

复方丹参注射液治疗兔视网膜挫伤的实验研究

王志玉¹, 史爱云², 刘 轶¹

基金项目: 中国福建省科技厅科技开发计划资助项目 (No. 2008-82-20)

作者单位: (355000) 中国福建省福安市, 福建省宁德市闽东医院¹眼科; ²神经内科

作者简介: 王志玉, 硕士, 主治医师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变、眼外伤、视网膜神经保护及凋亡。

通讯作者: 王志玉. wangzhiyuxy@126. com

收稿日期: 2011-09-14 修回日期: 2011-10-24

Interference effect of Danshen injection on apoptosis of retinal cells in experimental retinal contusion

Zhi-Yu Wang¹, Ai-Yun Shi², Yi Liu¹

Foundation item: Fujian Science and Technology Department Technology Development Program, China (No. 2008-82-20)

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Neurology, Mindong Hospital of Ningde, Fuan 355000, Fujian Province, China

Correspondence to: Zhi-Yu Wang, Department of Ophthalmology, Mindong Hospital of Ningde, Fuan 355000, Fujian Province, China. wangzhiyuxy@126. com

Received: 2011-09-14 Accepted: 2011-10-24

Abstract

• **AIM:** To investigate the interference effect of Danshen injection on apoptosis of retinal cells in experimental retinal contusion.

• **METHODS:** Forty-two pigmented rabbits were selected, and the left and right eyes were in the experimental control group and Danshen injection group, respectively. The retinal contusion model was set up by Allen's reformative hitting method. The eyeballs of the 42 pigmented rabbits were enucleated 1 hour, 3 hours, 1 day, 3, 7, 14 and 28 days after the retinal contusion model was established. Another 2 pigmented rabbits were selected as the normal control, which underwent none of the contusion but eyeball extraction at the end of the observation period. TUNEL and transmission electron microscopy were used to detect the apoptosis of the retinal cells. Cell counts and statistical analysis were used to assess results.

• **RESULTS:** There was cell apoptosis in sensory layer after contusion of retina, but almost not observed in retinas from normal control, 14, 28 days group. They were abundant in 3 hours, 1 day, 3 days group, with morphological and biochemical changes of apoptosis features of apoptotic cells, in which sensory layer of the retina in the 3 days group the number of apoptotic cells reached its peak. It was also found that apoptosis cells in

Danshen injection group were less than that in the experimental control group ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Danshen injection may inhibit the apoptosis of retinal cells in experimental retinal contusion.

• **KEYWORDS:** contusion of retina; sensory layer; cell apoptosis; retina; Danshen injection

Wang ZY, Shi AY, Liu Y. Interference effect of Danshen injection on apoptosis of retinal cells in experimental retinal contusion. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(12):2079-2081

摘要

目的: 研究复方丹参注射液 (Danshen injection) 在实验性兔视网膜挫伤时对视网膜细胞凋亡的干预作用。

方法: 青紫兰兔 44 只分为实验对照组和复方丹参注射液治疗组。以改良 Allen's 重击法制备兔右眼挫伤性视网膜病变模型, 两组在建立模型后 1, 3h; 1, 3, 7, 14, 28d 分别取眼球。另设立正常对照组 2 只青紫兰兔, 不作任何处理, 在实验观察结束时取眼球。采用原位末端标记法 (TUNEL) 和透射电子显微镜观察视网膜细胞凋亡情况, 并进行细胞计数。

结果: 视网膜挫伤后存在着神经感觉层细胞凋亡现象。在实验对照组和复方丹参注射液组两组中, 正常对照组、1h, 28d 组几乎不见凋亡细胞, 挫伤后 3h; 1, 3d 组在视网膜各细胞层均出现较多的、具有凋亡形态学与生化改变特征的凋亡细胞, 其中在 3d 组视网膜感觉层细胞凋亡细胞数量达到高峰。复方丹参注射液治疗组的凋亡细胞数比实验对照组少, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。

