

灯盏细辛对大鼠慢性高眼压模型视神经损伤保护的实验研究

刘东敬, 兰长骏, 甘宇业

作者单位:(637000) 中国四川省南充市, 川北医学院附属医院眼科

作者简介:刘东敬,男,眼科学博士,副教授,硕士生导师,成都普瑞眼科医院业务副院长,课题“青光眼的基础和临床研究”曾获2006年四川省科技进步三等奖,研究方向:青光眼的视神经保护、糖尿病视网膜病变的治疗。

通讯作者:刘东敬. ldj1213@163.com

收稿日期:2011-03-08 修回日期:2011-05-06

Studies on the neuroprotective effects of Erigeron brevicapae hand mass on the optic nerve of chronic glaucoma model in rats

Dong-Jing Liu, Chang-Jun Lan, Yu-Ye Gan

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

Correspondence to: Dong-Jing Liu, Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China. ldj1213@163.com

Received:2011-03-08 Accepted:2011-05-06

Abstract

• AIM: To investigate neuroprotective effects of Erigeron brevicapae hand mass (EBHM) on the optic nerve of chronic glaucoma model in rats.

• METHODS: Ninety adult Wistar rats were divided into three groups. The trabecular meshwork of both eyes of the 1st and 2nd group rats were performed photocoagulation with 532nm Krypton laser to establish chronic glaucoma model. Intraocular pressure (IOP) was measured by Tono-pen before and after surgery every week. After one week, EBHM was injected by 15mg/100g once a day in the 2nd group. The 3rd group acted as a control. All rats were killed at the 9th week. Retinal ganglion cells (RGCs) were counted based on the the wholemounted retinas stained with 1% toluidine blue.

• RESULTS: IOP of all the experimental eyes was increased. IOP was 14.70 ± 3.2 mmHg before operation. IOP of the experimented eyes was 27.25 ± 4.75 mmHg, 28.75 ± 6.24 mmHg, 25.47 ± 5.60 mmHg at the 3rd, 6th and 9th week respectively, there was a significant difference compared with preoperation. The value of the density of the RGCs was 1654 ± 136 (per square millimeter) in the 1st group rat eyes and was 2135 ± 125 in the 2nd group rats, was 2516 ± 196 in the 3rd group basing on the wholemounted retinas stained with 1% toluidine blue. There was a significant difference between eyes treated with EBHM and the eyes in other 2 groups in the value of the density of the RGCs.

• CONCLUSION: The IOP of the experimental rat eyes was chronically and moderately increased by a laser injury to the trabecular meshwork, the value of the density of the RGCs was declining. EBHM can partly afford neuroprotection on the optic damage induced by pressure.

• KEYWORDS: Erigeron brevicapae hand mass; neuroprotection; rat; glaucoma; model

Liu DJ, Lan CJ, Gan YY. Studies on the neuroprotective effects of Erigeron brevicapae hand mass on the optic nerve of chronic glaucoma model in rats. *Gujie Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(7):1154-1156

摘要

目的:建立大鼠慢性高眼压模型,观察灯盏细辛(Erigeron brevicapae hand mass, EBHM)对眼压升高诱导视神经损伤的保护作用。

方法:选用健康成年 Wistar 大鼠 90 只,分为 3 组。用波长为 532nm 的氩离子黄绿激光光凝第 1 和第 2 组大鼠双眼小梁网,建立大鼠高眼压模型。在眼压升高后 1wk 开始用 EBHM 对第 2 组大鼠 15mg/100g 肌肉注射,行视神经保护性治疗。第 1 组作为光凝对照组,第 3 组大鼠作为正常对照组。在第 9wk 同时处死 3 组大鼠做全视网膜铺片,1% 甲苯胺蓝染色,记数平均视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)密度。

结果:所有光凝眼眼压均中等程度升高,光凝前眼压为 14.70 ± 3.2 mmHg;光凝后第 3, 6, 9wk 眼压分别为 27.25 ± 4.75 , 28.75 ± 6.24 , 25.47 ± 5.60 mmHg, 与光凝前比较,差别有显著性($P < 0.05$)。经视网膜铺片甲苯胺蓝染色,视网膜 RGCs 密度值(个/mm²)为:第 1 组 1654 ± 136 , 第 2 组 2135 ± 125 , 第 3 组 2516 ± 196 。第 2 组大鼠视网膜 RGCs 密度值与第 1 和第 3 组大鼠 RGCs 密度值比较,差别有显著性($P < 0.05$)。

