

# 神经生长因子联合银杏叶提取物对兔急性青光眼视网膜缺血再灌注损伤的保护作用

李岳美<sup>1</sup>, 李庆和<sup>2</sup>, 郑新华<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(467000)中国河南省平顶山市,平顶山学院病理学与病理生理学教研室;<sup>2</sup>(467000)中国河南省平顶山市,解放军152医院眼科

作者简介:李岳美,毕业于郑州大学病理学与病理生理学专业,硕士研究生,讲师,研究方向:神经干细胞。

通讯作者:郑新华,硕士研究生,副教授,系主任,研究方向:细胞凋亡机制研究.911412402@qq.com

收稿日期:2017-02-28 修回日期:2017-08-02

## Protective effect of nerve growth factor associated with ginkgo biloba extraction on acute glaucoma retinal ischemia reperfusion injury in rabbit

Yue-Mei Li<sup>1</sup>, Qing-He Li<sup>2</sup>, Xin-Hua Zheng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Teaching and Research Section of Pathology and Pathological Physiology, Pingdingshan Medical College, Pingdingshan 467000, Henan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, No. 152 Central Hospital of Chinese People's Liberation Army, Pingdingshan 467000, Henan Province, China

**Correspondence to:** Xin - Hua Zheng. Teaching and Research Section of Pathology and Pathological Physiology, Pingdingshan Medical College, Pingdingshan 467000, Henan Province, China. 911412402@qq.com

Received:2017-02-28 Accepted:2017-08-02

### Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of nerve growth factor combined with Ginkgo biloba extract on retinal ischemia - reperfusion (RIR) injury in rabbits with experimental high intraocular pressure.

• **METHODS:** Establishment of rabbit glaucoma ischemia reperfusion model. Twenty - four New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: nerve growth factor group, Ginkgo biloba extract group and combination group. Respectively, in the continuous administration of 1, 7, 14d. We observed the morphological changes of the tissues of the retina. The levels of superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) in retinal tissue were measured.

• **RESULTS:** Respectively, first, in the continuous administration of 1, 7, 14d, the contents of MDA and NO in Ginkgo biloba extract group and nerve growth group were higher than that in combination group ( $P < 0.05$ ). Secondly, the SOD content of Ginkgo biloba extract

group and nerve growth group were lower than that of combination group at each time point ( $P < 0.05$ ). At each time point, the number of HE staining of retinal ganglion cells (RGCs) showed that the loss of RGCs in the combination group was significantly lower than that in the other groups, and the ganglion cell count showed that the Ginkgo biloba extract group and the neuronal growth group were lower ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Nerve growth factor combined with Ginkgo biloba extract has better protective effect on retinal ischemia-reperfusion injury. The mechanism may be related to the decrease of free radicals and increase the activity of SOD in retinal tissue.

• **KEYWORDS:** nerve growth factor; ginkgo biloba extraction; glaucoma; ischemia - reperfusion injury; retinal ganglion cells

**Citation:** Li YM, Li QH, Zheng XH. Protective effect of nerve growth factor associated with ginkgo biloba extraction on acute glaucoma retinal ischemia reperfusion injury in rabbit. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(9):1635-1638

### 摘要

**目的:**探讨神经生长因子联合银杏叶提取物对兔实验性高眼压视网膜缺血再灌注 (retinal ischemia reperfusion, RIR) 损伤的保护作用。

**方法:**建立兔青光眼缺血再灌注模型,72只新西兰大白兔随机分为神经生长因子组(A组)、银杏叶提取物组(B组)和联合用药组(C组)。分别在持续给药1、7、14d,光镜下观察视网膜各层组织形态学改变,测定视网膜组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 浓度变化。

**结果:**在持续给药1、7、14d,银杏叶提取物组、神经生长因子组的MDA含量和NO含量均高于联合用药组 ( $P < 0.05$ );各时间点,银杏叶提取物组、神经生长因子组的SOD含量均低于联合用药组 ( $P < 0.05$ )。HE染色视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 计数结果显示,联合用药组RGCs的丢失较其他组明显减少,各时间点银杏叶提取物组、神经生长因子组的RGCs计数均低于联合用药组 ( $P < 0.05$ )。

