

补精益视片对 SD 大鼠慢性高眼压模型外侧膝状体脑源性神经营养因子表达的影响

李翔¹ 柯欣怡^{1,2} 刘红信³ 袁铭悦³ 李祥玉³ 李华宏³ 王泰³ 田梦瑶³ 杨凤娇³

【摘要】目的 观察补精益视片对慢性高眼压模型(elevated intraocular pressure, EIOP)大鼠外侧膝状体中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响,探讨补精益视片视功能保护的作用机理。**方法** 选取 30 只 SD 大鼠,随机分为对照组、给药组及模型组,每组各 10 只。采用烙闭巩膜上静脉方法制作慢性高眼压大鼠动物模型,每组连续灌胃 8 周后处死大鼠,观察补精益视片对 EIOP 大鼠眼压、外侧膝状体(lateral geniculate nucleus, LGN)BDNF 表达的影响。**结果** 相比造模前,从造模即刻开始至造模后 8 周,给药组及模型组大鼠的眼压均有明显升高,差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$);造模后 8 周与造模即刻相比,给药组眼压有降低趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$),而模型组眼压无降低趋势;模型组 BDNF 总面积($55863.31 \pm 10264.399 \text{ S}/\mu\text{m}^2$)及积分光密度(15931.84 ± 3403.742)较对照组($114106.08 \pm 17849.482 \text{ S}/\mu\text{m}^2$, 29209.88 ± 5725.992)及给药组($97567.06 \pm 22224.041 \text{ S}/\mu\text{m}^2$, 29199.65 ± 7865.087)明显偏低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$),给药组 BDNF 总面积及积分光密度较对照组稍偏低,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 补精益视片能补精益视片能促进慢性 EIOP 模型大鼠 LGN 中 BDNF 的表达,从而发挥视功能保护作用。

【关键词】 青光眼; 补精益视片; 视功能保护; 大鼠慢性高眼压模型; 脑源性神经营养因子; 外侧膝状体

DOI:10.3969/j.issn.1674-9006.2017.04.005

中图分类号:R77

Effects of BuJingYiShi tablets on expression of brain-derived neurotrophin factor in lateral geniculate in rat model of chronic elevated intraocular pressure LI Xiang¹, KE Xin-yi^{1,2}, LIU Hong-ji³, YUAN Ming-yue³, LI Xiang-yu³, LI Hua-hong³, WANG Tai³, TIAN Meng-yao³, YANG Feng-jiao³ (1. Department of Ophthalmology, The Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 610072; 2. Longquanyi District Hospital of Traditional Chinese Medicinal, Chengdu, Sichuan, 610100; 3. Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 610075)

【Abstract】Objective To observe the effect of BuJingYiShi tablets on the expression of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) in lateral geniculate nucleus(LGN) in rat model of chronic elevated intraocular pressure (EIOP), and explore the mechanism of it initially. **Methods** The rats were randomly divided into 3 groups: control group, model group and treatment group, 10 rats in each group. The model of chronic EIOP was established by unilaterally cauterizing 3 episcleral vessels. After given BuJingYiShi tablets and normal saline for 8 weeks, killed the rats and taken out the brains. IOP, expression of brain-derived neurotrophic factor in lateral geniculate nucleus(LGN) were observed. **Results** Immediately modeling and 8 weeks after-modeling, IOP were highly significant different from before modeling(all $P < 0.01$). there was a decreasing tendency in treatment group between 8 weeks after-modeling and immediately modeling ($P < 0.01$). While model group was not statistically significant($P > 0.05$). The total area($55863.31 \pm 10264.399 \text{ S}/\mu\text{m}^2$) and integrated optical density (15931.84 ± 3403.742) of BDNF in model groups were lower than treatment group ($114106.08 \pm 17849.482 \text{ S}/\mu\text{m}^2$, 29209.88 ± 5725.992) and control group($97567.06 \pm 22224.041 \text{ S}/\mu\text{m}^2$, 29199.65 ± 7865.087)(all $P < 0.01$); Though total area and integrated optical density in treatment group were little lower than control group, there was no significant difference in statistics($P > 0.05$). **Conclusion**

BuJingYiShi tablets can protect the visual function on the rat model of chronic EIOP by improving the expression of BDNF.

