

补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型视神经 BDNF 改变的影响

李翔 李娟 张静 王桃 杨东梅 王超

【摘要】 目的 观察补肾活血中药对大鼠慢性高眼压(elevated intraocular pressure, EIOP)模型视神经(optic nerve, ON)脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophin factor, BDNF)的干预作用,探讨其作用机理。**方法** 采用烙闭上巩膜静脉法,烙闭大鼠 3 支上巩膜静脉,建立大鼠慢性 EIOP 模型,随机分为 3 组:空白组,模型组,给药组。连续灌胃 8 周,并于 8 周末处死大鼠,观察补肾活血法对 EIOP 大鼠眼压、视神经的 BDNF 表达的影响。**结果** 本实验采用的烙闭上巩膜静脉的造模方法使大鼠 IOP 明显升高($P < 0.01$),在造模后 8 周(实验结束)IOP 仍为造模前的 2~3 倍;BDNF 表达总面积、平均光密度、积分光密度空白组($199882.9 \pm 24012.79 \mu\text{m}^2$, 334.3 ± 52.58 , 41453.0 ± 1646.85)与模型组($148219.4 \pm 17978.48 \mu\text{m}^2$, 241.2 ± 49.17 , 37391.7 ± 2533.45)比较均有统计学意义($P < 0.01$);模型组与给药组($148219.4 \pm 17978.48 \mu\text{m}^2$, 301.2 ± 36.44 , 40439.1 ± 2000.05)比较亦均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 慢性高眼压大鼠视神经 BDNF 表达降低,补肾活血中药有助于恢复 EIOP 大鼠视神经 BDNF 表达。

【关键词】 青光眼; 补肾活血中药; 视神经; 大鼠慢性高眼压模型; 视神经保护; BDNF(脑源性神经生长因子)

DOI:10.3969/j.issn.1674-9006.2013.02.010

中图分类号:R775

Effects of traditional Chinese medicine of BuShenHuoXue on the expression of brain-derived neurotrophin factor on optic nerve in rat model of chronic elevated intraocular pressure LI Xiang, LI Juan, ZHANG Jing, WANG Tao, WANG Chao, YANG Dong-mei (Department of Ophthalmology, the Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 610072)

【Abstract】 Objective To observe the effect traditional Chinese medicine (TCM) of BuShenHuoXue on the expression of brain-derived neurotrophin factor (BDNF) on optic nerve in the rat model of chronic elevated intraocular pressure (EIOP), and preliminarily explore its mechanism. **Methods** the rat model of chronic EIOP was established by unilaterally cauterizing 3 episcleral vessels, then randomly divided into 3 groups: control group, model group and treatment group. After given TCM of BuShenHuoXue and normal saline for 8 weeks, killed the rats and taken out optic nerve. The effect of TCM of BuShenHuoXue on the EIOP rat model's intraocular pressure (IOP) and the effect of the expression on BDNF in optic nerve was observed. **Results** Unilaterally cauterizing episcleral vessels increased IOP of the rat model obviously ($P < 0.01$). At the end of the experiment, the level of IOP was 2~3 times than before modeling; BDNF in optic nerve of total area, mean optical density and integrated optical density in model group ($148219.4 \pm 17978.48 \mu\text{m}^2$, 241.2 ± 49.17 , 37391.7 ± 2533.45) was statistically significant compared with normal group ($199882.9 \pm 24012.79 \mu\text{m}^2$, 334.3 ± 52.58 , 41453.0 ± 1646.85 , all $P < 0.01$), there was statistically difference in BDNF of total area, mean optical density and integrated optical density between model group and treatment group ($180755.6 \pm 17206.34 \mu\text{m}^2$, 301.2 ± 36.44 , 40439.1 ± 2000.05 , all $P < 0.05$). **Conclusion** The expression of BDNF decreased in the rat model of chronic EIOP, TCM of BuShenHuoXue can improved the expression of BDNF on optic nerve in the EIOP rat model.

【Key words】 Glaucoma; TCM of BuShenHuoXue; Optic neuroprotection; The rat model of chronic elevated intraocular pressure; Optic nerve; Brain-derived neurotrophin factor

青光眼(glaucoma)是一类以特异性视神经萎缩和视野缺损为共同特征的眼病。探讨青光眼视神经损伤

的作用机制,有助于保护视功能。本实验采用烙闭上巩膜静脉法诱导产生眼压维持稳定、持续时间较长的慢性高眼压动物模型^[1],通过观察补肾活血中药(杞菊地黄丸和复方丹参片合用)对 EIOP 大鼠眼压及视神经脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophin

