

# 姜黄素对急性高眼压家兔的视网膜神经节细胞的保护作用

徐志刚<sup>1</sup>, 吕淑慧<sup>1</sup>, 王玉清<sup>1</sup>, 杨笑天<sup>1</sup>, 刘子瑞<sup>2</sup>

基金项目:黑龙江省卫生厅科研项目(No. 2013251)

作者单位:<sup>1</sup>(154003)中国黑龙江省佳木斯市,佳木斯大学附属第一医院眼科;<sup>2</sup>(110003)中国辽宁省沈阳市,沈阳爱尔眼科医院

作者简介:徐志刚,硕士,主治医师,研究方向:眼底病、白内障。

通讯作者:徐志刚. xuzhigang1977@163.com

收稿日期:2015-03-21 修回日期:2016-01-15

## Protective effect of curcumin for retinal ganglion cells in adult rabbits with acute intraocular hypertension

Zhi-Gang Xu<sup>1</sup>, Shu-Hui Lü<sup>1</sup>, Yu-Qing Wang<sup>1</sup>, Xiao-Tian Yang<sup>1</sup>, Zi-Rui Liu<sup>2</sup>

**Foundation item:** Scientific Research Program of Health Department in Heilongjian (No. 2013251)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjian Province, China;<sup>2</sup>Aier Eye Hospital (Shenyang), Shenyang 110003, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Zhi-Gang Xu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjian Province, China. xuzhigang1977@163.com

Received:2015-03-21 Accepted:2016-01-15

### Abstract

• **AIM:** To detect the protective effect of curcumin for retinal ganglion cells (RGCs) in adult rabbits with acute intraocular hypertension.

• **METHODS:** Twenty-four adult rabbits were divided randomly into normal control group, model group and curcumin group. Except normal control group, the rabbit model with acute ocular hypertension was established by increasing intraocular pressure through anterior chamber infusion. After the establishment of the model, rabbits in curcumin group were injected intravitreally with curcumin (0.1mg/0.1mL) for 7d. Rabbits in model group were injected with physiological saline replaced of the same volume curcumin. The oculars in normal control group without any treatments were acquired directly. The levels of Thy-1 in RGCs were detected by immunohistochemistry. The density of RGCs was counted too.

• **RESULTS:** Thy-1 expressed in the RGCs in normal control group and curcumin group had no significant difference ( $P>0.05$ ). While the difference between model

group and normal control group on Thy-1 expression was statistically significant ( $P<0.05$ ). The density of RGCs in curcumin group, normal control group and model group were  $20.3\pm 2.7$ ,  $21.5\pm 1.8$  and  $15.1\pm 2.3$  cells/HP.

• **CONCLUSION:** In this study on curcumin in adult rabbits with acute ocular hypertension, curcumin can increase the expression of Thy-1, which shows that it can partly reduce the injury of RGCs in rabbits with acute intraocular hypertension and curcumin may be able to protect the retina under certain situation.

• **KEYWORDS:** acute hyper-intraocular pressure; retinal ganglion cells; curcumin

**Citation:** Xu ZG, Lü SH, Wang YQ, *et al.* Protective effect of curcumin for retinal ganglion cells in adult rabbits with acute intraocular hypertension. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(2):231-233

### 摘要

**目的:**探讨姜黄素(Curcumin, Cur)对实验性急性高眼压家兔视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的保护作用。

**方法:**将24只家兔按照随机等分的方法分为3组,即姜黄素干预青光眼模型组(姜黄素组)、未给予姜黄素干预的青光眼模型组(青光眼组)和不经任何干预措施的正常对照组(正常组)。应用前房灌注升高眼压的方法给姜黄素组和青光眼组的家兔建立急性高眼压模型,急性高眼压模型造模成功后,给予姜黄素组家兔玻璃体腔注射比例浓度为0.1mg/0.1mL的姜黄素,青光眼组家兔玻璃体腔注射相同体积的生理盐水,每天注射1次,共7d。正常对照组不做上述任何处理直接取眼球。实验完成后,通过免疫组织化学法检测三组家兔眼球视网膜神经节细胞Thy-1的表达并计数。

**结果:**姜黄素组和正常组的视网膜神经节细胞Thy-1表达之间差异无统计学意义( $P>0.05$ );青光眼组和正常组的视网膜神经节细胞Thy-1表达差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )。姜黄素组、正常组和青光眼组的视网膜神经节细胞密度分别为 $20.3\pm 2.7$ 、 $21.5\pm 1.8$ 和 $15.1\pm 2.3$ 个/高倍视野。