结论: 实验性视网膜挫伤中, 复方丹参注射液治疗能抑制视网膜细胞凋亡的发生。

关键词: 视网膜挫伤; 神经感觉层; 细胞凋亡; 视网膜; 复方丹参注射液

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 12. 006

王志玉, 史爱云, 刘轶. 复方丹参注射液治疗兔视网膜挫伤的实验研究. 国际眼科杂志 2011;11(12):2079-2081

0 引言

视网膜挫伤 (contusion of retina) 后出现光感受器损伤、视网膜外层变性坏死、黄斑部色素紊乱, 是视功能遭受损害的主要原因, 细胞凋亡参与了视网膜挫伤后视功能的丧失^[1-3]。本实验旨在通过观察视网膜挫伤后细胞凋亡的病理改变, 根据挫伤后出现脉络膜血液循环功能的紊乱是视网膜神经感觉层细胞凋亡的可能机制^[4], 使用常用药物复方丹参注射液对该模型进行药物干预, 探讨该药活血化瘀作用对视网膜神经感觉层细胞凋亡的影响, 分析作用机制, 为临床治疗视网膜挫伤探索新的思路。

表1 不同观察时间点各组视网膜挫伤后神经感觉层凋亡细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/2.5mm²)

分组	1h	3h	1d	3d	7d	14d	28d
复方丹参治疗组	0.60 ± 1.37	1.40 ± 1.75	7.00 ± 1.23	12.55 ± 1.39	2.90 ± 1.79	1.80 ± 0.62	0.95 ± 0.62
实验对照组	0.50 ± 0.64	9.50 ± 1.53	15.60 ± 1.69	25.50 ± 1.53	8.80 ± 1.24	3.50 ± 1.36	0.80 ± 0.53
<i>t</i>	0.49	-16.48	-13.837	-13.160	-11.444	-4.073	0.533
<i>P</i>	0.627	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.597

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康无眼疾青紫兰兔44只(福建医科大学实验动物中心提供),体质量2~3kg,雄雌不拘,外眼及眼底检查正常,选取右眼为致伤眼。TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒(碧云天生物技术研究所):TdT酶、TdT酶稀释液、生物素-dUTP、链霉亲和素-HRP、链霉亲和素-HRP稀释液、DAB显色液A、DAB显色液B、标记反应终止液。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 采用计算机随机数字表法分为挫伤后1, 3h;1, 3, 7, 14, 28d实验对照组及挫伤后1, 3h;1, 3, 7, 14, 28d复方丹参注射液治疗组,共14组,每组3只。另设立正常对照组2只青紫兰兔(4眼),不作任何处理,在实验观察结束时摘除眼球,2眼采用TUNEL法观察正常视网膜细胞的凋亡现象,另2眼用于透射电子显微镜观察。

1.2.2 视网膜挫伤模型的制作和判断 改良Allen's重击法,致伤能量约为2.87J^[5]。所有造模由同一操作者序贯完成。复方丹参注射液20mg/kg经兔耳缘静脉静滴。实验兔均在同一条件、不同时间点进行眼部伤情观察,检查眼球位置、结膜、角膜、前房、瞳孔、晶状体、玻璃体和视网膜,散瞳剂充分散瞳后用间接检眼镜对眼底结构进行细致的检查。眼部检查由同一名高年资眼科医师完成。判断标准:伤眼直接对光反应迟钝,瞳孔散大;眼底可见视网膜乳白色混浊、水肿范围较大,同时伴有眼底出血,即认为模型制作成功,纳入实验。制模后结膜囊内涂红霉素眼膏。