**结论:**神经生长因子联合银杏叶提取物对RIR损伤具有更好更持久的保护作用,机制可能与其降低自由基的大量产生,以及其增加视网膜组织中SOD含量和活性有关。

**关键词:**神经生长因子;银杏叶提取物;青光眼;缺血再灌注损伤;视网膜神经节细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.9.07

引用:李岳美,李庆和,郑新华.神经生长因子联合银杏叶提取物对兔急性青光视网膜缺血再灌注损伤的保护作用.国际眼科杂志 2017;17(9):1635-1638

## 0 引言

青光眼(glaucoma)是第二致盲眼病。疾病过程中视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)凋亡是造成视功能进行性不可逆性损害的主要原因,目前治疗方法主要是降眼压治疗。急性降眼压过程如前房穿刺可以恢复视网膜的血流,有效降低高眼压对视神经的损伤,然而在降眼压过程中可能会造成更严重损伤——视网膜缺血再灌注(retinal ischemia reperfusion,RIR)损伤。而RIR损伤可造成大量自由基产生,从而造成更多神经节细胞凋亡。因此,目前RGCs的保护性研究成为基础和临床的研究热点。氧化应激损伤是导致RGCs凋亡的主要病理生理学机制<sup>[1]</sup>。研究显示,外源性神经生长因子(nerve growth factor,NGF)可以抑制青光眼RGCs的凋亡<sup>[2]</sup>,并促进其损伤后的修复,有利于改善患者视野<sup>[3]</sup>。银杏叶提取物(ginkgo biloba extraction,GBE)能延缓和减少实验性<sup>[4]</sup>和临床<sup>[5]</sup>高眼压下RGCs的凋亡,保护青光眼患者的视野<sup>[6]</sup>。本实验旨在初步探讨两者联合应用是否对兔青光眼RIR损伤具有更好的保护作用,为临床治疗青光眼提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年新西兰大白兔72只(雌雄不限,新乡医学院实验动物中心提供),体质量2.0~2.5kg,眼压10~21mmHg<sup>[7]</sup>,双眼眼压差小于5mmHg,饲养在正常的昼夜环境中,饲养室温20℃~25℃,空气流通,相对湿度55%~75%,自由摄食饮水。实验前经裂隙灯和眼底镜检查眼部均无异常,眼压计测量排除高眼压。本实验符合动物保护条例。

1.1.2 主要药品和试剂 鼠神经生长因子注射液[舒泰神(北京)生物制药股份有限公司,每支30μg],银杏叶提取物注射液[(金纳多)购自德国威玛舒培博士药厂,每支含GBE 17.5mg,银杏黄酮甙4.2mg],NO分析试剂盒(南京建成生物工程研究所),SOD分析试剂盒(南京建成生物工程研究所),MDA分析试剂盒(南京建成生物工程研究所),Schiotz压陷式眼压计(苏州医疗器械厂生产,YZ2A型),裂隙灯显微镜(日本Topcon BQ-900)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 3%戊巴比妥钠(30mg/kg)兔耳缘静脉注射麻醉,麻醉成功后采用单眼玻璃体内灌注法(乳酸钠林格注射液)建立动物青光眼模型,当可见球结膜苍白,瞳孔红光反射消失;眼底镜(+8~+10D)可见眼底视网膜血管断流,仅见视盘处个别大血管,视网膜苍白时维持60min后,逐渐降低输液瓶高度达眼水平,瞳孔复现红光反射,视网膜血流恢复,证明RIR损伤模型建立成功。

1.2.2 动物分组和处理 新西兰大白兔72只随机分为神经生长因子组(A组)、银杏叶提取物组(B组)和联合用药组(C组),每组24只;均用药1wk后开始造模,造模

表1 各组视网膜组织中MDA含量 ( $\bar{x}\pm s$ ,nmol/mg·prot)

| 分组      | 给药时间        |             |              |
|---------|-------------|-------------|--------------|
|         | 1d          | 7d          | 14d          |
| 银杏叶提取物组 | 5.880±1.158 | 9.646±1.527 | 15.225±1.623 |
| 神经生长因子组 | 5.887±1.070 | 9.540±1.360 | 15.207±1.499 |
| 联合用药组   | 2.528±0.904 | 2.887±1.199 | 3.199±1.264  |

