

玻璃体腔注射大麻素 HU-211 治疗鼠青光眼视神经损伤的研究

刘慧峰, 何媛, 贾俊, 姬明利, 席进伟

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81100665); 陕西省科技厅项目(No. 2013KJXX-31); 陕西省教育厅科学研究项目(No. 2013JK0798); 西安医学院科研课题(No. 11FZ16)

作者单位: (710038) 中国陕西省西安市, 西安医学院第二附属医院眼科 西安医学院免疫眼病研究所

作者简介: 刘慧峰, 硕士, 主治医师, 研究方向: 青光眼、角膜病。

通讯作者: 何媛, 博士, 副主任医师, 眼科主任, 研究方向: 青光眼、白内障. openji7127@hotmail.com

收稿日期: 2014-04-01 修回日期: 2014-07-25

Clinical study on intravitreal injection of cannabinoid HU - 211 for optic nerve damage in glaucoma rats

Hui-Feng Liu, Yuan He, Jun Jia, Ming-Li Ji, Jin-Wei Xi

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81100665); Shaanxi Provincial Science and Technology Department Project (No. 2013KJXX-31); Science Research Project of Shaanxi Education Department (No. 2013JK0798); Scientific Research Project of Xi'an Medical University (No. 11FZ16)

Institute of Immune Eye, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Yuan He. Institute of Immune Eye, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. openji7127@hotmail.com

Received: 2014-04-01 Accepted: 2014-07-25

Abstract

• **AIM:** To evaluate the protective effects of intravitreal injection of cannabinoid HU - 211 for optic nerve in glaucoma rats, providing the experimental evidence in the treatment of glaucoma optic nerve injury.

• **METHODS:** Glaucoma rats (18 eyes) were modeled by electric coagulation sclera surface vein and randomized into 3 groups, group A received intravitreal injection of 1mg/0.1mL cannabinoid HU - 211 every other day respectively; group B was given intravitreal injection of 0.1mL water every other day, group C was high intraocular pressure (IOP) group, 6 eyes were randomly selected for blank control group (group D). IOP was observed every day. The rats were sacrificed after treatment 4wk, froze retina section, HE stain. The density fluctuation of retinal ganglion cell (RGC) neurons assessment the optic nerve of rat model with chronic high IOP glaucoma were measured.

• **RESULTS:** The apoptosis and damage degree of RGC in group B was obviously higher than that in group A, with statistically significant difference ($P < 0.05$). There was no significant difference in groups B and C ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** Intravitreal injection of cannabinoid HU-211 shows obvious protective effect on optic nerve in glaucoma rat models.

• **KEYWORDS:** cannabinoid HU - 211; glaucoma; optic nerve protective

Citation: Liu HF, He Y, Jia J, et al. Clinical study on intravitreal injection of cannabinoid HU-211 for optic nerve damage in glaucoma rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(9):1584-1586

摘要

目的: 评价玻璃体腔内注射大麻素 HU-211 对大鼠青光眼模型视神经的保护作用, 为青光眼视神经损伤治疗提供实验依据。

方法: 采用电凝巩膜表面静脉法制作大鼠青光眼模型 18 眼, 随机分为 3 组: A 组分别隔日一次玻璃体腔注射 1mg/0.1mL 大麻素 HU-211, B 组隔日一次玻璃体腔注射 0.1mL 生理盐水, C 组为高眼压组。随机选 6 只对侧眼为空白对照组, 每日观察眼压变化情况, 用药 4wk 后处死大鼠, 视网膜冰冻切片, HE 染色通过视网膜神经元的密度变化评估大鼠慢性高眼压模型视网膜神经元的损伤程度。

结果: B 组的凋亡程度及 RGC 的损伤程度明显高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), B 组与 C 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论: 玻璃体腔注射大麻素 (HU-211) 对大鼠青光眼模型视神经视网膜有明显的保护作用。