1.2.3 透射电镜标本制备 摘取兔眼球后,在垫有冰液的平皿上沿赤道部剖开眼球,迅速去除角膜、晶状体及玻璃体,将眼杯后极部视盘两侧组织切成1mm×3mm的条块,置于30mL/L戊二醛-15mL/L多聚甲醛4℃下固定3~4h,1%锇酸-1.5%亚铁氰化钾固定1.5h,PBS漂洗;700mL/L乙醇饱和醋酸铀染液块染,乙醇-丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋剂包埋。超薄切片80nm,醋酸铀、柠檬酸铅各染色5min;在Philips EM 208型透射电镜下观察、摄影(电子显微镜由专业技术人员操作)。

1.2.4 组织切片的TUNEL染色 严格按照碧云天生物技术研究所TUNEL染色检测方法操作。免疫组织化学切片以细胞核染色呈棕黄色为阳性标志,同时符合凋亡细胞形态(核固缩或核质碎裂贴边,出现核周空泡)才能判定为凋亡染色阳性细胞。细胞计数在高倍镜下使用0.5网形目镜尺(5mm×5mm,各分为10等分,上海第三光学仪器厂),分别计数2.5mm²视网膜面积内的凋亡阳性细胞数。双目检验镜下(×400)对神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)、内核层(inner nuclear layer, INL)和外核层(outer

nuclear layer, ONL)的阳性细胞计数。各个包埋块取两张切片,每张切片于对称部位(距视盘1.33mm处左右两侧)各取一个视野进行观测,4个测量值相加取平均值作为每眼的最终观察值。

统计学分析:计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对数据采用SPSS 13.0统计软件进行统计处理,首先进行方差齐性检验,符合正态分布采用成组*t*检验,不符合正态分布的采用Mann-Whitney检验,*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔眼挫伤后超微结构变化 在实验对照组和复方丹参注射液组两组中,除正常对照组、1h、28d组未见凋亡细胞外,其余两组各时间点均观察到凋亡细胞,表现为细胞体积缩小、细胞膜皱缩、细胞质浓缩及核固缩现象,有典型的质膜包裹碎裂的染色体形成的凋亡小体。复方丹参治疗组中典型凋亡细胞明显少于实验对照组。

2.2 视网膜挫伤后神经感觉层凋亡细胞的变化 正常对照组凋亡标记基本为阴性,细胞计数0.60 ± 0.84个/2.5mm²,偶见极少量的凋亡标记阳性的细胞。视网膜挫伤后复方丹参治疗组和实验对照组除1h和28d外,视网膜各层细胞均发现有细胞凋亡的发生,INL和ONL分布为最多,凋亡细胞数随视网膜挫伤时间变化而变化。3h;1,3,7,14d复方丹参治疗组的视网膜感觉层凋亡细胞数比实验对照组少,差异有统计学意义(*P* < 0.01,表1)。实验对照组在视网膜挫伤后3h即观察到凋亡细胞,而复方丹参治疗组在视网膜挫伤后1d才出现较多的凋亡细胞。两组细胞凋亡出现高峰集中在视网膜挫伤后3d时,14d后两组凋亡细胞数均明显减少。28d时复方丹参治疗组凋亡基本呈阴性,与实验对照组相比,差异无统计学意义(*t* = 0.533, *P* = 0.597)。

3 讨论

细胞凋亡^[6,7]是细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)的主要形式,通常表现为核固缩,呈新月形,细胞体积缩小,细胞膜皱缩,无核膜破裂,细胞质浓缩,细胞核和细胞浆被结构完整的细胞膜包绕分割成凋亡小体,不发生炎症反应,是单一细胞发生死亡的行为。凋亡小体的多种细胞器如内质网、溶酶体、线粒体结构多保持完整,其重要的生化特征是DNA片断化。以往研究表明^[8-10],视网膜神经感觉层细胞凋亡是挫伤性视网膜病变的一个重要机制,是视功能丧失的重要原因。视网膜挫伤后导致细胞凋亡的确切机制尚不十分明了,但外伤后微循环障碍是公认的事实^[11]。窦宏亮等^[4]对实验模型挫伤后的眼血液动力学研究发现挫伤后出现脉络膜血液循环功能的紊乱,表现为血管的痉挛收缩,然后扩张充血等。组织血流