【Key words】 Glaucoma; BuJingYiShi tablets; Optic neuroprotection; The rat model of chronic elevated intraocular pressure; Brain-derived neurotrophic factor; Lateral geniculate nucleus

作者单位:1. 610072, 四川成都, 成都中医药大学附属医院; 2. 610100, 四川成都, 龙泉驿区中医医院; 3. 610075, 四川成都, 成都中医药大学
通讯作者:李翔, 教授, E-mail: jeannelxiang@126.com

青光眼是一类以视神经萎缩和进行性视野缺损为共同特征的眼病,是目前世界第一位的不可逆性致盲眼病,发病率和致盲率在世界范围内都在不断上升^[1]。根据世界各地流行病学统计资料估算,2020 年全球患者将上升至 7960 万,双眼失明人数也随之上升为 1120 万,病史在 16 年以上青光眼患者至少有一眼盲的概率约为 28.6%,而 2020 年中国的青光眼患者人数将达到 600 万^[2]。很多青光眼患者早期发病隐匿,发现时已有严重视功能损害。青光眼作为一种不可逆致盲眼病严重影响了人类的生存质量,做好青光眼理论研究、诊断及治疗工作具有重大意义。

本实验通过烙闭巩膜静脉的方法^[3]诱导产生眼压维持稳定、持续时间较长的慢性高眼压(elevated intraocular pressure, EIOP)动物模型,选取补精益视片作为干预药物,通过观察其对 EIOP 大鼠外侧膝状体中 BDNF 含量的影响来探讨补精益视片视功能保护的作用机理,为补精益视片在青光眼治疗的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

1.1.1 实验动物 选取健康清洁级 Sprague-Dawley(SD)大鼠,雌雄不受限,8~12 周龄,体重约 160~200g,并在裂隙灯下检查见眼前节无异常,瞳孔对光反射正常,眼压测定正常,无歪颈者共 30 只。饲养室温 20~25℃,空气流通,相对湿度 55%~75%,12 小时光照维持,昼夜循环。自由摄食饮水。

1.1.2 分组

以 SPSS 统计软件产生随机数字,将大鼠分为 3 组:给药组、对照组及模型组,每组各 10 只。

1.2 药品与试剂

补精益视片(批号 20130215)购于成都中医药大学附属医院。BDNF 多克隆抗体,购于博士德生物工程有限公司。FFA 固定液,由成都中医药大学附属医院病理科提供。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法

选择烙闭巩膜上静脉的方法进行造模:模型组与给药组在眼科手术显微镜下烙闭右眼上巩膜静脉进行造模处理,对照组暴露巩膜上静脉后未行上巩膜静脉热处理,为假烙闭。均对其右眼进行处理,左眼不做处理。

1.3.2 给药方法

每天在 16:00~18:00 之间给大鼠进行灌胃,连续灌胃 8 周。对照组、模型组每天予 3ml 生理盐水灌胃。将补精益视片磨成粉状,加入生理盐水,每 18g 配置成 100ml 混悬液,浓度为 0.18g/ml,给药组混悬液灌胃 1.8g/kg·d。实验中,根据大鼠体重选取混悬液剂量,每只大鼠每天灌胃总量 3ml,所需混悬液剂量不足 3ml 的用生理盐水补足。每 2 周称体重 1 次,根据大鼠体重调整给药量。实验过程中动物死亡 7 只。

1.3.3 检测指标及方法

1.3.3.1 眼压测量

采用 TONO-PEN 笔式眼压计每日固定时间进行眼压测量。分别测量 3 组大鼠造模前、造模后即刻、造模后 2 周、造模后 4 周、造模后 6 周、造模后 8 周右眼的 IOP。

1.3.3.2 尼氏小体含量的测定

(1)取材及固定:给药 8 周后处死大鼠,方法使用颈椎脱臼法。在显微镜下完整剥出大鼠脑组织,将剥下的脑组织置于固定液中固定 72 小时后,参照大鼠脑组织解剖图谱,按大鼠中枢神经解剖定位,根据邻近核团形状判断,切取 LGN,梯度脱水、透明、浸蜡、包埋,常规切片 4μm,烘干备用。(2)免疫组化检测 LGN 内 BDNF 的表达水平:所用抗体为大鼠 BDNF 多克隆抗体。石蜡切片脱蜡,蒸馏水冲洗,滴加一抗,37℃ 孵育 1~2 h;PBS 冲洗,滴加二抗,37℃ 孵育 10~30 min, PBS 冲洗;显色剂显色,充分冲洗复染封片。阳性结果判定:反应部位产生棕黄色沉淀物,位于神经元周围。半定量分析:BDNF 染色的组织内出现细颗粒状、细丝状棕黄色着色为 BDNF 阳性染色。每张切片随机选 5 个视野,每组共 30 个视野,用 Mias-2000 型图形图像分析仪测量 LGN 部位 BDNF 阳性染色灰度,取每个视野均值代表该切片的测量值,表示 BDNF 的表达强度。

