

银杏叶提取物联合灯盏细辛对视网膜神经节细胞的保护作用

王明良, 费志刚, 李红, 贺美宁

作者单位:(421001)中国湖南省衡阳市,南华大学附属第二医院眼科

作者简介:王明良,男,在读硕士研究生,研究方向:青光眼。

通讯作者:李红,女,主任医师,教授,硕士研究生导师. lihong5056@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-03-09 修回日期:2010-04-09

Protective effect of Ginaton and fleabane on retinal ganglion cells

Ming-Liang Wang, Zhi-Gang Fei, Hong Li, Mei-Ning He

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Hong Li. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. lihong5056@yahoo.com.cn

Received:2010-03-09 Accepted:2010-04-09

Abstract

• AIM: To study the protective effect of Ginaton and fleabane on retinal ganglion cells in rabbit chronic high intraocular pressure model.

• METHODS: Chronic high intraocular pressure was created by injecting α -chymotrypsin(0.2mL)(2667.2 μ kat) into rabbit posterior chamber. Thirty-two rabbits of successful model were divided randomly into four groups, with 8 rabbits in each group, and then treated with different therapies as follows: intragastric administration with Ginaton 150mg/kg, once a day (Ginaton group); intragastric administration with fleabane 150mg/kg, once a day (fleabane group); intragastric administration with Ginaton and fleabane (combination therapy group) and control group. After 4 weeks of treatment, all groups were checked retinal ganglion cells apoptosis, normal ganglion cells counting, pathological changes of retinal layers with light microscopy.

• RESULTS: Positive cells could be found in every group, the number of normal retinal ganglion cells was the largest in combination therapy group(889.00 \pm 40/mm²), the least in control group(581 \pm 24/mm²), $P < 0.01$. In light microscopy, the worst arrangement of retinal layers was in control group, and the best was in combination therapy group.

• CONCLUSION: Ginaton and fleabane could prevent high intraocular pressure caused apoptosis of retinal ganglion cells.

• KEYWORDS: Ginaton; fleabane; chronic high intraocular pressure; retinal ganglion cell; apoptosis

Wang ML, Fei ZG, Li H, et al. Protective effect of Ginaton and fleabane on retinal ganglion cells. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(5):850-852

摘要

目的:探讨银杏叶提取物联合灯盏细辛对兔慢性高眼压模型视网膜神经节细胞的保护作用。

方法:采用 α -糜蛋白酶(0.2mL)(2667.2 μ kat)注入家兔眼后房,造成实验性慢性高眼压。将造模成功的32只家兔随机分为4组,每组8只,分别给予以下治疗:银杏叶提取物150mg/kg(银杏叶组);灯盏细辛150mg/kg(灯盏细辛组);银杏叶提取物联合灯盏细辛皆灌胃,1次/d银杏叶提取物加灯盏细辛(联合用药组);不做任何治疗(模型对照组)。4wk后各组分别进行视网膜神经节细胞凋亡检测正常视神经节细胞计数和光镜观察视网膜各层病理改变。

结果:每组均可观察到阳性细胞,正常神经节细胞计数最多为联合用药组(889.00 \pm 40/mm²)、最少为模型对照组(581 \pm 24/mm²), $P < 0.01$,光镜下模型对照组视网膜各层结构最紊乱,联合用药组视网膜各层组织最完整。

结论:银杏叶提取物联合灯盏细辛能阻止高眼压导致视网膜神经节细胞发生凋亡。

关键词:银杏叶提取物;灯盏细辛;慢性高眼压;神经节细胞;细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.05.009

王明良,费志刚,李红,等.银杏叶提取物联合灯盏细辛对视网膜神经节细胞的保护作用.国际眼科杂志2010;10(5):850-852

0 引言

近年来视神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)保护作用备受关注,慢性高眼压视神经损害本质为RGCs的凋亡和丢失。现代研究表明,RGCs的凋亡是可以阻止的,受损RGCs的轴可以再生并重新恢复功能。青光眼RGCs的保护与再生治疗在青光眼的治疗中日益受到重视。祖国医学银杏叶提取物具有抗氧化作用;抗缺血作用;具有抑制谷氨酸受体毒性兴奋作用;一氧化氮合酶抑制作用,一氧化氮也是神经节细胞凋亡的一个关键因素,过量的一氧化氮使神经节细胞凋亡。银杏叶提取物是过氧化物,一氧化氮的清除剂并能抑制一氧化氮的产生^[1]。灯盏细辛针对视网膜/视神经的系列实验研究结果表明,灯盏细辛能提高RGCs抗损伤的能力^[2],经多次临床观察证明灯盏细辛有扩大视野,提高视网膜光敏感度和部分改善原有视野缺损的作用^[3]。我们将银杏叶提取物联合灯盏细辛应