量与血管口径的4次方成正比,血管口径的微小变化即可直接影响组织的灌流量。当眼挫伤时,脉络膜的交感神经受到刺激,出现细小动静脉痉挛、收缩、再扩张和血管内物质的渗出,致使色素上皮层和神经上皮层之间营养物质运输障碍而发生感光细胞凋亡。近来研究发现^[12,13],缺血或外伤可导致血管内皮损伤,血管张力的调节作用明显减弱甚至消失,而扩张血管、改善微循环、增加局部供氧可促进病变的恢复、好转。

国内有研究表明^[14,15],中药活血化瘀方剂可有效保护神经节细胞,但其抑制神经节细胞的凋亡进而发挥视神经保护作用的机制尚不明确。复方丹参注射液含丹参及降香,其中丹参具有抗血小板黏附、凝聚和释放的作用,可扩张血管、增加动脉血流量,使红细胞电泳增速或恢复正常,加快毛细血管血液流速,最终改善组织血液供应。本实验主要是通过观察视网膜挫伤后细胞凋亡的病理改变,并进行药物干预,进一步深入探讨视网膜挫伤的发病机制及有效治疗方法,旨在为临床治疗打下基础。通过本实验发现,视网膜挫伤后神经感觉层凋亡细胞出现的时间和数量在复方丹参治疗组和实验对照组有明显差异,提示复方丹参注射液能够改善挫伤后视网膜的微循环、提高局部的营养代谢,对细胞凋亡的发生具有明显的延缓和抑制作用,说明在一定程度上复方丹参注射液对挫伤后的视网膜细胞产生保护作用,对视网膜功能的改善有着重要意义。

参考文献

- 1 Seddon JM, Cote J, Page WF, *et al.* The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol* 2005;123(3):321-327
- 2 Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, *et al.* Sunlight and the 10-year

- incidence of age-related maculopathy: the beaver dam eye study. *Arch Ophthalmol* 2004;122(5):750-757
- 3 王志玉,付群,史爱云. 视网膜挫伤后神经感觉层细胞凋亡的实验研究. *眼科新进展* 2008;28(8):590-594
 - 4 窦宏亮,宋琛. 眼球挫伤后眼血流动力学改变. *中华眼科杂志* 1992;28(4):243-245
 - 5 李凤鸣. *眼科全书*. 第2版. 北京:人民卫生出版社 1996:3281-3285
 - 6 Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(24):12736-12737
 - 7 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119(3):493-501
 - 8 安美霞,张效房,张金嵩. 挫伤性视网膜病变中光感受器细胞凋亡与氧化损伤的实验研究. *中华眼科杂志* 2004;40(2):118-121
 - 9 王志玉,史爱云. 视网膜挫伤兔模型的病理学观察. *国际眼科杂志* 2009;9(8):1469-1471
 - 10 Yang L, Bula D, Arroyo JG, *et al.* Preventing retinal detachment associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):648-654
 - 11 Sipperley JQ, Quigley HA, Hass JDM. Traumatic Retinopathy of Prematurity in Primates: the explanation of commotio retina. *Arch Ophthalmol* 1978;96(12):2267-2273
 - 12 Yoneda S, Tanaka E, Goto W. Topiramate reduces excitotoxic and ischemic injury in rat retina. *Brain Res* 2003;967(1-2):257-266
 - 13 孙晓东,张哲,许迅,等. 实验性视网膜脱离复位后的视网膜细胞凋亡. *眼科新进展* 2005;25(4):318-320
 - 14 项敏泓,钟一声,张兴儒. 灯盏细辛对兔高眼压视网膜神经节细胞活性的作用. *眼科新进展* 2005;25(5):414-416
 - 15 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