关键词: 大麻素 HU-211; 青光眼; 视神经保护

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.09.06

引用: 刘慧峰, 何媛, 贾俊, 等. 玻璃体腔注射大麻素 HU-211 治疗鼠青光眼视神经损伤的研究. *国际眼科杂志* 2014; 14(9): 1584-1586

0 引言

青光眼是一种以进行性视神经损害为特征, 最终导致视功能丧失的疾病。目前临床上最主要的治疗方法仍以药物或手术降眼压为主, 抗青光眼药物的研究仍为目前研究热点。国外已有学者报道大麻素全身用药兼有降眼压及视神经保护的双重作用, 但其副作用较多, 本研究观察大麻素 HU-211 局部用药后大鼠青光眼模型 RGC 数目的变化, 探讨大麻素局部用药的视神经保护作用, 为进一步开发抗青光眼新药物提供科学依据。

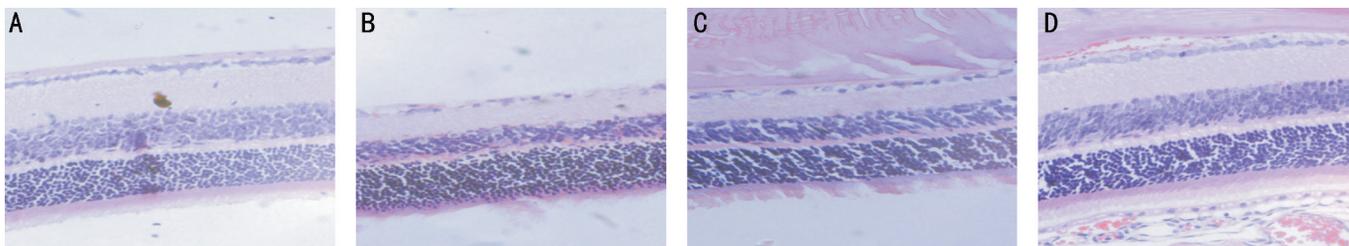


图1 RGC数目 A:A组; B:B组; C:C组; D:空白对照组。A、D显示视网膜厚度及RGC正常, A组略少于D组。B、C显示视网膜厚度变薄, RGC数量明显减少。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年SD大鼠12只24眼(购自第四军医大学实验动物房),无眼疾,体质量200~250g,雌雄各半,排除明显的眼部疾病。

1.1.2 分组 采用电凝巩膜表面静脉法制作大鼠青光眼模型18眼,随机分为3组,每组共6眼。A组为大麻素HU-211治疗组, B组为注射用水治疗组, C组为高眼压组。随机选6只对侧眼为空白对照组。

1.1.3 药物及试剂及仪器 大麻素HU-211(上海优宁维生物科技有限公司)、手术器械及显微镜(西安医学院第二附属医院)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 100g/L的水合氯醛3mL/kg对大鼠进行腹腔注射麻醉,眼部局部采用5g/L盐酸丙美卡因滴眼液(Alcon公司)。做角巩膜缘做结膜切口,分离巩膜表面的Tenon囊,暴露巩膜血管,用小肌肉钩在眼球赤道部勾起上巩膜静脉,然后用电凝器分别电凝闭塞3支上巩膜静脉^[1,2]建立大鼠慢性高眼压模型。观察眼压1wk。

1.2.2 大鼠玻璃体腔注射 造模成功1wk后,隔日随机以32号针头距角膜缘2mm进入大鼠玻璃体腔,其中6眼注入1mg/0.1mL大麻素HU-211,6眼注入0.1mL生理盐水,6眼为高眼压组,不做处理。随机选6只对侧眼为空白对照组。

1.2.3 视网膜切片制作及RGC计数 4wk后大鼠过量麻醉致死,用显微剪沿大鼠角膜缘剪开球结膜1wk,将结膜与巩膜分离至赤道部以后,离断眼外肌,夹住视神经,剪断,取出眼球,在改良的复方固定液(950mg/L乙醇450mL,40g/L多聚甲醛50mL,冰醋酸25mL)中固定18h,常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。在距视神经中点正下方约5mm处用平推切片机进行切片,片厚度约6 μ m,每一标本切片5~6张,然后用HE染色,封片。光镜下随机选取三个视野,计数RGC,读取三张连续切片RGC数目,取平均数,摄片。