结论:光凝大鼠小梁网成功建立大鼠慢性高眼压模型,光凝眼眼压中等程度升高, RGC 密度降低; EBHM 能够部分保护大鼠慢性高眼压诱导的视神经损害。

关键词:灯盏细辛;视神经保护;大鼠;青光眼;模型

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.07.008

刘东敬, 兰长骏, 甘宇业. 灯盏细辛对大鼠慢性高眼压模型视神经损伤保护的实验研究. 国际眼科杂志 2011;11(7):1154-1156

0 引言

灯盏细辛(Erigeron brevicapae hand mass, EBHM)是一种云南省民间中草药,系菊科飞蓬属短茎飞蓬提炼成分,具有增加脑血流量,降低脑血管阻力,提高血-脑屏障通透性,以及对抗由二磷酸腺苷引起的血小板聚集作用,对眼

压已控制的原发性青光眼能够有效改善视野,保护视神经。但其具体作用机制仍不清楚,我们通过激光光凝大鼠小梁网建立大鼠慢性高眼压动物模型,用 EBHM 肌肉注射,观察其对大鼠视神经的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 Wistar 大鼠 90 只,体质量 150 ~ 200g,雌雄各半,排除明显的眼部疾病大鼠。EBHM 由云南生物谷灯盏花药业有限公司提供,用法:15mg/100g,肌肉注射,1 次/d。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 健康成年 Wistar 大鼠 90 只,随机分为 3 组,每组 30 只。对第 1,2 组大鼠用激光光凝双眼小梁网,第 3 组为对照组,第 2 组大鼠在眼压升高后 1wk 开始用 EBHM 进行保护性治疗,在第 9wk 时处死 3 组所有大鼠。

1.2.2 角膜缘激光光凝小梁网 在激光光凝前 1wk,向大鼠前房内注入 50 μ L 墨汁,1wk 后碳粒被阻挡在前房角,沿角膜缘形成一条黑线,激光束直接照在黑线上(图 1)。行激光光凝前用速眠新 II 注射液(长春军需大学兽医研究所)按 1mL/kg 注入大鼠腿部肌肉,右眼滴入 1g/L 地卡因 1 滴进行麻醉。激光机(NOVUS OMNI, Lumenis INC)参数设置为 0.7s/0.4W,光斑直径 200 μ m。激光束直接通过角膜缘射入小梁网黑线上,人为地旋转大鼠从而使激光束尽量以锐角直接照射在小梁网上,以减少对角膜缘的损伤,每眼光凝 360 $^{\circ}$ 约 80 ~ 100 个点。

1.2.3 眼压测量 用 Tono-pen XL 眼压计测量大鼠眼压。用速眠新 II 以 1mL/kg 行大鼠腿部肌肉注射全身麻醉,双眼各滴入 1g/L 地卡因 1 滴局部麻醉。眼压计测量头迅速地碰触角膜表面,出现有效读数。每眼测量 4 次,取平均值。测量完毕后,点抗生素眼药水。分别于激光烧灼前、光凝后 3d 测量眼压,以后每周测量眼压,并观察术眼的局部反应。

1.2.4 视网膜铺片和甲苯胺蓝染色 处死大鼠后,摘除眼球,用 0.1mol/L PBS 液漂洗眼球两次,然后沿角巩膜缘后 1 ~ 1.5mm 一周剪除眼前节(注意保留 12:00 位标志),用小毛笔轻轻刷洗玻璃体。用眼科小弯镊钝性分离视网膜,在 12:00,3:00,6:00,9:00 方位向视乳头方向剪开 1.5 ~ 2mm,将全视网膜平铺在玻片上,玻璃体腔一侧朝上,风干 6h,然后用高浓度乙醇脱水,二甲苯脱脂,750mL/L 乙醇中复水 2 ~ 3h。10g/L 甲苯胺蓝染色 5 ~ 15min(一边在显微镜下观察,染色充分后,洗去染液),风干脱水后脱脂,用纤维树脂覆盖视网膜,加盖玻片封片。在 400 倍光镜下进行 RGCs 计数,在视网膜颞上、颞下、鼻上、鼻下 4 个象限内,距视乳头中心 1,2,3mm 的地方各取一个约 0.078mm \times 0.058mm 大小的矩形采图照相。用图像分析软件分析,根据 RGCs 染色特点,统计每张照片 RGCs 数目并计算密度,每张视网膜铺片 12 个矩形内 RGCs 密度的平均值即为整个视网膜的 RGCs 密度。