1.4 统计方法

应用统计学软件 SPSS19.0 进行数据分析,实验结构的所有计量资料采用均数±标准(\bar{x})表示。计量资料中符合正态分布的:自身前后比较采用配对样本 *t* 检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。对不符合正态分布的计量资料采用非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 眼压

各组大鼠造模前后及组间眼压比较见表 1。由表 1 可见,造模前比较各组之间 IOP,差异无统计学差异(均为 $P > 0.05$)。造模后即刻,对照组 IOP 较造模前略有升高,但前后比较无统计学差异($P > 0.05$);给药组、模型组 IOP 较造模前升高明显,差异有统计学意义($P < 0.01$);造模后即刻,给药组、模型组与对照组 IOP 相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。造模后 8 周,给药组及模型组 IOP 与造模前相比,差异有统计学意义($P < 0.01$);造模后 8 周,与造模后即刻相比,给药组差异有统计学意义($P < 0.01$),模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 补精益视片对慢性 EIOP 大鼠外侧膝状体 BDNF 表达的影响

结果见表 2,图 1-3。由表 2 可见:各组以对照组 BDNF 总面积和积分光密度最高;给药组 BDNF 总面积和积分光密度相较对照组稍有偏低,差异无统计学

意义($P>0.01$);模型组 BDNF 总面积和积分光密度 义($P<0.01$)。 相较对照组及给药组均明显偏低,差异具有统计学意

表 1 各组大鼠组间及造模、用药前后眼压比较($\bar{x} \pm s$)(单位: mmHg)

| 组别 | 眼数 | 造模前 | 造模后即刻 | 造模后 8 周 |
|-----|----|------------|-------------|--------------|
| 对照组 | 8 | 14.60±1.16 | 14.92±1.03 | 14.78±0.92 |
| 模型组 | 7 | 14.86±0.94 | 25.33±1.18▲ | 25.35±0.86▲★ |
| 给药组 | 8 | 14.29±1.06 | 26.17±0.86▲ | 23.31±1.08▲ |
| F | | 0.541 | 294.899 | 261.063 |
| P | | 0.591 | 0.000 | 0.000 |

注:与对照组相比,▲ $P<0.01$;与给药组相比,★ $P<0.01$

表 2 每组大鼠 LGN BDNF 比较

| 组别 | LGN | 总面积($S/\mu m^2$) | 积分光密度 |
|-----|-----|----------------------|---------------------|
| 对照组 | 8 | 114106.08±17849.482 | 29209.88±5725.992 |
| 模型组 | 7 | 55863.31±10264.399▲★ | 15931.84±3403.742▲★ |
| 给药组 | 8 | 97567.06±22224.041 | 29199.65±7865.087 |
| F | | 25.309 | 11.719 |
| P | | 0.000 | 0.000 |

注:与对照组相比,▲ $P<0.01$;与给药组相比,★ $P<0.01$

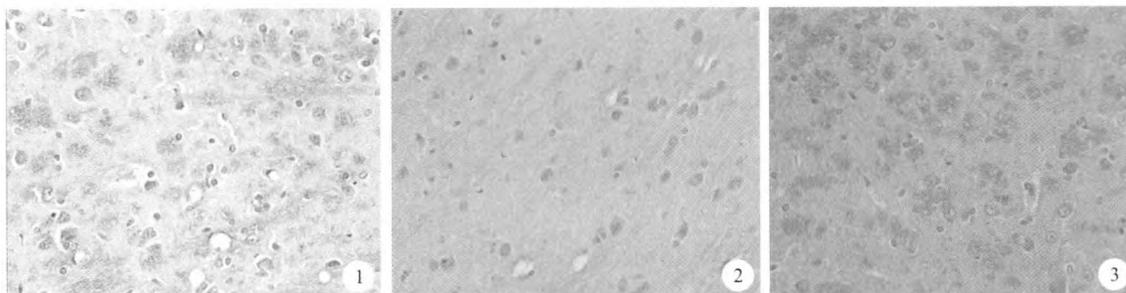


图 1 对照组 LGN BDNF 染色图($\times 200$) 图 2 模型组 LGN BDNF 染色图($\times 200$) 图 3 给药组 LGN BDNF 染色图($\times 200$)