**结论:**在姜黄素作用的急性高眼压模型家兔的实验中,姜黄素可以通过提高视网膜神经节细胞的Thy-1的表达,表明其在一定程度上能够降低急性高眼压状态下家兔视网膜神经节细胞的损伤,推测姜黄素可能对视网膜在特定情况下具有一定的保护作用。

**关键词:**急性高眼压;视网膜神经节细胞;姜黄素

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.2.08

引用:徐志刚,吕淑慧,王玉清,等.姜黄素对急性高眼压家兔的视网膜神经节细胞的保护作用.国际眼科杂志 2016;16(2):231-233

## 0 引言

根据世界国际卫生组织公布的数字显示:截止到2010年,全世界青光眼患者人数已经达到6 050多万,到2020年此数字将上升到7 960多万<sup>[1]</sup>。因青光眼引起双眼失明的患者占盲人总数将近一半,目前就全球眼科疾病的致盲率来看,白内障位于第一位,位居第二位的就是青光眼。然而对青光眼来说,虽然可以采取传统的滤过性手术和降眼压药物来降低眼压,以此来控制青光眼对视力的进一步损害,但是对青光眼发病以来造成的视力丧失部分却是不可恢复的。所以把青光眼定义为是不可逆性地致盲性眼病,而且它是以视神经损害和特征性视野缺损为共同特征的眼病<sup>[2]</sup>。经过长期的临床观察研究发现,有相当部分的患者无论是药物治疗还是手术治疗控制眼压,还是未能控制病情的发展。所以对于青光眼的临床治疗,在现阶段除了积极控制眼压外,眼科医生还应该积极探索对视神经保护的治疗方法。Thy-1抗原是一种糖蛋白,主要存在于啮齿类动物细胞表面,被公认为是成熟RG-Cs的标志。近几年的实验研究中,由于Thy-1作为一种经典的RGCs特异性标记物,已被广泛用于RGCs的分离纯化和标记鉴定。

姜黄素(Curcumin)是从植物姜黄的根茎中提取出来的发挥药理作用的有效成分,这种中药材含有多效的天然活性物质,还是略带酸性的酚类物质。现代医学在古代研究的基础上又发现了姜黄素还有很多的药理功效,如抗肿瘤、抗纤维化、抗炎、抗突变、抗氧化、抗微生物、抗动脉粥样硬化、降血脂等诸多药理作用<sup>[3]</sup>。近几年来研究发现,姜黄素保护神经的作用是通过多种多样的方式,使得姜黄素在眼科研究领域得到广泛应用,并且考虑到姜黄素成本低廉、使用安全,将会对青光眼的预防和治疗上带来前所未有的光明前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康家兔24只,由佳木斯大学动物实验中心提供,实验设备及实验动物均符合国家技术委员会的《实验动物管理条例》,体质量1.5~2.5kg,雄雌各半,应用前在充足的阳光和良好的饲料条件下饲养7d,观察家兔无生长问题后,用裂隙灯显微镜、间接检眼镜等常规眼科检查,检查家兔眼球,达到屈光间质清晰,眼底正常。主要仪器:石蜡切片机(德国Leica公司),图像分析仪(德国Leica公司)。主要试剂:人抗兔Thy-1抗体(武汉博士德生物工程公司),DAB显色剂(武汉博士德生物工程公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组

对24只家兔随机分为3组,每组16只眼球:(1)正常眼对照组(正常组);(2)姜黄素干预青光眼模型组(姜黄素组);(3)未干预青光眼模型组(青光眼组)。

#### 1.2.2 家兔急性高眼压模型的建立方法

应用托吡卡胺滴眼液散大瞳孔,抗生素滴眼液滴右眼,5min后用1%丁卡因滴同一眼,无菌碘伏消毒,5号头皮针与生理盐水输

液瓶连接,将针头延角膜缘从鼻上方避开晶状体和虹膜刺入家兔前房,此时将灌注液的流量调至最大,仔细观察家兔眼球表面的变化,当观察到虹膜迅速变白、球结膜苍白、间接检眼镜观察视网膜苍白水肿、莫非氏管中无液体滴注时,说明急性高眼压模型建立已成功,此时视网膜中央动脉的供血被完全中断。固定针头,检查穿刺口有无漏水,数分钟后可见角膜水肿呈雾状。持续加压60min,实验过程中保持家兔体温维持在36.5℃~37℃,并间断给家兔术眼滴抗生素眼药水以预防感染和保持角膜干燥。60min后缓慢地降低输液瓶高度与术眼持平,可见加压的虹膜血管供血及球结膜逐渐恢复正常,检眼镜可观察到视网膜呈橘红色,证明阻断的视网膜中央动脉又重新开放,缺血再灌注已形成,遂拔出针头<sup>[4]</sup>。同法对左眼进行造模。术后剔除的标准:前房不能形成;针头误伤晶状体形成白内障家兔;穿刺口漏水;前房明显积血。