成功后并继续给药,各组又根据持续给药时间分为1、7、14d组,给药结束后采用耳缘静脉空气栓塞法处死并取出眼球。

### 1.2.3 给药方法和剂量

1.2.3.1 A组和C组 双眼玻璃体腔注射(200μg/mL)神经生长因子0.05mL,同时经前房穿刺抽出等量房水以保持眼内压平衡,每日1次。

1.2.3.2 B组和C组 耳缘静脉注射银杏叶注射液10mL,每日1次。

1.2.4 指标检测和形态学分析 采用耳缘静脉注射空气(10~15mL),空气栓塞法处死兔并取出眼球后,立即沿矢状位从6:00~12:00处切开眼球,前后极分别通过视神经和角膜中心,小心剥离一半视网膜并置于无菌试管中,捣碎并离心后取上清液,应用分光光度计分别测量各组视网膜组织中一氧化氮(NO,硝酸还原酶法)、超氧化物歧化酶(SOD,黄嘌呤氧化酶法)和丙二醛(MDA,硫代巴比妥酸法)浓度。另一半用10%中性甲醛溶液固定后,无水乙醇脱水并用石蜡包埋,做常规石蜡切片进行HE染色。应用图像分析系统测量各组HE染片中RGCs数量。

统计学分析:所有数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用SPSS13.0统计软件进行分析。所有数据均经正态性检验和方差齐性检验后,采用重复测量资料的方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组视网膜组织中MDA含量测定 MDA含量在不同时间点差异有统计学意义( $F=221.401,P<0.05$ ),不同研究组的MDA含量差异也有统计学意义( $F=362.015,P<0.05$ )。各个时间点,银杏叶提取物组、神经生长因子组的MDA含量均高于联合用药组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),银杏叶提取物组和神经生长因子组之间的差异均无统计学意义( $P_1=0.982,P_7=0.738,P_{14}=0.927$ );银杏叶提取物组各时间点的MDA含量差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),神经生长因子组各时间点的MDA含量差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),联合用药组各时间点间的差异均无统计学意义( $P_{1-7}=0.446,P_{1-14}=0.188,P_{7-14}=0.559$ ,表1)。缺血再灌注损伤过程产生大量的氧自由基MDA,而NGF与银杏叶提取物具有抗氧化作用,研究结果说明,联合用药在视神经缺血再灌注损伤的保护作用方面优于单药组,且保护效果在一定时间更稳定。

2.2 各组视网膜组织中SOD活性的测定 SOD含量在不同时间点差异有统计学意义( $F=213.311,P<0.05$ ),不同研究组的SOD含量差异也有统计学意义( $F=124.625,P<0.05$ )。各个时间点,银杏叶提取物组、神经生长因子组的SOD含量均低于联合用药组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),银杏叶提取物组和神经生长因子组

表2 各组视网膜组织中 SOD 含量测定 ( $\bar{x} \pm s$ , Nu/mg · prot)

| 分组      | 给药时间           |                |                |
|---------|----------------|----------------|----------------|
|         | 1d             | 7d             | 14d            |
| 银杏叶提取物组 | 113.864±13.739 | 68.320±11.628  | 40.342±8.146   |
| 神经生长因子组 | 112.866±13.616 | 67.369±11.607  | 40.480±7.557   |
| 联合用药组   | 143.349±14.244 | 139.183±13.226 | 142.632±13.281 |

表3 各组视网膜组织中 NO 含量测定 ( $\bar{x} \pm s$ , nmol/mg · prot)

| 分组      | 给药时间        |              |              |
|---------|-------------|--------------|--------------|
|         | 1d          | 7d           | 14d          |
| 银杏叶提取物组 | 7.843±1.307 | 12.690±1.015 | 20.243±1.126 |
| 神经生长因子组 | 7.749±1.167 | 11.580±0.950 | 18.928±0.877 |
| 联合用药组   | 3.797±1.784 | 4.425±0.632  | 4.871±0.701  |

表4 各组视网膜神经节细胞计数 ( $\bar{x} \pm s$ , 个/10 格)

| 分组      | 给药时间         |              |              |
|---------|--------------|--------------|--------------|
|         | 1d           | 7d           | 14d          |
| 银杏叶提取物组 | 14.330±2.582 | 11.170±1.941 | 8.000±1.414  |
| 神经生长因子组 | 14.830±2.787 | 10.830±2.927 | 6.830±2.229  |
| 联合用药组   | 19.670±1.633 | 19.330±2.733 | 19.170±2.401 |

之间的差异均无统计学意义 ( $P_1 = 0.876, P_7 = 0.464, P_{14} = 0.269$ ); 银杏叶提取物组各时间点的 SOD 含量差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 神经生长因子组各时间点的 SOD 含量差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 联合用药组各时间点间的差异均无统计学意义 ( $P_{1-7} = 0.231, P_{1-14} = 0.146, P_{7-14} = 0.431$ , 表 2)。缺血再灌注损伤过程产生大量的氧自由基而消耗大量组织中 SOD, 而 NGF 与银杏叶提取物具有抗氧化作用, 联合用药能有效保存组织中 SOD 含量。