统计学分析:采用SPSS 13.0统计学软件进行数据处理。所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-*q*检验。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人工诱导大鼠高眼压模型前后各组眼压比较 造模前各组之间眼压比较差异无统计学意义($P=0.84$)。造模后各实验组较空白对照组眼压明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 用药前后各组眼压比较

($\bar{x}\pm s$, mmHg)

时间	空白对照组	A组	B组	C组
用药前	15.4 \pm 2.8	35.4 \pm 3.2	34.1 \pm 3.5	35.3 \pm 3.3
用药后1wk	16.3 \pm 2.7	25.3 \pm 3.1	34.5 \pm 3.7	34.8 \pm 3.2
用药后2wk	15.6 \pm 2.3	19.6 \pm 3.3	35.9 \pm 2.9	34.4 \pm 2.3
用药后3wk	15.1 \pm 2.9	15.4 \pm 2.8	34.1 \pm 3.5	35.3 \pm 2.9

表2 各组用药前后RGC数量计数

($\bar{x}\pm s$, 个/视野)

时间	空白对照组	A组	B组	C组
用药前	48.3 \pm 1.7	45.2 \pm 1.5	18.6 \pm 1.4	17.8 \pm 1.3
用药后1wk	49.1 \pm 1.3	44.6 \pm 1.4	17.3 \pm 1.6	15.6 \pm 1.5
用药后2wk	47.4 \pm 1.6	46.3 \pm 1.3	16.4 \pm 1.7	15.4 \pm 1.2
用药后3wk	49.2 \pm 1.4	47.1 \pm 1.4	15.1 \pm 2.1	16.8 \pm 1.7

2.2 RGC数目 B组和C组比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明玻璃体腔内注入注射用水并不能有效减少RGC的丢失。A组的RGC数目与B组及C组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见图1,表2。说明大麻素HU-211玻璃体腔内注射在一定程度上可以减少RGC的损伤和死亡。

3 讨论

青光眼是以视神经乳头和视网膜神经节细胞损伤的特异性表现及与之相对应的视野缺损为特征性疾病,目前对其病理机制的研究仍是众说纷纭。目前青光眼的治疗中,药物治疗是重要的一环。大麻素的出现,为青光眼的药物治疗拓宽了思路。大麻素类^[3]可以使一些常规疗法包括常规降眼压药物及常规手术都无法控制眼压的患者的眼内压明显下降,同时还具有视神经保护作用,而目前我们所期待的最理想的抗青光眼药物就是同时兼有降低眼压和保护视神经的双重功能,所以大麻素已经成为近几年最具有开发价值的药物。

大麻植物总共约含480多种化合物,其中一组由C、H、O组成的66种化合物才是大麻素^[4]。大麻素的化学类型分为4种:经典、非经典大麻素,氮烷基吲哚类,类花生酸类物质^[5]。目前研究已经明确的有CB1和CB2两种大麻素受体。研究者发现眼内主要为CB1受体。Straiker等^[6]发现在人的眼内如睫状肌上皮、睫状肌、睫状体血管、角膜上皮、小梁网以及Schlemm管等均有CB1受体(用抗CB1受体的免疫球蛋白)。并有研究发现,大麻素的抗青光眼作用主要是通过激活眼内的CB1受体而产生的。Straiker等^[7]发现在视网膜感觉神经层的很多区域如内外丛状层与视网膜的突触部、内核层、神经节细胞层及光感受器的外段等均有CB1受体存在EI-Remessy等^[8]和Zhuang等^[9]的研究发现WIN55,212-2和(-)- Δ 9-

