

银杏叶提取物对兔视神经夹伤后视网膜视神经节细胞的保护作用

乔 锋¹, 刘永霞², 刘金华³, 蒋力平¹, 成云翠¹

作者单位:¹(421001)中国湖南省衡阳市中心医院眼科;²(421001)中国湖南省衡阳市,南华大学;³(530021)中国广西壮族自治区南宁市,广西医科大学第一附属医院眼科中心

作者简介:乔锋,男,硕士,主治医师,研究方向:青光眼及眼外伤。

通讯作者:乔锋. qiaofeng_eye@163.com

收稿日期:2010-01-15 修回日期:2010-03-03

Preventive effects of extract of ginkgo biloba on retinal ganglion cells after optic nerve crush injury in rabbits

Feng Qiao¹, Yong-Xia Liu², Jin-Hua Liu³, Li-Ping Jiang¹, Yun-Cui Cheng¹

¹Department of Ophthalmology, Central Hospital of Hengyang, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ²Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ³Eye Center, the 1st Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Feng Qiao. Department of Ophthalmology, Central Hospital of Hengyang, Hengyang 421001, Hunan Province, China. qiaofeng_eye@163.com

Received:2010-01-15 Accepted:2010-03-03

Abstract

• **AIM:** To observe the protective effect of EGb761 on retinal ganglion cells (RGC) in rabbits with optic nerve crush injury by myelin basic protein (MBP) in rabbits' retina.

• **METHODS:** Twenty-four rabbits were divided into experimental (right eye) and control (left eye) groups. The rabbits' optic nerves were crushed by mini-vascular nip. EGb761 60mg/kg were injected into the retrobulbar of right eye and the same volume balanced saline solution (BSS) were injected into the retrobulbar of left eye. 4, 7 and 14 days after injury, the number of the RGC was counted by image analysis system, and the immunohistochemical staining of the MBP was observed.

• **RESULTS:** Three to fourteen days after injury, the number of RGC in the experimental group and control group were lower than that in normal by microscope. The differences were significant ($P < 0.01$); the number of RGC in experimental group was higher than that in the control group. The difference was significant ($P < 0.01$); the results of immunohistochemical staining; expression of MBP in both experimental group and control group were gradually decreased after injury. The expression of MBP in experimental group was less apparent than that in

BSS group and decreased obviously at 14 days, while the expression of MBP in BSS group was still obvious at 14 days. The positive rates of RGC in different durations of experimental group were lower than those in the BSS group. The differences were significant ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** EGb761 can reduce the content of MBP increase, the survival rate of RGC and may have the protective effect in preventing RGC from degeneration.

• **KEYWORDS:** EGb761; retinal ganglion cell; optic nerve crush injury; rabbit; myelin basic protein

Qiao F, Liu YX, Liu JH, et al. Preventive effects of extract of ginkgo biloba on retinal ganglion cells after optic nerve crush injury in rabbits. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010; 10 (4): 653-655

摘要

目的:研究 EGb761 对视神经夹伤后兔视网膜视神经节细胞(RGC)的保护作用。

方法:大白兔 24 只,右眼为实验组,左眼为对照组,制作视神经夹伤模型。右眼球后注射 EGb761 (60mg/kg),左眼球后注射等容量平衡盐液 BSS。于伤后 4, 7, 14d 取材,应用病理图像分析仪计数 RGC;并进行髓鞘碱性蛋白(MBP)的免疫组化染色分析。

结果:伤后 3 ~ 14d,两组 RGC 数目均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);实验组 RGC 数目明显高于盐水组,差异有统计学意义($P < 0.01$);伤后两组均有 MBP 阳性表达,BSS 组表现为强阳性;实验组 MBP 表达呈下降趋势,14d 表达呈弱阳性;BSS 组表达也随时间有所减弱,但 14d 时表达仍明显;不同时间点实验组 RGC 阳性率均低于 BSS 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

结论:EGb761 能降低视神经夹伤后 MBP 的含量,提高 RGC 的存活数量。

关键词:EGb761;视网膜神经节细胞;视神经夹伤;兔;髓鞘碱性蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.013

乔锋,刘永霞,刘金华,等.银杏叶提取物对兔视神经夹伤后视网膜视神经节细胞的保护作用.国际眼科杂志.2010;10(4):653-655

0 引言

视神经损伤是常见的眼外伤,主要造成以视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)为主的神经元变性死亡^[1]。视神经损伤后神经元不易再生,其治疗较困难。银杏叶提取物 EGb761 的主要活性成分黄酮类和银杏内酯具有清除自由基、抗氧化和影响神经递质释放的特性,在中枢及周围神经损伤的动物模型中均显示出神经保护作用