统计学分析:用 SPSS 13.0 软件,采用 *t* 检验的分析方法, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 眼压 所有大鼠光凝眼眼压均中等程度升高,光凝前眼压为 14.70 \pm 3.2mmHg;第 1 和第 2 组大鼠光凝后眼压升高(表 1)。其与光凝前眼压值比较,差别有显著性($P < 0.05$)。

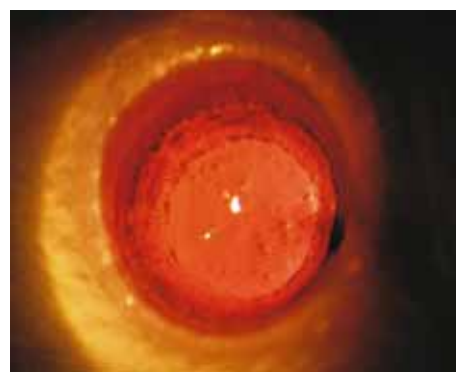


图 1 激光光凝前 1wk,向前房内注入 50 μ L 墨汁,1wk 后碳粒被阻挡在前房角,沿角膜缘形成一条黑线。

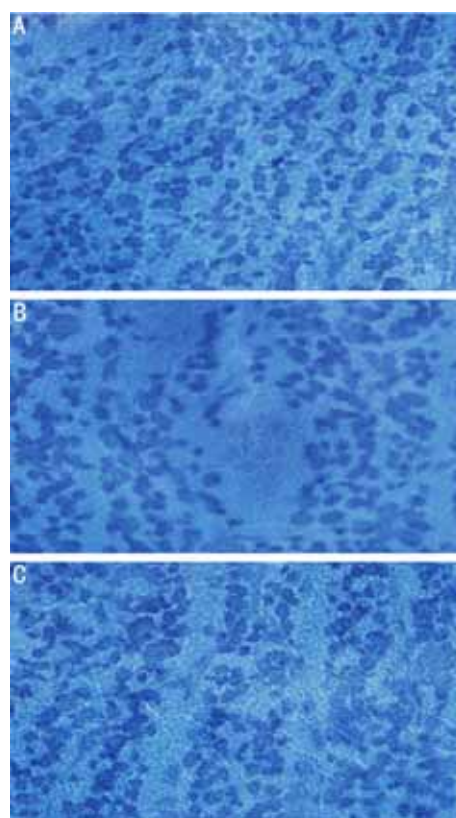


图 2 灯盏细率对大鼠慢性高眼压模型视网膜 RGCs 密度的影响 A:对照组;B:模型组;C:治疗组。

表 1 光凝后眼压变化 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

	第 1 组	第 2 组	第 3 组
光凝前	14.52 \pm 3.86	14.70 \pm 3.2	15.15 \pm 3.18
光凝后 3wk	30.43 \pm 5.25	28.15 \pm 5.55	-
光凝后 6wk	29.95 \pm 5.45	29.45 \pm 5.15	-
光凝后 9wk	28.91 \pm 5.78	29.40 \pm 5.35	-

2.2 视网膜 RGCs 密度变化 全视网膜铺片甲苯胺蓝染色,视网膜 RGCs 密度值(个/ mm^2),第 1 组大鼠为 1654 \pm 125。第 2 组大鼠视网膜 RGCs 密度值(2135 \pm 125)与第 1 组进行比较,视网膜 RGCs 密度值明显较高,差别有显著性($P = 0.025$),第 2 组和第 3 组(2516 \pm 196)比较,差别有显著性($P = 0.045$,图 2)。