**2.3 各组视网膜组织中 NO 含量测定** NO 含量在不同时间点差异有统计学意义 ( $F = 434.899, P < 0.05$ ), 不同研究组的 NO 含量差异也有统计学意义 ( $F = 341.268, P < 0.05$ )。各时间点银杏叶提取物组、神经生长因子组的 NO 含量均高于联合用药组 ( $P < 0.05$ ), 银杏叶提取物组和神经生长因子组之间的 NO 含量差异均无统计学意义 ( $P_1 = 0.569, P_7 = 0.324, P_{14} = 0.129$ ); 银杏叶提取物组各时间点的 NO 含量差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 神经生长因子组各时间点的 NO 含量差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 联合用药组各时间点间的差异均无统计学意义 ( $P_{1-7} = 0.446, P_{7-14} = 0.560, P_{1-14} = 0.188$ , 表 3)。缺血再灌注损伤过程产生大量的氧自由基 NO, 而 NGF 与银杏叶提取物具有抗氧化作用, 联合用药在视神经缺血再灌注损伤的保护作用方面优于单药组。

**2.4 各组视网膜神经节细胞计数** RGCs 计数在不同时间点差异有统计学意义 ( $F = 812.410, P < 0.05$ ), 不同研究组的 RGCs 计数差异也有统计学意义 ( $F = 51.246, P < 0.05$ )。各个时间点, 银杏叶提取物组、神经生长因子组的 RGCs 计数均低于联合用药组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 银杏叶提取物组和神经生长因子组之间的差异均无统计学意义 ( $P_1 = 0.894, P_7 = 0.789, P_{14} = 0.195$ ); 银杏叶提取物组各时间点的 RGCs 计数差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 神经生长因子组各时间点的 RGCs 计数差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 联合用药组各时间点间的差异均无统计学意义 ( $P_{1-7} = 0.683, P_{1-14} = 0.563$ ,

$P_{7-14} = 0.863$ , 表 4)。视网膜缺血可导致神经节细胞不可逆坏死, 而缺血再灌注损伤可导致 RGCs 的凋亡, 加重降眼压后组织损伤, 联合用药明显降低组织中氧自由基含量, 减少神经节细胞凋亡。

### 3 讨论

缺血再灌注损伤是青光眼、视网膜血管阻塞等眼病常见的病理损伤机制。寻找动物模型是研究缺血再灌注损伤的基础, Buchi 等<sup>[8]</sup>进行模型研究并认为, 增高眼内压和降眼压治疗引起的视网膜损伤是由于缺血再灌注损伤所致, 而非单独眼内压力所致, 据此我们采用升高兔眼内压致视网膜血管断流以建立 RIR 损伤模型, 是目前许多实验者进行 RIR 损伤所普遍采用的方法<sup>[9]</sup>。缺血再灌注损伤过程产生大量的氧自由基, 视网膜神经节细胞含有大量的多价不饱和脂肪酸, 脂肪酸过氧化时主要的代谢产物是 MDA 和 NO, MDA 和 NO 两个指标可较精确地反映 RIR 后体内的变化情况。

NGF 是最早被纯化并确定分子结构的典型神经营养因子, 能够促进神经细胞生长、发育、分化和轴突生长。在病理状态下, 不仅能保护神经元、抑制神经元的凋亡, 而且还能增强神经细胞对环境的适应能力。近年来 NGF 在临床青光眼治疗中体现出良好的保护作用<sup>[10-11]</sup>。GBE 是银杏叶经加工制成的灭菌水溶液。实验表明, 银杏叶提取物可以有效保护线粒体, 促进 ATP 的产生, 并对过氧化物和 NO 具有清除功能<sup>[12]</sup>; 实验证明青光眼中缺血因素占有重要地位<sup>[13]</sup>, 而 GBE 具有扩张血管改善微循环的作用, 且可抗氧化和抑制凋亡作用<sup>[14]</sup>。

本实验中联合用药组各时间点视网膜组织中 MDA 和 NO 维持在较低水平, SOD 和神经节细胞计数维持在较高水平, 各时间点间无明显统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 联合用药组中各时间点所测四组指标与单药组相比均有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。研究结果说明, NGF 与银杏叶提取物两种药物在视神经缺血再灌注损伤的保护作用方面优于单药组, 且保护效果在一定时间更稳定。