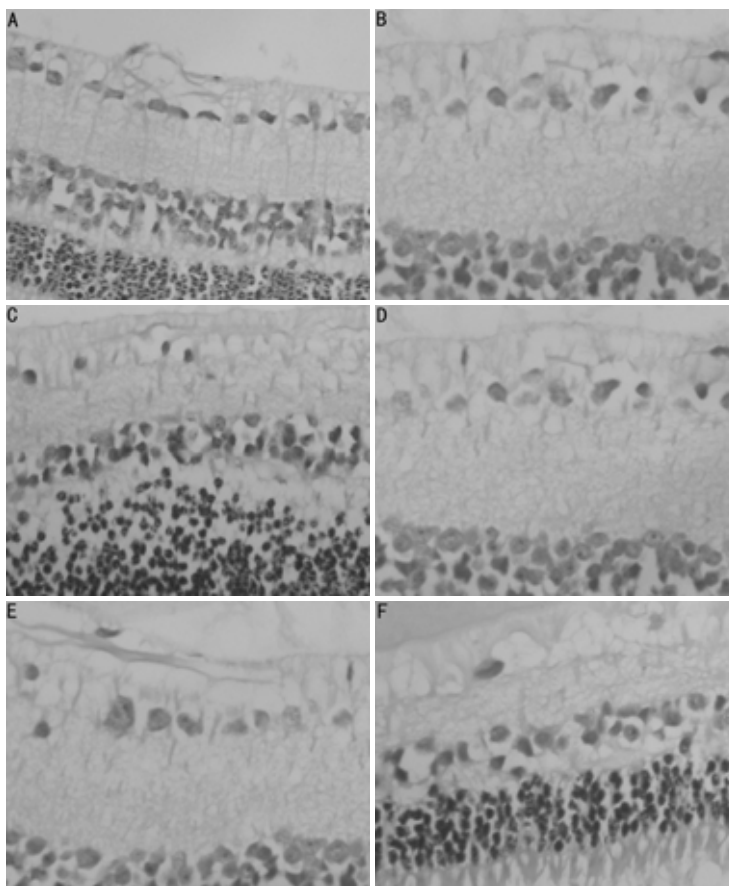


图1 兔视神经夹伤后视网膜组织学变化(HE×400) A:EGb761组3d;B:EGb761组7d;C:EGb761组14d;D:BSS组3d;E:BSS组7d;F:BSS组14d。

用^[2],但目前机制尚不清楚。我们将EGb761用于兔视神经损伤模型,通过观察RGCs数目的变化及髓鞘碱性蛋白(MBP)免疫组织化学的表达,进一步研究EGb761在视神经保护和修复中的作用及机制,探索治疗视神经病变的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年大耳白兔24只(广西医科大学动物实验中心提供),雌雄兼用,体质量2.0~2.5kg,眼部检查无异常。EGb761(上海绿源实业公司),MBPmAb和DAB试剂(上海长岛生物技术有限公司)。

1.2 方法 每只兔右眼为实验眼,左眼为正常对照眼,于实验前1wk每日右眼球后注射EGb761(60mg/kg),左眼球后注射等容量平衡盐液BSS,直至处死。戊巴比妥(30mg/kg)耳缘iv麻醉家兔后,仰卧位固定在手术台上,开睑器撑开家兔上下眼睑,沿角巩缘弧形剪开球结膜,分离球后组织,暴露视神经,用微型无创血管钳自球后约3mm处钳夹视神经30s造成视神经损伤。松开血管钳,缝合球结膜,结膜囊里涂四环素眼膏。术后用直接检眼镜检查眼底,防止损伤视网膜供应血管。麻醉苏醒后出现瞳孔散大,直接对光反应消失,间接对光反应存在,眼底无明显出血渗出者记入实验,否则去除。

1.2.1 RGCs计数 分别于伤后3,7,14d取材,每次8只兔。耳缘iv空气10mL,栓塞致死,立即完整摘除眼球,在角巩缘3:00,9:00及视神经做缝线标记,多聚甲醛(含5万U肝素)灌注固定24h,乙醇梯度脱水,经视神经纵行剖开眼球,二甲苯透明,常规石蜡包埋视神经和视网膜,切片厚3 μ m,贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片上干燥,染色,光镜下观察由专人进行应用图像分析系统(×400)测量