tetrahydrocannabinol 均可以阻滞 NMDA 诱导的神经毒性,且可被 CB1 受体阻滞剂 SR141716A 部分阻止。有资料显示,可能因为大麻素类均含有酚结构,从而具有潜在抗氧化性质,有效保护细胞,免受谷氨酸介导的细胞死亡和氧化应激的反应^[10]。Zhuang 等^[9]用 WIN 55,212-2 阻滞 NMDA 诱导的神经细胞内 Ca²⁺ 聚集,可以有效保护神经细胞。Davies 等^[11]发现在大鼠纹状体脑片中,WIN55,212-2 可以抑制皮层-纹状体的谷氨酸能突触的传递,而 CB1 受体拮抗剂 SR141716A 可使这种作用消失。Huang 等^[12],应用膜片钳技术证实 CB1 受体的激活还可以抑制纹状体内的谷氨酸释放。Zalish 等^[13]在鼠视神经挤压伤模型中使用大麻素 HU-211,研究其对视神经的作用,发现可减少轴突变性并可以促进轴突再生。近来有文献报道,Fischer 等^[14]局部应用大麻素 THC 后发现其能减少房水生成,明显降低眼内压。

本实验设计直接将大麻素 HU-211 注入青光眼大鼠的玻璃体腔,使其能更有效的作用于眼内 CB1 受体,并减少全身使用的副作用。从实验的结果来看,HU-211 局部应用以后,可以有效的降低青光眼大鼠的眼内压,并能减少 RGC 的损伤,产生一定的视神经保护作用。在今后的研究中,通过增加药物浓度,延长用药时间,采用更直接的局部给药途径,从而加大局部的药物浓度,提高生物利用度,有望产生更好的视神经保护效果。

大麻素 HU-211 局部应用以后,可以有效的降低大鼠青光眼模型的眼内压,并能减少 RGC 的丢失,产生视神经保护作用。对慢性青光眼缓慢增高的眼压引起的 RGC 损伤产生一定的神经保护作用,但其作用机制有待于进一步探讨。

参考文献

1 Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, 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
2 Shareef SR, Garcia - Valenzuela E, Saliemo A, et al. Chronic ocular

hypertension following epscleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res* 1995;61(3):379-382
3 Pinar - Sueiro S, Rodríguez - Puertas R, Vecino E . Cannabinoid applications in glaucoma. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011;86(1):16-23
4 Elsohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids . *Life Sci* 2005;78(5):539-548
5 Jarvinen T, Pate DW, Laine K, et al. Cannabinoids in the treatment of glaucoma. *Pharmacol Ther* 2002;95(2):203-220
6 Straiker AJ, Maguire G, Mackie K, et al. Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(10):2442-2448
7 Steaiker AJ, Maguire G, Mackie K, et al. The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 decreases the intraocular pressure in human glaucoma resistant to conventional therapies. *Eur J Neurosci* 2001;13(2):409-412
8 EI - Remessy AB, Khalil IE, Matragoon S. Neuroprotective effect of (-) - Δ9 - tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N - methyl - D - aspartate - induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *Am J Pathol* 2003;163(5):1997-2008
9 Zhuang SY, Bridges D, Grigorenko E, et al. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intraocular calcium release from ryanodine - sensitive stores. *Neuropharmacology* 2005;48(8):1086-1096
10 Hampson AJ, Grimald M, Axelrodi J, et al. Cannabidiol and (-) - Δ9 - tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(14):8268-8273
11 Davies SN, Pertwee RG, Riedel G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2002;42(8):993-1007
12 Huang CC, Lo SW, Hsu KS. Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rats triatalneurons. *J Physiol* 2001;532(3):731-748
13 Zalish M, Lavie V. Dexamabinol (HU - 211) has a beneficial effect on axonal sprouting and survival after rat optic nerve crush injury. *Vision Res* 2003;43(3):237-242
14 Fischer KM, Ward DA, Hendrix DV. Effects of a topically applied 2% delta - 9 - tetrahydrocannabinol ophthalmic solution on intraocular pressure and aqueous humor flow rate in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 2013;74(2):275-280