用于慢性高眼压模型,进行视网膜视神经节细胞凋亡检测及光镜观察视网膜各层病理改变。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康新西兰白兔体质量 2.0 ~ 2.5kg,无眼疾,雌雄不限共 32 只,由南华大学实验动物中心提供。1mL 一次性注射器, α -糜蛋白酶溶液,毛果芸香碱滴眼液,的卡因溶液,甲醛溶液,直接检眼镜,Schiotz 眼压计,AgNOR 染色液,乌拉坦溶液,银杏叶提取物,灯盏细辛,TUNEL 试剂盒,光学显微镜。

1.2 方法 造模均选取家兔右眼。10g/L 毛果芸香碱滴眼液缩瞳,200g/L 乌拉坦溶液行全身麻醉 5mL/kg,用 1mL 注射器自角巩膜缘内 1mm 处刺入前房,抽出房水约 0.20mL,再置换装有 α -糜蛋白酶溶液 0.20mL(13336 μ kat/L)的针管,将针头经瞳孔缘进入对侧虹膜后面即后房,注入 α -糜蛋白酶溶液后出针^[4]。造模后测量 24 及 72h 的眼压,24h 后眼压 > 30mmHg,72h 眼压 > 26.6mmHg 为造模成功^[5]。将造模成功的家兔随机分为 4 组,每组 8 眼。于造模后 72h 开始治疗,共治疗 4wk。治疗方法如下:银杏叶 A 组:银杏叶提取物 150mg/kg 灌胃,1 次/d;灯盏细辛 B 组:灯盏细辛 150mg/kg 灌胃,1 次/d;联合用药 C 组:银杏叶提取物联合灯盏细辛灌胃,1 次/d;模型对照 D 组:不予任何治疗。各组兔于开始治疗 29d 经耳缘静脉注射空气栓塞致死,立即摘取眼球,在眼球赤道部用 5mL 注射器抽取部分眼内组织后置换等量的甲醛溶液,置入甲醛溶液固定 24h,石蜡包埋,切片,HE 染色,制成切片后用 Olympus 光学显微镜观察视网膜各层病理改变。标本用戊二醛多聚甲醛前固定,鹅酸后固定,0.1mol/L PBS 液漂洗 3 次,梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,LKBV 型超薄切片机切片,JEOL-100CX 透射电镜观察细胞超微结构。标本用甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,TUNEL 法检测严格按照 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒的操作说明进行,棕黄色细胞即为凋亡阳性细胞,正常节细胞呈绿色。将切片用双蒸水洗 2 次,入 AgNOR 工作液中暗处浸染 25 ~ 30min,双蒸水洗 3 次,无水乙醇洗 2 次,入二甲苯:石碳酸(4:1) 1min,二甲苯透明,国产中性树胶封固。光镜下观察组织结构形态和细胞核内 AgNOR 黑色银染颗粒情况检测 RGCs 的活性。

统计学分析:节细胞数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件包行两样本均数 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜节细胞 模型对照组神经节细胞计数($581 \pm 24/\text{mm}^2$)最少,表明模型对照组其视网膜受损最严重;银杏叶组($693 \pm 27/\text{mm}^2$)、灯盏细辛组($710 \pm 30/\text{mm}^2$)与模型对照组比较差异有统计学意义,证明了银杏叶提取物,灯盏细辛对视网膜有一定的保护作用,其与联合用药组($889 \pm 40/\text{mm}^2$)显著的差异性说明两种药物联合保护作用更突出。模型对照组内丛状层变薄甚至消失,内核层、外核层细胞数目减少、间隙扩大,排列紊乱,节细胞层明显变薄;联合用药组各层组织结构清晰,层次分明,细胞排列整齐,接近正常视网膜;银杏叶组,灯盏细辛组各层均有不同程度的变薄。凋亡细胞胞膜完整,细胞体积缩小,线粒体肿胀,细胞核沿核膜皱缩,染色质浓缩、边集,有的核膜裂解,染色质分割成块。

2.2 AgNOR 染色 光镜下可见细胞和细胞外组织被染成浅黄色,细胞核染成棕黄色,边界清楚,核内可见分散的一

个或多个 AgNOR 小黑点,有时可见许多细小颗粒融合成不规则团块状。联合用药组节细胞核内银染颗粒分布均匀,灯盏细辛组和银杏叶提取物组节细胞核内银染颗粒明显减少,模型对照组减少最多,联合用药组与银杏叶提取物组、灯盏细辛组、模型对照组差异都具有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

