉烧烙法是近年来青光眼研究中应用较多的方法,方法简单,成本低廉,易于操作和控制。大鼠眼的房水引流途径与人眼有很多相似之处,鼠眼角巩膜缘的解剖特点是诱导大鼠产生慢性高眼压的解剖学基础^[9],烙闭浅层巩膜静脉,可阻断房水的引流通道,导致眼压升高。在本实验中,烙闭两条大鼠浅层巩膜静脉,所有操作均在眼外进行,可以最大程度地减少对眼内组织的干扰和破坏,避免了许多与青光眼不相关的干扰因素,类似于人类青光眼的临床过程。在实验前,12 只大鼠对照眼平均眼压为 12.83 \pm 1.95mmHg,模型眼平均眼压为 13.17 \pm 2.52mmHg,术前模型眼与对照眼眼压差异无显著性($P > 0.05$)。术后即刻模型眼眼压平均为 34.58 \pm

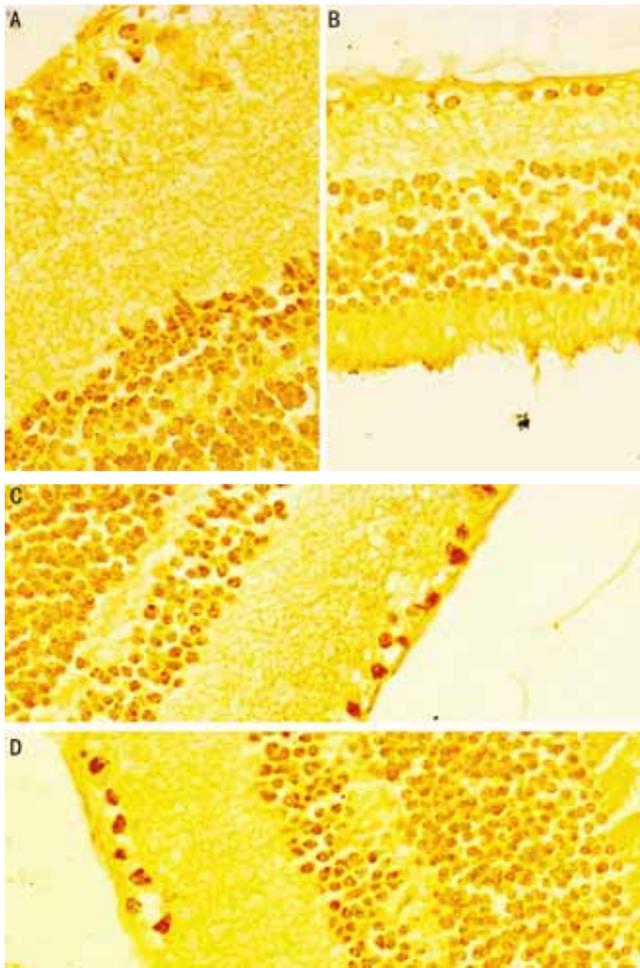


图1 大鼠 RGC 细胞核内银染颗粒 (AgNOR $\times 400$) A: B 组左眼; B: A 组左眼; C: A 组右眼; D: B 组右眼。

3.03mmHg, 较术前眼压及对照眼眼压差异均有非常显著性 ($P < 0.01$); 之后模型眼眼压下降, 但眼压仍维持在 30mmHg 左右, 与对照眼及自身术前眼压比较差异均有非常显著性 ($P < 0.01$), 说明其升高的眼压稳定且能保持足够长时间。在持续性高眼压影响下, 硝酸银染色后的细胞核内银染颗粒数较正常者明显减少。这表明了烧烙法建模的可靠性和稳定性, 浅层巩膜静脉烧烙法能建立有效而稳定的高眼压动物模型。

硝酸银银染颗粒由核仁中嗜银性非组蛋白构成, 非组蛋白与核糖体 (rRNA) 的形成及细胞内蛋白质的合成关系密切, 还可转录 rRNA, 故可以用来反映核仁结构和功能改变。非组蛋白中的羧基键还原银溶液而形成银的微小核心, 然后这些微核发展成较大的银聚合物, 而沉积于胱氨酸、半胱氨酸的双硫键及硫氢键的位置上, 这些较大的沉积物在光镜下清楚可见。细胞增殖异常活跃导致许多细

胞内核仁分解, 硝酸银银染颗粒分散于细胞核内, 因此银染颗粒的多少可反映细胞的活性与功能状态。我们对大鼠视网膜行硝酸银染色, 光镜下可见细胞浆和细胞外组织被染成浅黄色, 细胞核染成棕黄色, 边界清楚, 核内可见分散的一个或多个 AgNOR 小黑点, 有时可见许多细小颗粒融合成不规则团块状。组织结构染色清楚, 能清晰地观察到细胞核中银染颗粒, 较好地反映细胞活性。B 组右眼和 A 组右眼的 RGC 细胞核内银染颗粒分布均匀, 数目分别是 2.92 ± 0.33 个/细胞与 2.94 ± 0.32 个/细胞, 其数目两眼间差异无显著性意义 ($P > 0.05$); B 组左眼和 A 组左眼 RGC 细胞核内银染颗粒明显减少, 与右眼相比, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 其中 B 组左眼较 A 组左眼 RGC 细胞核内银染颗粒多, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 从这点可以阐明 EGb 有保护治疗组大鼠 RGC 细胞活性的作用。

本实验证明, EGb 对持续性高眼压大鼠 RGC 活性有部分保护作用。但这毕竟只是动物实验, 与人体复杂的青光眼形成机制相比, 还有比较大的差异性。因此要找到一种完美的青光眼视神经的保护方法, 任重道远。本论文对 EGb 的研究只是 EGb 运用于青光眼视神经保护治疗的动物实验阶段的一小步, 我们有理由相信, 随着更多科学工作者加入到青光眼视神经保护的研究中及对 EGb 的神经保护更深入地探讨和研究, 银杏叶制剂在青光眼视神经保护方面的临床应用必将马上到来, 并具有广阔的前景。

参考文献

- 1 Chidlow G, Wood JP, Casson RJ. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs* 2007;67(5):725-759
- 2 Osborne NN, Schmidt KG. Neuroprotection against glaucoma remains a concept. *Ophthalmology* 2004;101(11):1087-1092
- 3 Mittag T, Schmidt KG. Mechanisms of neuroprotection against glaucoma. *Ophthalmology* 2004;101(11):1076-1086
- 4 李海龙, 李红, 韩华云. 银杏叶提取物对大鼠慢性高眼压视网膜损伤的保护作用. *国际眼科杂志* 2007;7(2):414-416
- 5 杜兆江, 刘杰, 杨新光, 等. 浅层巩膜静脉烧烙法诱发大鼠慢性高眼压的研究. *第四军医大学学报* 2003;24(22):2107-2109
- 6 Beal MF. Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53 Suppl 3:S39-48
- 7 Ahlemeyer B, Krieglstein J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* 2003;36 Suppl 1:S8-14
- 8 马建洲, 贺翔鸽, 谢琳, 等. 慢性高血压青光眼动物模型的构建和鉴定. *国际眼科杂志* 2007;7(4):951-955
- 9 Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, et al. Temporary elevation of the intraocular pressure by cauterization of vortex and episcleral veins in rats causes functional deficits in the retina and optic nerve. *Exp Eye Res* 2003;77(1):27-33