每张标本自视神经两旁1.5mm起,每侧选择3个(共6个)高倍视野,计数RGCs数,每个密度值由每眼6张切片的平均值作为细胞密度值。

1.2.2 MBP的检测 切片脱蜡至水,PBS缓冲液洗5min×3次;乙醇梯度脱水,抗原修复;PBS缓冲液洗5min×3次,滴加正常血清封闭液,37℃,30min;滴加一抗(MBP单克隆鼠抗),37℃,1h;PBS缓冲液洗5min×3次;滴加生物素化二抗,20℃,20min;PBS缓冲液洗5min×4次,DAB显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗,苏木素轻度复染,水洗后50℃~60℃热水返兰,盐酸乙醇分化,脱水、透明、中性树胶封片、显微镜下观察。免疫组织化学切片染色结果判断:光镜下细胞质或突起呈黄色或棕黄色者为阳性。

统计学分析:应用SPSS 13.0统计学软件对数据进行统计学分析。各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间RGCs数目的比较采用独立样本的t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜组织学变化 视神经夹伤后4,7,14d RGCs数目不断减少,实验组视网膜RGCs排列较稀疏,形态尚正常,细胞间可见较多Müller纤维,可见空泡变性,神经纤维层逐渐变薄。对照组视网膜RGCs大小不等,轮廓不规则排列明显稀疏,大量RGCs核固缩凋亡,崩解,有空泡变性,神经纤维层明显变薄。各时间点内实验组RGCs数均高于对照组,差异有统计学意义[(19.35±1.70 vs11.88±1.56;16.76±1.62 vs7.53±1.63;14.54±1.52 vs4.13±1.67/HP(×400, $P < 0.01$),图1A~F]。

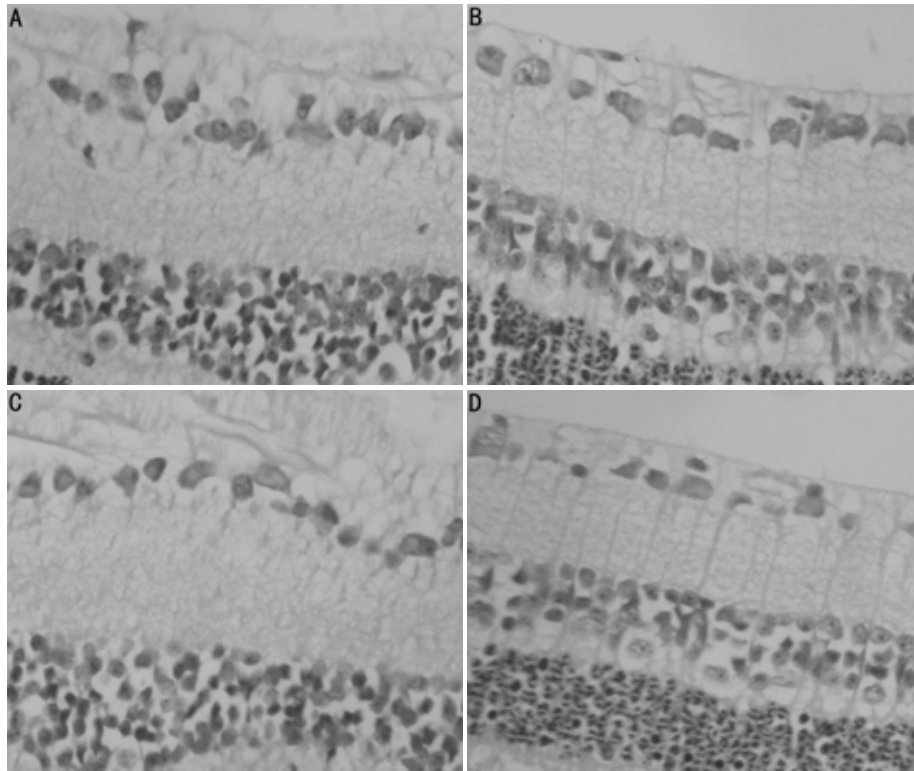


图2 兔视神经夹伤后视网膜 MBP 表达(SABC ×400) A:EGb761 组 7d;B: EGb761 组 14d;C:BSS 组 7d;D:BSS 组 14d。