α -糜蛋白酶溶液后房注射可制作兔慢性高眼压模型, α -糜蛋白酶是一种蛋白水解酶,它可以水解晶状体悬韧带,经后房注射后,晶状体悬韧带被水解成碎片随房水进入房水循环,阻塞房角、Schlemm 管及小梁组织至眼压升高,眼压升高发生快、持续久、程度高^[6]。0.5h 后眼压可达 50mmHg 以上,72h 后眼压维持在 30 ~ 40mmHg 之间,直到第 4wk,眼压仍在 25mmHg 左右。视网膜神经节细胞层在持续高眼压状态下最易受损,节细胞大量凋亡,TUNEL 法检测后,发生凋亡的节细胞呈现棕黄色阳性反应,而正常节细胞呈现绿色阴性反应。电镜下见到的阳性细胞均呈现凋亡的病理改变。成为视神经保护药物的一个重要原则是该药物能够通过眼组织达到视网膜,即该药必须和靶细胞或靶组织接触从而发挥药物作用。给大鼠口服放射性元素标记的银杏叶提取物,发现银杏叶提取物可以在视网膜上达到足够的药物浓度。银杏叶组、灯盏细辛组与模型对照组比较差异有统计学意义,证明了银杏叶提取物,灯盏细辛对视网膜有一定的保护作用,其与联合用药组显著的差异性说明两种药物联合保护作用更突出。银杏叶主要含有银杏黄酮,银杏黄酮类是低分子量化合物,均衍生于其母体化合物黄酮,以糖苷和甲基化合物形成存在。已知银杏叶含黄酮类化合物 35 种,其中双黄酮 6 种,银杏黄酮苷元 7 种,黄酮苷 17 种。香港学者的研究也表明含有银杏叶提取物的中药制剂对高眼压的大鼠视神经具有一定的保护作用^[7],研究表明银杏叶提取物中的内酯成分具有扩张血管的作用,特别是可扩张微循环,增加微循环血流。正常志愿者口服银杏叶提取物后,彩色多普勒显示眼动脉血流量增加了 24%。而银杏叶提取物中的黄酮成分则有抗氧化的作用,包括对抗脂质过氧化。此外,银杏叶提取物还具有多种作用,比如,抑制 NMDA 受体毒性兴奋,阻断谷氨酸毒性作用,抑制血小板聚集,对抗凋亡等。它对缺血缺氧,机械损伤导致的神经元损伤有保护作用。

一般认为,一旦青光眼出现视盘的严重损伤,即使眼压被控制,恢复视功能亦非常困难,甚至是不可能的。但是一些研究认为,青光眼损伤分为原发性损伤和继发性变性,那些逃避了原发损伤的正常神经元,因为临近已发生损伤的神经元产生的变性损伤微环境,而导致继发性变性。因此,对这些 RGC 及其轴突的保护和再生治疗已越来越受到重视。灯盏细辛是一种云南民间中草药,具有抗血栓,减少外周血管阻力,改善大脑及抗血小板聚集的作用。动物实验已证实 EBHM 注射液具有改善鼠实验性高眼压后视神经轴浆运输及减轻急性高眼压后 RGC 组织学改变的作用^[2],其可能使某些濒临死亡的 RGC 轴索恢复轴浆运输,从而避免部分 RGC 的死亡。我们的实验结果表明联合用药组的 RNFL 厚度和 RGC 密度显著高于单纯用药组。提示银杏叶提取物和灯盏细辛对视神经节细胞保护作用机制有相辅相成的因素。

综上所述,高眼压能导致视网膜神经节细胞发生凋亡,银杏叶提取物和灯盏细辛对视神经均有一定的保护作用,其联合对视神经的保护作用更显著。

参考文献

1 Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, et al. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb761. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201(2):748-755
2 朱益华,蒋幼芹,刘忠浩,等.灯盏细辛注射液对鼠实验性高眼压视神经轴浆运输的影响. *中华眼科杂志* 2000;36(4):289
3 贾莉君,刘忠浩,罗学港,等.青光康注射液对急性实验性高眼压大鼠视网膜神经节细胞代谢的作用. *中华眼科杂志* 1995;31(2):129-132

4 李养军,杨新光,高玫蕊.银杏叶黄酮对兔实验性高眼压后视网膜组织氢氧根自由基的影响. *眼科研究* 2003;21(1):29-31
5 陈飞.关于视网膜神经节细胞凋亡的最新进展. *国外医学眼科分册* 2000;23(3):201-202
6 Kalvin NH. Experimental glaucoma in monkeys. *Arch Ophthalmol* 1998;75:89
7 Cheung ZH, So KF, Lu Q, et al. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal ganglion cells by a mixture of herbal extracts. *J Neurotrauma* 2002;19(3):369-378