本研究表明, 缺血再灌注损伤是以缺血性损伤为前提, 所以减轻缺血性损伤和提高再灌注组织的适应能力均能降低缺血再灌注损伤, 而 GBE 具有改善微循环、清除自由基、抑制细胞凋亡的作用, NGF 能促进神经细胞轴突再生和增强神经节细胞适应环境的能力, 因此二者联合用药能通过多环节减轻缺血再灌注损伤, 保护神经元。赵竞等<sup>[15]</sup>研究发现, GBE 可能通过促进 NGF 的表达起保护神经细胞的作用。另外, 本实验中 GBE 与 NGF 联合用药对神经的保护作用与罗宏伟等<sup>[16]</sup>的临床研究相吻合。

研究总结, 缺血再灌注损伤过程产生大量的氧自由基 MDA 和 NO, 而 NGF 与银杏叶提取物具有抗氧化作用。研究结果说明, 联合用药在视神经缺血再灌注损伤的保护作用方面优于单药组, 且保护效果在一定时间更稳定。缺血再灌注损伤过程产生大量的氧自由基消耗大量 SOD, 而 NGF 与银杏叶提取物具有抗氧化作用, 有效保存组织中 SOD 含量。视网膜缺血可导致神经节细胞不可逆坏死, 而缺血再灌注损伤可导致 RGCs 的凋亡, 加重降眼压后组织损伤, 联合用药明显降低组织中氧自由基含量, 减少神经节细胞凋亡。

本实验证明, 在急性青光眼的早期降眼压治疗过程中, 两种药物联合应用通过降低组织中氧化应激因子产

生,可有效降低 RIR 损伤,对组织具有保护作用,但是否有其他因素参与及停药后的作用是否持久需要进一步研究。

#### 参考文献

- 1 叶长华,蒋幼芹. 青光眼视网膜神经节细胞凋亡的预防. 国外医学眼科分册 2000;24(2):71-74
- 2 陆志荣,管怀进,程新梁,等. 神经生长因子  $\beta$  对兔实验性青光眼视网膜神经节细胞的保护作用. 江苏医药 2006;32(8):760-762
- 3 蒋艳华. 神经生长因子对青光眼的保护作用与机制探讨. 医学综述 2015;21(21):4020-4021
- 4 赵桂秋,孙为荣,杨湘娟,等. 急性高眼压状态视网膜自由基损伤的动物实验. 中华眼科杂志 1993;29(5):293-295
- 5 李海龙,李红. 银杏叶提取物对大鼠持续高眼压下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
- 6 张跃红. 银杏叶治疗原发性开角型青光眼的临床观察. 中医临床研究 2012;4(4):22-23
- 7 张宗端. 实验性高眼压模型研究进展. 眼视光学杂志 2001;3(4):246-249
- 8 Buchi ER, Suivaizdis I, Fu J. Pressure induced retinal ischemia in rat: an experimental model for quantative study. *Ophthalmologica* 1991;203(3):138-147

- 9 Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, *et al.* Protection of the transiently ischemia cat retinal by zinc - desferrioxamine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(3):1212-1222
- 10 吴仁毅,黄昌全,吕洁璇,等. 神经生长因子凝胶对青光眼视神经保护的初步临床评价. 国际眼科杂志 2015;15(2):255-258
- 11 孟佳,郝燕燕. 神经生长因子对青光眼视神经保护的临床观察. 中国实用医刊 2010;37(9):29-30
- 12 范光忠,贺翔. 银杏叶对兔实验性高眼压损伤的保护作用. 中国药理学杂志 2001;36(3):201-202
- 13 Leidig S, Michelson G. Influence of the calcium antagonist nimodipine on the vasoconstrictive effect of breathing 100% oxygen on retinal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(9):62-72
- 14 刘国辉,卢佳怡,李建华. 银杏提取物对大鼠肝缺血再灌注损伤 CO 和 ET 含量及凋亡相关蛋白 Bcl-2 的影响. 临床医学工程 2013;20(4):415-416
- 15 赵竞,金可可,吴亮,等. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠学习记忆能力及海马神经元 NGF、NT-3 表达的影响. 中国应用生理学杂志 2012;28(5):467-471
- 16 罗宏伟,李玉环,李阳阳,等. 银杏叶提取物注射液联合鼠神经生长因子治疗突发性耳聋 56 例. 中国药业 2014;23(10):71-72