

黄芩苷对家兔视网膜炎性水肿厚度影响的研究

宋昊刚¹, 崔浩², 赵君¹, 徐聪¹, 王力¹

作者简介:¹(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,黑龙江省医院南岗分院眼科;²(150000)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学第一附属医院眼科医院

作者简介:宋昊刚,毕业于哈尔滨医科大学,博士,师从崔浩教授,研究方向:眼科药理学。

通讯作者:宋昊刚. songhaogang@hotmail.com

收稿日期:2010-05-18 修回日期:2010-06-28

Research of baicalin's effect on the thickness of inflammation-mediated retinal edema in rabbit

Hao-Gang Song¹, Hao Cui², Jun Zhao¹, Cong Xu¹, Li Wang¹

¹Department of Ophthalmology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China; ²Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Hao-Gang Song. Department of Ophthalmology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. songhaogang@hotmail.com

Received:2010-05-18 Accepted:2010-06-28

Abstract

• **AIM:** To establish the inflammatory retinal edema animal model and research the influence of the baicalin on the inflammatory retinal edema.

• **METHODS:** Optical coherence tomograph (OCT) was used to survey the effect of baicalin on the retina thickness in inflammatory retinal edema. 15 inflammation-mediated rabbits were randomly assigned to five groups, each group included 3 rabbits (6 retinas), which received different treatments, respectively: baicalin (160mg/L, 20mL/kg) by iv. administration bid; baicalin (40mg/L, 20mL/kg) by iv. administration bid; baicalin (10mg/L, 20mL/kg) by iv. administration bid; triamcinolone acetate (TA) retrobulbar injection of 20mg respectively; the control group was injected physiologic saline in the same volume. The effect was measured by the thickness of retinas of OCT on day 1, 2, 4, 6, 10, 14 and 21 respectively.

• **RESULTS:** Compared with the inflammatory control group, the thickness of baicalin group reduced apparently, the difference was remarkable ($P < 0.01$), and the difference between baicalin group and TA group after 2 days were not statistically significant ($t < 2.447, P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** The baicalin could suppress the inflammatory retina cell edema effectively, it even has the same drug efficacy with the TA, and no obvious poisonous side effect.

• **KEYWORDS:** baicalin; retinal edema; pharmacodynamics; retinal thickness; optical coherence tomography

Song HG, Cui H, Zhao J, et al. Research of baicalin's effect on the thickness of inflammation-mediated retinal edema in rabbit. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(7):1274-1276

摘要

目的:研究黄芩苷对炎性视网膜水肿的影响。

方法:建立炎性视网膜水肿的动物模型,用OCT测量黄芩苷对炎性视网膜水肿过程中视网膜厚度的影响。新西兰白兔15只(30个视网膜)随机分为5组,建立炎性视网膜水肿模型后,组1注射黄芩苷溶液(160mg/L, 20mL/kg), 2次/d;组2使用黄芩苷溶液(40mg/L, 20mL/kg), 2次/d;组3使用黄芩苷溶液(10mg/L, 20mL/kg), 2次/d;组4使用球后注射曲安奈德,给药剂量为20mg(0.5mL)。组5为对照组,被耳缘静脉注射等量BSS。分别在建模后1, 2, 4, 6, 10, 14, 21d用光学相干断层扫描(optical coherence tomograph, OCT)测量视网膜的平均厚度。

结果:与炎性对照组相比,黄芩苷治疗组视网膜厚度明显降低,两组差异具有统计学意义($P < 0.01$);黄芩苷组与激素组比较,48h内有差别,但差异不显著($t = 5.85, 4.3; 0.001 < P < 0.01$);2d后,两组差异性消失($t < 2.447, P > 0.05$),从统计学角度看两者无差别。