3 讨论

作为目前世界第一位的不可逆性致盲眼病,青光眼的发病机制仍在进一步研究中。正常视觉的形成主要与视网膜、外侧膝状体(lateral geniculate nucleus, LGN)、视皮质有关。视路中各级神经元对视功能的维持都有重要作用。青光眼的视功能障碍是从视网膜到中枢视觉系统广泛区域发生损伤的过程,青光眼的神经损害包括了整个视路,青光眼是一种中枢神经退行变性疾病^[4]。神经退行性病变的特征是跨神经元变性^[5],视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的死亡对 LGN、视皮质等产生影响,损伤的 LGN、视皮质等又反过来对残存的 RGCs 产生影响。中枢视觉系统的损害不仅仅作为一种结果,还在青光眼视功能损伤的进展中起了重要作用。故仅仅将眼压控制到安全水平并不能完全阻止青光眼的继续进展^[6],青光眼的治疗还应针对继发性损害对视功能进

行保护。青光眼的视功能保护已成为青光眼研究的热点难点问题。作为视路上直接接受视神经纤维投射的重要中转核团,外侧膝状体在中枢视觉系统损伤研究中倍受关注。BDNF 是一种小分子量的碱性蛋白,在中枢神经系统中主要在神经元内合成,是一种具有代表性的神经营养因子在视觉系统中,BDNF 是视网膜神经节细胞赖以生存的主要神经营养因子之一,目前已广泛认同脑源性神经生长因子的剥夺是 RGCs 凋亡的诱发因素^[7]。当视神经损伤后,RGCs 本身存在的保护性反应表现之一就是 BDNF 及其受体的表达增高。BDNF 对青光眼视功能保护的研究具有重大意义。所以,选择 LGN 部位的 BDNF 的表达作为观察指标对说明视功能保护的机理具有一定的作用。

青光眼属中医“五风内障”范畴,其视功能损害导致的特异性视神经萎缩和视野缺损类似于“青盲”,主要病机是肝肾虚损、脉络瘀滞,滋养肝肾、活血通络是

(下转第 211 页)

- Ophthalmol, 1998, 116(8): 993-1001.
- [6] 路雪婧, 段俊国, 廖品正, 等. 持续高眼压对大鼠视网膜神经节细胞的损伤[J]. 基础医学与临床, 2005, 25(9): 798-801.
- [7] 冯美江, 丁新生. Akt 与细胞生存[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 2002, 24(5): 283-285.
- [8] Heijl A, Bengtsson B. Long-term effects of timolol therapy in ocular hypertension; a double-masked, randomised trial [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2000, 238(11): 877-883.
- [9] 杨章民, 王一理, 司履生. 磷酸酯肌醇-3 激酶家族研究进展[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 2003, 25(5): 285-289.
- [10] 张薇薇, 苗玲. PI3K/Akt 信号通路及其在神经疾病中的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(6): 755-757.
- [11] D'Agata V, Magro G, Travalì S, et al. Cloning and expression of the programmed cell death regulator Bad in the rat brain[J]. Neurosci Lett, 1998, 243 (1-3): 137-140.
- [12] 吴红色, 柯枝, 陈晓瑞. 大鼠视神经损伤后 Bad 蛋白表达与视网膜神经细胞观察[J]. 法医学杂志, 2006, 22(4): 258-260.
- [13] Burne JF, Staple JK, Raff MC. Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons[J]. J Neurosci. 1996, 16(6): 2064-2073.
- [14] 杨柳, 陈东风. Bcl-2 转基因小鼠视神经损伤后再生轴突生长导向的研究. 中华眼科杂志 2006, 42(2): 100-103.
- [15] 李翔, 毛欣, 张富文. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型视网膜病理改变的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(6): 390-393.
- [16] 毛欣, 李翔. 补肾活血中药对慢性高眼压模型大鼠视功能损害的干预作用[J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(2): 238-240.
- [17] 李翔, 毛欣, 张富文. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型多焦视网膜电图的影响[J]. 四川中医, 2009, 27(8): 18-21.
- [18] 李翔, 曹水清, 毛欣, 等. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型视网膜神经节细胞凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 四川中医, 2010, 28(2): 22-24.
- [19] 李翔, 谢钊, 郭红建, 等. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型外侧膝状体病理改变的影响[J]. 眼科新进展, 2012, 32(1): 20-23.
- [20] 李翔, 谢钊, 郭红建, 等. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型外侧膝状体脑源性神经营养因子改变的影响[J]. 眼科新进展, 2012, 32(10): 18-21.
- [21] Xiang LI, Hong-Jian Guo, Xiao-Xia Wen, Zhao Xie, Xue-jun Xie, Xue-jing Lu, Yi Wang, Jing Zhang. Influence of BuShenHuoXue on primary visual cortex's Nissl bodies damage in rat model of chronic elevated intraocular pressure[J]. Int Eye Sci, 2012; 12(12): 2256-2260.
- [22] Xiang LI, Hong-jian Guo, Xiao-xia Wen, Zhao Xie, Xie Lu Xue-jun, Xue-jing, Yi Wang, Jing Zhang. Influence of BuShenHuoXue on Primary Visual Cortex' BDNF Damage in Rat Model of Chronic Elevated Intraocular Pressure[J]. Int Eye Sci, 2013, 13(4): 647-651.
- [23] 李翔, 文小霞, 张敏, 等. 中药联合甲钴胺片治疗青光眼的 HRT-II 观察[J]. 中国实用眼科杂志, 2010, 28(5): 515-517.