基金项目:四川省教育厅 2010 年重点项目(编号:10ZA096)
作者单位:610072,四川成都,成都中医药大学附属医院眼科
通讯作者:李娟, E-mail:lggyd@126.com

factor, BDNF)表达的影响,探讨其保护视功能的作用机理,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

标准 1 级 SD 大鼠 30 只,雌雄不拘,8~12 周龄,体重约 150~200g,等价饲料饲养,大鼠及饲料均由成都中医药大学实验动物中心提供。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。纳入标准:①无外眼疾病;②双眼瞳孔直接对光反射和间接对光反射正常;③无歪颈。

1.2 药品与试剂

复方丹参片(批号 7122426)、杞菊地黄丸(批号 7072153)均购于北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂。BDNF 多克隆抗体(批号 BA0565),购于博士伦生物工程有限公司。

1.3 造模方法

SD 大鼠购回后,适应性喂养 3 天,进行眼压测量,正常眼压区间估计,取平均眼压在 9~18mmHg 者,随机分为空白组、模型组、给药组,模型组和给药组进行单眼(右眼)造模,左眼不做处理。方法如下:大鼠称重及固定后,用 3% 戊巴比妥钠按 1.5ml/kg 体重行左下腹腔注射全身麻醉,同时术眼予 0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液角结膜表面麻醉,于 10 点至 2 点钟位距角巩膜缘 1~2mm 剪开上方球结膜,分离筋膜,暴露角巩膜缘后 3~4mm 近赤道部 10 点、12 点和 1 点处 3 支上巩膜静脉并烙闭,整复球结膜,术眼涂金霉素眼膏,待大鼠苏醒后放回笼内,0.25% 氯霉素眼液滴眼,2 次/日,连续 6 天。假手术组(空白组)右眼眼科手术止血器不开开关而不起烙闭作用,其余操作相同。因为灌胃等原因动物死亡 4 只。

1.4 分组与给药方法

将以上各组大鼠连续给药 8 周,方法如下:空白组、模型组每天予 3ml 生理盐水灌胃;给药组每天灌胃予 0.96g/kg 体重的复方丹参片、3.0g 原生药/kg 体重的杞菊地黄丸的混悬液,相当于 20 倍成人剂量;每天同一时间灌胃 1 次,连续灌胃 8 周。每 2 周称大鼠体重 1 次,调整给药量。

1.5 眼压检测

均在每天的同一时间(2:00pm~5:00pm)进行。待测眼盐酸丙美卡因滴眼液表面麻醉后,用 TONO-PEN 笔式眼压计连续测量术前 3 天眼压,取平均值作为正常眼压;术后即刻、术后一周、术后二周、术后四

周、术后六周、术后八周各测一次大鼠右眼眼压,共 8 周。

1.6 BDNF 免疫组化检测

于造模 8 周后以颈椎脱臼法处死大鼠,切取后极部包括视乳头和视神经在内的组织块,立即放入复合固定液(75% 酒精 850ml、10% 甲醛 100ml、5% 醋酸 50ml 混合液)中,固定 72h 后,标本逐级酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,于球后 2~4mm 处,做 4 μ m 连续切片,烘干备用。染色步骤:所用抗体为大鼠 BDNF 多克隆抗体;石蜡切片脱蜡至水;3% H₂O₂ 室温孵育 5~10min;蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5min;5-10% 的正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10min,倾去血清,勿洗,滴加适当比例稀释的一抗,37℃ 孵育 1-2h;PBS 冲洗,5min \times 3 次;滴加适当比例稀释的生物素标记二抗(1% BSA-PBS 稀释),37℃ 孵育 10~30min;PBS 冲洗,5 分钟 \times 3 次;滴加适当比例稀释的辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(PBST 稀释),37℃ 孵育 10~30min;PBS 冲洗,5 分钟 \times 3 次;显色剂显色(DAB 或 AEC);自来水充分冲洗,复染,封片。大鼠 BDNF 多克隆抗体进行 BDNF 免疫组化染色,结果判定及半定量分析: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 3 个视野,每组共 18 个视野,用 Mias-2000 型图形图像分析仪测量视神经部位 BDNF 阳性染色灰度,求取每视野均值代表该切片的测量值,分别表示 BDNF 的表达强度。

2 统计方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。自身前后对照比较用配对 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析,各项指标均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.01$ 或 <0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠组间及造模、用药前后眼压比较(见表 1):

分组	眼	造模前	造模后即刻	用药后 8 周
空白组	9	10.36 \pm 2.4661	11.42 \pm 3.1315	12.04 \pm 3.8293
模型组	9	10.54 \pm 3.4946	28.14 \pm 7.3919 \triangle \blacktriangle	27.58 \pm 6.3129 \triangle \blacktriangle
给药组	8	9.52 \pm 4.0162	31.74 \pm 8.3153 \triangle \blacktriangle	25.64 \pm 5.5894 \triangle \blacktriangle
<i>F</i>		0.253	28.573	22.565
<i>P</i>		0.778	0.000	0.000