结论:黄芩苷能够有效抑制炎性视网膜细胞外水肿,并且与皮质激素具有相同的药效,并且无明显毒副作用。

关键词:黄芩苷;视网膜水肿;药效学;视网膜厚度;光学相干断层扫描

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.07.011

宋昊刚, 崔浩, 赵君, 等. 黄芩苷对家兔视网膜炎性水肿厚度影响的研究. 国际眼科杂志 2010;10(7):1274-1276

0 引言

临床工作当中炎性视网膜水肿十分普遍,几乎所有内眼的炎症、刺激,包括青光眼、白内障手术,甚至是普通的玻璃体内注射,都会引起不同程度的炎性视网膜水肿。部分患者可以自行缓解,但是一旦无法缓解,则容易对视力造成损害。在治疗上,首选还是激素治疗,尽管随着制药工艺的发展,研发出了曲安奈德等长效激素,在非甾体消炎药上研发了奈帕芬胺等新药,还是无法避免激素和非甾体消炎药的副作用,应用具有局限性,比如急性病毒性视网膜炎,糖尿病性慢性视网膜水肿等,无法长期、安全应用于视网膜水肿的治疗^[1]。激素的使用对于术后或外伤患者还会延缓创口的愈合。这就导致一部分患者不能使用或者只能短期使用抗炎性水肿治疗药物,可能导致一些患者丧失了挽回视力的最佳时机。近年来,中药的有效成份越来越引起研究人员的重视。黄芩苷作为中药黄芩的有效成分进入了我们的视线。它具有黄酮类中药良好的抗

氧化性、抑菌性,又几乎无副作用,特别是它抑制炎性细胞水肿的能力愈加受到广泛的关注,国外研究人员将其作为对抗脑膜炎水肿、坏死性胰腺炎等重度细胞水肿的抑制剂加以研究,前景乐观^[2-4]。国内在 2003 年的非典疫情中,广州某医院曾将其作为抗病毒性肺水肿药物应用,效果良好。光学相干断层扫描(optical coherence tomograph, OCT)正成为广泛应用的影像技术,具有无创伤、非接触性、分辨率高、耐受性好及重复性强等优点,特别适用于黄斑病的检查。我们通过 OCT 连续观察炎性视网膜水肿厚度的变化,并且与视网膜形态学观察及视网膜厚度测定的结果对比,从影像学和组织学量化了黄芩苷抑制视网膜炎性水肿的效果,并且对不同浓度的药物效果做出评价,与局部应用激素的效果相对比。现总结资料报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰白色家兔 30 只,无眼部疾病,雌雄兼用,体质量 2~2.5kg,哈尔滨医科大学动物实验中心提供。刀豆蛋白 A (北京索来宝科技有限公司)。醋酸曲安奈德(triamcinolone acetonide, TA)美国施贵宝公司。黄芩苷冻干粉(纯度为 93%)黑龙江省药检所提供。Zeiss Humphrey OCT 仪(2010 型,德国)。