· 短篇报道 ·

翼状胬肉切除联合带蒂结膜瓣移植术

许艳红¹,徐金华²

作者单位:¹(214187)中国江苏省无锡市,无锡惠山区人民医院眼科;²(210029)中国江苏省南京市,江苏省中医院眼科
作者简介:许艳红,硕士,主治医师。
通讯作者:许艳红. xuyanhong1975@126.com
收稿日期:2010-01-26 修回日期:2010-04-26

许艳红,徐金华.翼状胬肉切除联合带蒂结膜瓣移植术. *国际眼科杂志* 2010;10(5):852

0 引言

翼状胬肉是眼科常见病,目前治疗方法以手术切除为主。常规手术切除的复发率高达24%~89%^[1]。角膜表面及结膜下翼状胬肉残存组织是形成翼状胬肉复发的基础,而巩膜表面的新生血管进入角膜创面是复发的根本原因^[2],因此彻底干净切除翼状胬肉结膜下增生的纤维血管组织是避免术后复发的关键因素。为此,我们于2006-12/2008-06开展显微镜下翼状胬肉切除联合带蒂结膜瓣移植治疗翼状胬肉,取得良好的疗效。现报告如下。

1 临床资料

病例来源于我院和江苏省中医院2006-12/2008-06眼科门诊,58例翼状胬肉病例,其中男23眼,女35眼,年龄37~74岁。发病时间1~20a不等,胬肉头部侵入角膜缘内3~6mm。手术操作在显微镜下进行。常规消毒铺巾,结膜囊表面麻醉后,开睑器开睑,予20g/L利多卡因行胬肉下浸润麻醉,以11号刀片在翼状胬肉的头部前0.5mm处附着的角膜上分离,彻底分离至半月皱襞,剪除胬肉头部和大部分体部,切除球结膜下增生的纤维结缔组织和纤维血管组织,不残留胬肉组织且要求角膜创面光滑平整,在巩膜创面上、下缘沿角膜缘做含0.5~1.0mm宽角膜上皮的切口,自颞上方与角膜缘切口平行钝性分离并剪开球结膜,取一块宽约3mm的带蒂角结膜瓣,大小与暴露的巩膜面相当,将球结膜瓣上面向上,角膜缘对角

膜缘平铺于胬肉切除后的巩膜暴露区,10/0尼龙线间断缝合球结膜,面向角膜缘的结膜瓣固定于浅层巩膜上,暴露巩膜约2mm,计缝针8~10针。结膜取材区暴露,不作任何处理,术毕涂典必殊眼膏,单眼包封。术后每天换药,裂隙灯下观察角膜上皮愈合情况及结膜移植片愈合情况,局部点可乐必妥眼液及典必殊眼液,6次/d,5d后减为4次/d,10d后减为3次/d,15d后减为3次/d,持续1mo。术后10d拆线,随访12~24mo。

2 结果

治疗标准:痊愈:角膜创面上皮修复无新生血管,转移结膜瓣成活,无充血增生。复发:手术区结膜充血增生,重新伸入角膜。术后均无感染,局部反应轻,术后3~5d角膜上皮愈合,10d拆线,结膜切口完全对位愈合。术后4wk结膜充血消退结膜瓣平整。随访结果:58眼痊愈,5眼复发,复发率9%。

3 讨论

澳大利亚学者Coroneo^[3]在研究中发现:翼状胬肉在暴露于紫外线、强光刺激的眩光和反光的情况下,发病率高,从发病的人群来看,户外劳动者明显高于室内工作者。我们收治的58例翼状胬肉患者,其中41例是从事户外工作者,符合上述论点。目前治疗方法以手术切除为主,但术后容易复发。本研究采用翼状胬肉切除联合带蒂结膜瓣移植,彻底去除上皮下纤维血管组织,同时带蒂结膜瓣含有角膜缘干细胞,不仅能为病变区角膜缘提供正常的角膜缘干细胞,而且能维持角膜表面的完整性,恢复角膜透明性。同时角膜缘干细胞的增生抑制了结膜上皮细胞生长,阻止了异常组织和浅层新生血管侵入角膜,从而可有效地防止翼状胬肉的复发。该手术操作简单,取材方便,植片为自体组织,不产生排斥反应,复发率低,并发症少,是一种安全、有效的手术方法,值得推广。

参考文献

1 Canoparra J, Manuel DL, Maldonaolo MJ, et al. Prospective trial of intraoperative mitomycin C in the treatment of primary pterygium. *Br J Ophthalmol* 1995;79:439-440
2 李凤鸣.眼科全书.北京:人民卫生出版社 1996:1319
3 Coroneo MT. Albedo concentration in the anterior eye: a phenomenon that locates some solar diseases. *Ophthalmic Surg* 1990;21(1):60-66