(上接第 205 页)

防治青光眼视功能损害的基本方法。以往的研究也证实补肾活血法(杞菊地黄丸和复方丹参片合用)对 SD 大鼠慢性 EIOP 模型视网膜、视神经、视中枢损伤及眼压控制后青光眼视功能均有一定的保护作用^[8-12]。以滋养肝肾、活血化瘀为主要功效的补精益视片(原名益视片)已在视功能的保护及改善方面取得了良好疗效^[13]。

本实验通过观察慢性 EIOP 大鼠 LGN 部位 BDNF 的表达,进一步探讨补肾活血中药补精益视片对青光眼视功能保护的作用机理。结果表明:慢性高眼压模型会造成 LGN BDNF 表达的减少,使用补精益视片提高了慢性高眼压模型 BDNF 表达。在慢性高眼压的影响下,外侧膝状体 BDNF 的表达明显减少,而 BDNF 是 RGCs 赖以生存的主要神经营养因子之一, LGN BDNF 表达的减少会削弱对视觉通路中的下级神经元的下行营养支持而加重 RGCs 的病变,这即前所言跨神经元变性的病理循环。实验结果提示补精益视片通过提高慢性高眼压模型 BDNF 表达,一方面增强 LGN 细胞的存活能力,减少死亡,另一方面改善了对下级神经元的下行营养支持,从而发挥其治疗作用。实验结果表明,补精益视片可作为临床青光眼视神经保护药物推广应用。

4 参考文献

- [1] Wang Y X, Xu L, Yang H, et al. Prevalence of glaucoma in North China: the Beijing Eye Study [J]. Am J Ophthalmol, 2010, 150(6): 917-924.
- [2] Quigley H A, Broman A T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. Br. J. Ophthalmology, 2006, 90(3): 262-267.
- [3] Akira S, Neufeld AH. Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure[J]. Exp Eye Res, 1999, 69(5): 525-531.
- [4] Gupta N, Yucel YH. Glaucoma and the brain. J Glaucoma, 2001; 10(11): S28-29 .
- [5] Timothy M. Woods, Catherine G. Cusick, Tim P. Pons, Edward Taub, and Edward G. Jones. Progressive Transneuronal Changes in the Brainstem and Thalamus after Long-Term Dorsal Rhizotomies in Adult Macaque Monkeys [J]. The Journal of Neuroscience. 2000, 20(10): 3884-3899.
- [6] Parc CE, Johnson DH, Oliver JE, et al. The long-term outcome of glaucoma filtration surgery [J]. Am J Ophthalmol, 2001, 108(3): 956-959.
- [7] Osborne NN; et al. Ganglion cell death in glaucoma; what do we really know? [J]. B. J. Oph. 1999, 83(8): 980-986.
- [8] 毛欣, 李翔. 补肾活血中药对慢性高眼压模型大鼠视功能损害的干预作用[J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(2): 238-240.
- [9] 李翔, 文晓霞, 张敏, 等. 中药联合甲钴胺片治疗眼压控制后青光眼的 HRT-II 观察 [J]. 中国实用眼科杂志, 2010, 28(5): 515-517.
- [10] 李翔, 谢钊, 郭红建, 等. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型外侧膝状体病理改变的影响[J]. 眼科新进展, 2012, 32(1): 20-23.
- [11] 李翔, 谢钊, 郭红建, 等. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型外侧膝状体脑源性神经营养因子改变的影响[J]. 眼科新进展, 2012, 32(10): 18-21.
- [12] Xiang LI, Hong-Jian Guo, Xiao-Xia Wen, et al. Influence of BuShenHuoXue on primary visual cortex's Nissl bodies damage in rat model of chronic elevated intraocular pressure[J]. Int Eye Sci, 2012, 12(12): 2256-2260.
- [13] 汪辉, 汪娟, 张玲. 补精益视片对孔源性视网膜脱离复位术后视功能的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(2): 23-24.