2.3 毒副作用的观察 第 2 组大鼠眼压升高后 1wk 开始用 EBHM 肌肉注射,进行视神经保护性治疗,没有观察到任何毒副作用,大鼠健康。

3 讨论

EBHM 可用于散寒解表、止痛舒络、活血治瘫,其化学成分已鉴定有黄酮、吡喃酮等 10 余种化合物。以芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸甙、4'-羟基黄酮素-7-O-葡萄糖醛酸甙,两种葡萄糖醛酸甙的混合物命名为 EBHM,具有抗凝、改善微循环的作用,能明显降低大脑中动脉的血管张力,增加冠脉流量,还有耐缺氧、防治肾功能衰竭、提高血浆中 cAMP 含量以及提高血脑屏障通透性等作用。一系列的临床研究显示,EBHM 能够扩大或保持青光眼视野,改善视乳头血流^[1]。对于 EBHM 作用机制的研究进行了一系列的基础研究,结果显示,EBHM 具有抑制慢性高眼压下 RGC 凋亡及抗自由基的作用,并能降低高眼压下视网膜毛细血管的通透性;对高眼压下视神经轴浆流运输的阻滞有改善和恢复的作用。谷氨酸通过 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体介导青光眼性神经损害是其重要的机制之一。向大鼠玻璃体腔注射 NMDA 建立大鼠 RGC 兴奋毒性损伤模型,用 EBHM 腹腔内注射进行保护性治疗,结果显示其对 NMDA 所致大鼠视网膜神经节细胞层(RGCL)神经兴奋性毒性损害能够提供部分保护作用^[2,3]。我们采用 Ueda 等^[4]描述的方法,用氩激光凝 Wistar 大鼠小梁网建立高眼压模型,光凝后每周用 Tono-pen 测量眼压,光凝眼眼压均中等程度的升高,视网膜神经元密度值下降,成功地建立大鼠的慢性高眼压模型。参照 EBHM 的药物安全剂量,用 15mg/100g 肌肉注射,1 次/d,进行视神经的保护性干预,结果显示,全视网膜铺片甲苯胺蓝染色记数视网膜 RGCs 密度值,大鼠慢性高眼压模型大鼠的视网膜 RGCs 平均密度值明显下降,用 EBHM 保护的大鼠视网膜 RGCs 平均密度值与光凝大鼠组进行比较,视网膜 RGCs 密度值明显较高,差别有显著性;但与正常眼的视网膜 RGCs 密度值比较,仍然有一定程度的下降,差别有显著性。这表明,在大鼠慢性高眼压模型中 EBHM 能够对压力诱导的视神经损害提供部分保护作用。

在大鼠慢性高眼压模型中,高眼压导致了视神经纤维轴浆运输受阻,阻断了从外侧膝状体到 RGC 胞体的神经营养因子的传递,引起 RGC 的凋亡。用免疫组织化学的方法证实,在视神经乳头处神经营养因子 BDNF 和 NT/4-5

近乎完全缺乏^[5]。EBHM 改善轴浆运输的作用,使得来源于外侧膝状体的部分神经营养因子能够到达视网膜 RGC,从而保护 RGC,使 RGC 凋亡减少。EBHM 具有改善视网膜微循环、促进视神经乳头处细胞和组织代谢作用,增强的循环将星状胶质细胞、RGC 等产生的有毒物质经血液循环转运、清除,减少了病理性微环境改变导致的 RGC 的进一步损害;EBHM 增强了组织代谢,使星状胶质细胞等细胞功能增强,提高其对高压在内在的环境改变发生的反应能力,细胞之间的连接物质的分泌作用增强;减少细胞的迁移,使其对轴突支持功能得以正常维持;使星状胶质细胞产生的一氧化氮等有害物质减少^[5]。眼压升高使视网膜存在不同程度的缺血缺氧,EBHM 可以使视网膜血流灌注和营养供给增加,增强了视网膜 RGC 的代谢,使 RGC 功能增强,对其周围的病理性微环境抵抗能力提高。同时 RGC 和 Müller 细胞等代谢增强,细胞对压力造成损伤的抵抗作用增强,细胞释放谷氨酸减少,而 Müller 细胞对视网膜中细胞外的谷氨酸转运作用可能增强,减轻了谷氨酸对视神经的毒性损害,保护了视神经^[6]。

参考文献

- 1 刘东敬,陈晓明,栾春生,等. 灯盏细辛对青光眼视神经保护作用的临床试验. 中国实用眼科杂志 2004;22(4):260-262
- 2 石晶明,蒋幼芹,刘旭阳. 灯盏细辛对 NMDA 所致的大鼠视网膜神经元损伤的保护作用. 眼科学报 2004;20(2):113-117
- 3 Dong CJ, Guo Y, Agey P, et al. Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(10):4515-4522
- 4 Ueda J, Sawaguchi S, Huanyu T, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Japan J Ophthalmol* 1998;42(5):337-344
- 5 Johnson EC, Deppmeier LM, Wentzien SK, et al. Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(2):431-442
- 6 Johnson EC, Guo Y, Cepurna WO, et al. Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp Eye Res* 2009;88(4):808-815