1.2 方法 新西兰白兔实验前禁食不禁水 24h。以鲁米那(0.1g/kg)和氯胺酮(10mg/kg)耳缘静脉麻醉,角膜用 4g/L 盐酸奥布卡因表面麻醉。所有家兔均使用微量注射器(range, 2 to 20mL; 24-gauge, Cole-parmer, USA)在左眼玻璃体内注射刀豆蛋白 A 30μg/(20mL)。所有眼均使用阿托品散瞳,2 次/d,持续 2wk 直到持续散瞳。然后将 15 只家兔分为 5 组。组 1 在注射刀豆蛋白 A 后,被耳缘静脉注射黄芩苷溶液(160mg/L, 20mL/kg),2 次/d;组 2 使用黄芩苷溶液(40mg/L, 20mL/kg),2 次/d;组 3 使用黄芩苷溶液(10mg/L, 20ml/kg),2 次/d;组 4 使用球后注射曲安奈德 20mg(0.5mL);组 5 为对照组,被耳缘静脉注射等量 BSS,时间与组 1 相同。应用美国 Zeiss Humphrey 光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)仪,检查前将家兔双眼散瞳。OCT 设计的程序可以用来测量视网膜的厚度,即根据不同光反射强度来分辨视网膜内界膜和色素上皮(呈现红色)前界,自动测量两者之间的距离(即视网膜神经上皮层厚度)。采用经视网膜颞侧后极部和视盘中心连线的直线横向线性扫描,扫描长度为 218mm,扫描深度为 2mm。每只动物重复 5 次,取其中成像清晰者(不少于 3 幅图像)分析。分别在刀豆蛋白 A 注射前和注射后 1,2,4,6,10,14,21d,为家兔进行 OCT 检查。30 只新西兰白兔随机分为 2 组,一组(30 眼)被在注射刀豆蛋白 A 后,被耳缘静脉注射黄芩苷溶液(160mg/L, 20mL/kg);另一组为对照组(30 眼),被在注射刀豆蛋白 A 30μg(20μL)后,被耳缘静脉注射等量 BSS。两组在注射前和注射后 1,2,4,6d,5 个时间点摘取眼球,每次 6 眼(于 3:00 处留下少许结膜作为标记),40g/L 甲醛中固定 2d,取包含视盘在内的颞侧后极部眼球壁组织块,常规石蜡包埋,经视乳头颞侧旁开 1mm 处沿水平子午线切片,厚度为 5μm,常规 HE 染色,显微镜下观察组织学形态并照相。采用美国 Nikon & Spot 图像分析系统测量视网膜的厚度。

统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行相关分析。组间比较采用析因设计的方差分析,以 $P < 0.05$ 为显著性标准。

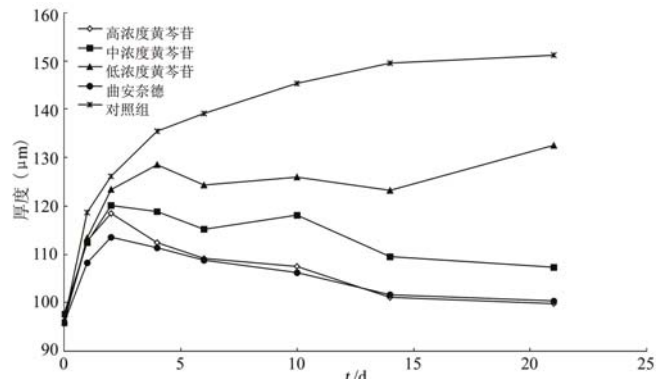


图 1 家兔视网膜厚度随时间变化。

表 1 OCT 与组织学测量的视网膜厚度 ($n=6, \bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

注射时间	组织学测量	OCT(组 1)
注射前	99.4 ± 11.2	96.1 ± 11.9
注射后 1d	118.2 ± 13.6	112.8 ± 11.3
2d	125.8 ± 12.4	118.6 ± 13.1
4d	119.7 ± 12.8	112.5 ± 8.8
6d	112.6 ± 10.9	107.5 ± 9.9

2 结果

2.1 视网膜厚度 视网膜 OCT 图像表现为相应于视网膜神经纤维层以及视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)和脉络膜毛细血管层的红色反射带在所有兔眼均可观察到;位于 RPE 和脉络膜毛细血管层的红色反射带前的低反射带在对照眼可清楚的观察到,而在实验眼,对照组随着时间的延长,此低反射带进行性变厚,相应视网膜厚度也进行性变厚,与组织学观察到的情况相对应(图 1)。组 1、组 2 和组 4 的视网膜厚度在 2~4d 逐渐降低,而对照组眼 4~6d 前房出现细胞,视网膜厚度继续逐渐增加。在注射刀豆蛋白 14~21d,使用激素组和使用黄芩素组前房反应基本消失,视网膜厚度都呈递减态势。而这时对照组炎症反应继续增强,至第 21d 视网膜厚度达到顶峰。组 1、2、3 之间在 0~2d 内无差别,2d 后出现差别,差异显著性与浓度差别相关。组 1 与组 4 无明显差别($P > 0.05$),而与对照组之间有显著差别($P < 0.01$)。