#### 1.2.3 给药方法

将上述配好的姜黄素取出解冻,在急性高眼压的模型成功后,在间接检眼镜观察下,用1mL注射器抽取之前配好的姜黄素用时摇匀,并用7号针头于角膜缘后4mm的巩膜处进行穿刺,并向玻璃体腔中部注入0.1mg/0.1mL姜黄素0.1mL,每天1次,共7d。青光眼组按照上述相同方法对家兔玻璃体给予相同体积的生理盐水代替。术后涂氧氟沙星眼膏预防感染。术毕将家兔送回兔笼,各组饲养条件相同。

#### 1.2.4 标本采集和免疫组织化学法步骤

各组家兔于术后第7d从饲养笼内取出,用大注射器经耳缘静脉注射空气,造成空气栓塞处死家兔,立即用显微器械摘除眼球,然后泡在4%多聚甲醛溶液和PBS缓冲液1:9组成的固定液中固定1h后,在沿着角巩膜缘处用显微剪剪去角膜,除去虹膜和晶状体,尽可能取净玻璃体后留取视网膜,将取出的视网膜放于装有固定液的小瓶中保存。石蜡包埋、切片、烤片后,脱蜡至水化,抗原修复后加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育30min(室温),加一抗、二抗孵育后,DAB显色,苏木素复染,然后脱水、中性树脂封片。取待测视网膜切片,三组均留取以后极部为中点的视网膜,并且在每个选取的视网膜上随机取5个高倍视野,分别统计Thy-1抗体阳性细胞计数均数为该区域阳性细胞数/高倍视野。

统计学分析:应用SPSS 19.0统计分析软件对所得出的实验数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三个实验组指标比较采用独立样本 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

由于Thy-1只存在于视网膜的视网膜神经节细胞层,所以其主要在胞浆中着色(图1)。Thy-1在姜黄素组和青光眼模型组中家兔视网膜神经节细胞中的表达见图2、3。统计标记RGCs计数:正常对照组Thy-1为 $21.5 \pm 1.8$ 个/高倍视野,姜黄素组为 $20.3 \pm 2.7$ 个/高倍视野,青光眼模型组为 $15.1 \pm 2.3$ 个/高倍视野。正常对照组、姜黄素干预青光眼模型组、未干预青光眼模型组的RGCs计数两两比较,正常对照组和未干预青光眼模型组视网膜神经节细胞差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ );正常对照组和姜黄素干预青光眼模型组之间差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。

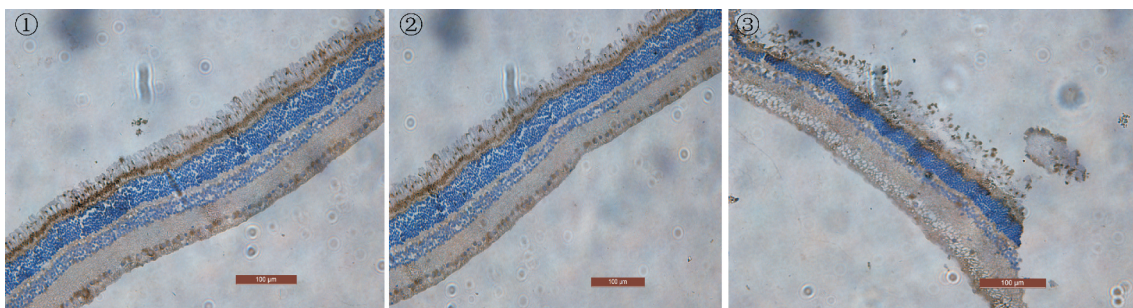


图1 Thy-1 在正常组家兔视网膜神经节细胞中的表达。

图2 Thy-1 在姜黄素组家兔视网膜神经节细胞中的表达。

图3 Thy-1 在青光眼模型组家兔视网膜神经节细胞中的表达。

### 3 讨论

本实验制备家兔急性高眼压模型,采用前房灌注生理盐水方法来观察姜黄素对急性高眼压模型的家兔眼球视网膜神经节细胞的影响作用。实验结果表明,姜黄素经家兔玻璃体腔注射后,较好地保护了家兔视网膜神经节细胞的数量和形态,明显减轻了视网膜的形态结构变化和视网膜内核层厚度的损伤,提示姜黄素对急性高眼压的家兔视网膜神经节细胞具有一定的保护作用<sup>[5]</sup>。