2.2 免疫组织化学染色结果 损伤后两组均有 MBP 阳性表达,盐水组表现为强阳性;EGb761 组 MBP 表达呈下降趋势,14d 表达呈弱阳性;BSS 组表达也随时间有所减弱,但 14d 时表达仍明显;7,14d EGb761 组 MBP 蛋白免疫组化阳性率(%)均低于盐水组,差异均有统计学意义 [56.18 ± 2.11 vs 74.56 ± 3.37 ; 44.37 ± 2.98 vs 79.70 ± 1.90 /HP(×400), $P < 0.01$,图 2A ~ D]。

3 讨论

缺血、高眼压和眼外伤等多种原因造成的视神经损伤,其病理基础是 RGCs 进行性死亡和视神经纤维的丢失,导致视功能发生不可逆性改变^[3]。采用视神经夹挫伤模型损伤程度一致,可部分定量,重复性较好。导致 RGCs 凋亡的机制很多,主要包括兴奋性谷氨酸中毒、一氧化氮神经毒性、活性氧自由基、逆向轴浆运输障碍导致靶源性神经营养缺失等。目前寻找神经修复与再生的有效手段已成为现代神经生物领域的热点。银杏叶提取物 EGb761 对中枢神经损伤的保护及神经功能恢复的效果已得到认可,但具体机制仍不明确。众多研究表明,EGb761 具有抗氧化、抗缺血、保护线粒体、抑制一氧化氮合酶、抑制谷氨酸毒性以及抑制血小板活化因子等多种作用^[4]。EGb761 在神经元活化过程中,可能通过阻断 Snk-SPAR 途径达到保护树突棘内骨架蛋白的作用,维持了树突棘的稳定性,从而发挥其神经保护作用^[5]。MBP 约占髓鞘蛋白质的 30%,是目前所知构成中枢神经系统髓鞘的唯一结构蛋白。生理状态下 MBP 的含量很低,只有在神经组织变性发生脱髓鞘改变时才会显著升高^[6]。MBP 是视神经损伤后较为合适的生化标记物,可全面反映神经元、胶质细胞、神经髓鞘膜的损害程度,可为判断视神经受损程度提供定量信息,并对判断预后具有指导意义。我们将 EGb761 和 BSS 分别行球后注射,观察到 7d 和 14d 实验组 RGCs 数目无明显变化,MBP 免疫组织化学表达稳定,而对照组

RGCs 数目减少,MBP 表达持续呈强阳性,二者差异有统计学意义。已知视神经机械性损伤后,可导致 NO 过量和过氧化损伤,此外尚有神经营养因子剥夺、钙超载、兴奋性氨基酸过量等因素参与,受损 RGC 轴突及其胞体变性坏死,继而发生凋亡,导致存活 RGC 的数量减少。轴突受损越严重,髓鞘脱落越多,MBP 表达越明显,存活 RGCs 数目越少。通过 EGb761 干预后,MBP 表达稳定,RGCs 存活数目显著增加,而对照组 MBP 表达仍明显,RGCs 数目减少。推测 EGb761 通过改善受损神经的微循环,捕捉和清除自由基,对抗谷氨酸的损伤,进而减轻轴突损伤,恢复轴浆流,保护细胞骨架的完整,从而部分避免 RGCs 的凋亡。

总之,通过球后注射 EGb761,观察到 EGb761 能够增加视网膜 RGC 的存活数量,抑制 MBP 的表达,从髓鞘变化的角度探讨了 EGb761 在阻止轴突变性,提高 RGCs 存活过程中的作用。随着中药组分提取技术和对视神经损伤病因病理研究的发展,EGb761 将会更科学地应用于视神经损伤的临床治疗中。

参考文献

- 1 Schober MS, Chidlow G, Wood JP, et al. Bioenergetic-base neuroprotection and glaucoma. *Clin Exp Ophthalmol* 2008;36(4):377-385
- 2 Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, et al. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death. *Pharmacop sychiatry* 2003;36(1):94-98
- 3 马科,张海娟,李月华,等.银杏叶提取物对视神经节细胞保护作用的实验研究. *眼科* 2007;16(6):418-420
- 4 Ji L, Yin XX, Wu ZM, et al. Ginkgo biloba extract prevents glucose-induced accumulation of ECM in rat mesangial cells. *Phytother Res* 2009;23(4):477-485
- 5 吴兰香,孙长凯.银杏叶提取物神经保护作用中 Snk-SPAR 途径机制探讨. *神经解剖学杂志* 2007;23(2):199-204
- 6 Harauz G, Musse AA. A tale of two citrullines-structural and functional aspects of myelin basic protein demethylation in health and disease. *Neurochem Res* 2007;32(2):137-158