2.2 组织学测量 组织学上,注射 BSS 液对照组视网膜形态正常,结构层次清楚,内外节排列整齐规则。玻璃体内注射刀豆蛋白 A 后,视网膜光感受器外节肿胀、细胞极性消失,细胞空泡变性,感受器内节细胞核固缩,内核层细胞空泡变性,注射时间越长,损害越严重。病理切片采用血清白蛋白免疫组化染色法处理,展示了炎症模型眼血-视网膜屏障崩溃的过程(图 2)视网膜厚度 OCT 检查结果与组织学检查结果具有良好的相关性($r = 0.995, P < 0.01$, 表 1)。

3 讨论

OCT 是一种非接触性、无损害性、快速、高分辨活体生物组织切面显微检测系统,目前已广泛应用于人视网膜各种疾病的检测。用于视网膜变性鼠模型研究能充分体现其优点:能在一个动物个体中连续观察施加的干预因素对整个疾病进程的影响,可以长期对同一动物视网膜同一部位进行形态学变化的检测,组织结构的测量不受组织标本制备过程中各种因素的影响,从而增强了实验的可信性,同时也降低了实验所需动物的数量;OCT 扫描视网膜需时不到 5s,可以短时间内很容易的获取大量实验动物的结果,应用组织学的方法则需较长时间;OCT 的轴向分辨

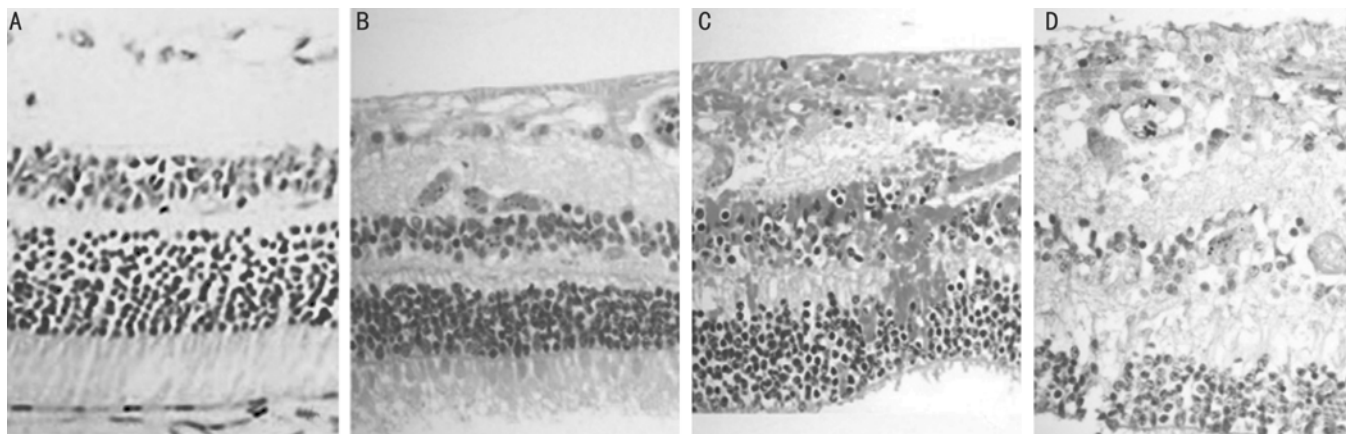


图2 家兔视网膜炎性水肿(HE×100) A:空白对照组;B:造模后1d;C:造模后2d;D:造模后6d。

率仅依赖于光源的空间相干特性,不受瞳孔大小和眼像差的限制;OCT 10 μ m 的高分辨率,可以定量追踪疾病进程中组织结构的微小变化。缺点是 OCT 不能精确的确定视网膜各层的边界,不能观察到细胞水平发生的变化;所测量的是视网膜神经上皮层的厚度,不包括视网膜色素上皮层;眼前节的角膜混浊、白内障等可以减弱光在眼组织中的传播,从而减弱视网膜图像的强度和对比度^[5-7]。我们利用 OCT 成像技术与组织学方法,测量兔炎性视网膜厚度的改变,结果表明两种技术测量的结果之间存在较好的相关性($r = 0.995, P < 0.01$)。在炎性模型眼中,尽管 OCT 不能观察到视网膜的微细结构,但可以很容易的检测到视网膜厚度的整体改变,从而证实对兔视网膜进行 OCT 扫描成像的方法是可行的,可以定量的观察炎性视网膜水肿结构的进行性改变。