近几年的实验研究中,由于 Thy-1 作为一种经典的 RGCs 特异性标记物,已被广泛用于 RGCs 的分离纯化和标记鉴定。Thy-1 阳性细胞仅存在于视网膜的神经节细胞中,并且主要在胞浆中染色。Thy-1 阳性细胞在视网膜的切片上分布是不均匀的,在后极部的密度高,越靠近视网膜周边部阳性率越低。所以本实验均选取各组视网膜上后极部的神经节细胞分析。

目前比较公认的对于青光眼的定义是,青光眼导致的视神经损害属于一种神经变性损害,它是由于多因素共同作用的结果,但主要由两方面因素即升高的眼压和低血流灌注引起的,是一种导致视神经损害,又不能恢复由于损害视神经导致的视力丧失的致盲性眼病。对于临床常见的高眼压且伴有视盘和视野损害的患者,虽然采取常规的降眼压药物和滤过性手术治疗可以使眼压降到正常范围内,但也只能控制约 70% 患者病情发展,其余 30% 患者视盘和视野损害仍会继续<sup>[6]</sup>。因此,降低眼压与青光眼的病程发展与否并非存在着绝对关系,要想完全控制青光眼,单纯地降低眼压治疗是远远不够的。从非常多的临床症状表明,高眼压并非导致青光眼的唯一病因。除此之外,还有糖尿病、高血压、年龄、种族、血管疾病、家族史等,以及一些尚未被发现的危险因素<sup>[7]</sup>。归纳导致青光眼的发病因素有:眼压因素、非眼压因素、多个危险因素的共同参与和共同作用。总而言之,由青光眼造成的视野和视神经损害来源于包括高眼压在内的多种多样的危险因素。因此在青光眼的治疗中,除了常规的滤过性手术和降眼压药物治疗来降低眼压外,同时还应采取改善视神经血液供应的治疗,并且应用自由基清除剂、神经营养因子及谷氨酸受体阻滞剂等<sup>[8]</sup>。经研究发现,从植物中提取的某些有

效成分不仅能对青光眼视神经进行保护,还能够有效地降低眼压,对恢复视功能等方面也起到了重要作用。

姜黄素含有多效的天然活性物,已有报道证实,姜黄素不仅具有抗血小板聚集导致的血栓形成和抵抗肾损害等作用,而且还可以拮抗细胞因子和炎性介质及核因子,这是通过姜黄素的拟肾上腺糖皮质激素样作用完成的。对姜黄素研究的热点是,其被用于治疗阿尔海默茨病,即老年痴呆,这种疾病证实与青光眼的发病机制上有很多相似之处,这一研究领域涉及的范围也越来越广泛。本实验也是在众多的研究领域中抽出一个分支,以研究姜黄素对视网膜神经变性疾病是否具有保护作用。姜黄素的神经保护作用体现在多通路上,既能清除氧自由基又能抗氧化作用;不仅能抗老化作用,还具有抗炎作用(经细胞凋亡途径作用);还有抗谷氨酰胺兴奋性毒性作用;还能在成年神经发生和干细胞神经分化中起作用等<sup>[9]</sup>。

#### 参考文献

- Musch DC, Gillespie BW, Niziol M, *et al.* Intraocular Pressure Control and Long-term Visual Field Loss in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study. *Ophthalmology* 2011;118(9):1766-1773
- Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide In 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006;90(3):262-267
- 周刚,王继峰,牛建昭,等.姜黄素抗肺纤维化大鼠细胞外基质过度形成的实验研究. *中国中药杂志* 2006;31(7):570-573
- Ji J, Chang P, Pennesi ME, *et al.* Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Res* 2005;45(2):169-179
- 安建斌,马景学,刘丹岩,等.姜黄素兔眼玻璃体内注射后眼内毒副作用研究. *眼视光学杂志* 2008;10(4):277-280
- Parrish RK 2nd, Feuer WJ, Schiffman JC, *et al.* Five-year Follow-up Optic Disc Findings of the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study. *Am J Ophthalmol* 2009;147(4):717-724
- Rahman MM, Park HM, Kim SJ, *et al.* Taurine Prevents hypertension and increase exercise capacity in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hyperten S* 2011;24(5):574-581
- Niu LG, Zhang MS, Liu Y, *et al.* Vasorelaxant effect of taurine is Diminished by tetraethyl ammonium in rat isolated arterioles. *Eur J Pharmacol* 2008;580(1-2):169-174
- 黄映红,刘晓成,黄征宇,等.姜黄素对大鼠糖尿病肾的实验研究. *中国现代医学杂志* 2004;14(7):94-97