葡萄膜炎是一种常见眼内炎症,也是致盲的主要原因之一。葡萄膜炎可以由特发性免疫反应、感染、创伤、手术等原因引起,主要是虹膜睫状体或脉络膜的炎症,而造成视力丧失的主要部位却在视网膜。这主要与视网膜神经细胞防御功能较弱,受损后无法再生有关。我们主要关注于早期视网膜细胞炎性水肿的治疗和保护。刀豆蛋白 A 引发的葡萄膜炎动物模型被广泛应用于免疫反应研究,效果确切,刀豆蛋白 A 被证明是一种针对 T 细胞和一些 B 细胞的非特异性炎症因子和丝裂原^[8]。我们分别用高、中、低 3 个浓度黄芩苷水溶液治疗炎性视网膜水肿,使用 OCT 测量炎性视网膜水肿厚度的变化,并且与组织学测量结果相印证。结果显示 OCT 法测量炎性视网膜水肿厚度,节约研究成本,降低系统误差。黄芩苷高浓度组和激素组的厚度在 4d 左右开始下降,而且两组之间无明显差别($P > 0.05$)。黄芩苷高浓度组和中浓度、低浓度组在 0~2d 内无差别,2d 后出现差别,差异显著性与浓度呈正相关关系。黄芩苷组与激素组比较,2d 内有差别,起效稍慢。

这可能与黄芩苷代谢方式有关。黄芩苷分子较大,难溶于水,所以通过血-视网膜屏障时,与激素相比峰值浓度低,眼内浓度升高相对较慢。视网膜水肿是眼内炎症的严重并发症和导致视力受损的主要原因之一^[9]。黄芩苷具有明显抑制视网膜细胞外炎性水肿的作用,并且不比局部使用皮质类固醇激素逊色。黄芩苷从制剂上还有改进增加浓度的空间,黄芩苷的作用机制及体外细胞学研究等均尚待进一步研究。

参考文献

- 1 王景昭. 黄斑水肿的药物和手术治疗. 中华眼底病杂志 2004;20:316-319
- 2 Lai MY, Hsiu SL, Chen CC, et al. Urinary pharmacokinetics of baicalin, wogonin and their glycosides after oral administration of Scutellariae Radix in humans. *Biol Pharm Bull*2003;26(1):79-83
- 3 Qiu F, Lü XS, Huang YK. Effect of low molecular weight heparin on pancreatic micro-circulation in severe acute pancreatitis in a rodent model. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(24):2260-2263
- 4 Xiping Z, Hua T, Hanqing C, et al. The protecting effects and mechanisms of baicalin and octreotide on heart injury in rats with SAP. *Mediators Inflamm* 2007; 2007: 19469
- 5 Yang Y, Whiteman S, van Pittius DG, et al. Use of optical coherence tomography in delineating airways microstructure: comparison of OCT images to histopathological sections. *Phys Med Biol* 2004; 49:1247-1255
- 6 Knüttel A, Bonev S, Knaak W. New methods for evaluation of *in vivo* scattering and refractive index properties obtained with optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 2004; 9:265-273
- 7 Herz PR, Chen Y, Aguirre A, et al. Ultrahigh resolution optical biopsy with endoscopic optical coherence tomography. *Optics Express* 2004; 12:3532-3542
- 8 Williamson T, O'Donnell A. Intravitreal triamcinolone acetonide for cystoid macular edema in nonischemic central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*2005;139:860-866
- 9 Misson GP. Clinical ophthalmic pathology. *Butterworth Heinemann Medical* 2002;1(1):109-111