Note:与造模前相比, $\triangle P<0.01$;与空白组相比, $\blacktriangle P<0.01$

由表 1 可见:造模前各组大鼠 IOP 相比较无统计学意义($P>0.05$),造模后即刻,模型组和给药组与空白组相比较有统计学意义,说明造模成功($P<0.01$),而模型组和给药组眼压之间无统计学意义($P>0.05$),具有组间均衡性;用药后 8 周,模型组、给药组与空白组及造模前眼压比较有统计学意义($P<0.01$),表明高血压维持良好,模型组与给药组眼压比较无统计学意义($P>0.05$),但给药组有降低趋势。

3.2 补肾活血中药对 EIOP 大鼠视神经 BDNF 表达

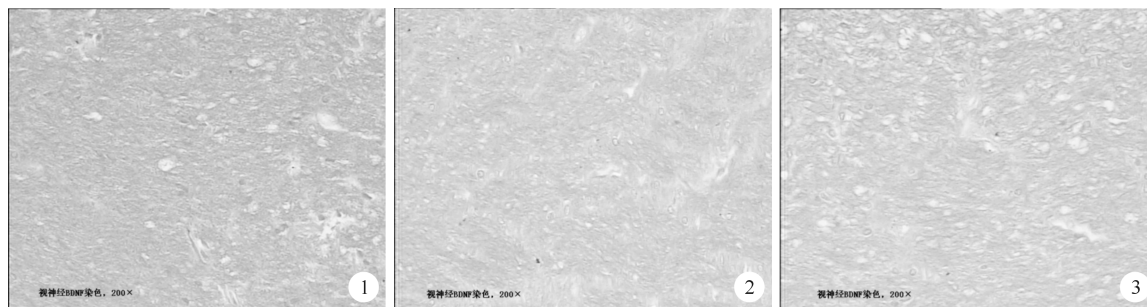


图 1 空白组 BDNF 染色 图 2 模型组 BDNF 染色 图 3 给药组 BDNF 染色

由表 2、图 1-3 表可见:造模后,大鼠视神经 BDNF 表达总面积、平均光密度、积分光密度均显著降低($P<0.05$)。而给予补肾活血中药后,BDNF 表达总面积、平均光密度、积分光密度均有所恢复,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),与空白组比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示慢性 EIOP 引起大鼠视神经的 BDNF 表达减少,补肾活血中药可对 BDNF 表达恢复有作用。

4 讨论

青光眼是一个多因素疾病,其发病机制尚未完全清楚。但是不管发病机制是什么,最终导致青光眼视功能损害的病理基础是视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的进行性凋亡及视神经纤维的丢失^[2],临床中即使眼压控制到正常范围,视野缺损和 RGCs 的凋亡仍在继续,因此视神经的保护很重要。脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophin factor, BDNF) 是一种具有抑制神经元死亡功能的碱性蛋白质,与神经元的发育、分化、正常存活与功能表达、程序化死亡等有关;可促进受损神经元的存活与再生,还可预防或改善某些神经元的病理过程^[3]。BDNF 是神经系统最主要的神经营养因子之一,有很强的刺激和促进神经细胞生长、分化,促使损伤细胞修复作用。BDNF 还能促进神经元突起的可塑性,例如

的影响(见表 2):

表 2 各组大鼠视神经 BDNF 表达比较($\bar{x}\pm s$)

分组	总面积(μm^2)	平均光密度	积分光密度
空白组	199882.9±24012.79	334.3±52.58	41453.0±1646.85
模型组	148219.4±17978.48▲	241.2±49.17▲	37391.7±2533.45▲
给药组	180755.6±17206.34△	301.2±36.44△	40439.1±2000.05△
F	10.269	3.809	6.125
P	0.002	0.046	0.011

Note:与空白组相比,▲ $P<0.05$;与模型组相比,△ $P<0.05$

增加突起的密度,促进包括轴突和树突在内的突起生长^[4],除广泛分布于中枢神经系统和感觉神经及骨髓运动神经元,BDNF 主要在视网膜光感受器细胞层、内核层、神经节细胞和神经纤维层中表达,大部分由视网膜自身分泌,对 RGCs 的存活起重要作用。目前对于 RGCs 凋亡的认识中已得到广泛认同的一个诱发因素就是神经营养因子,尤其是 BDNF 的剥夺^[5]。当视神经损伤后,RGCs 本身存在保护性反应,其表现之一就是 BDNF 及其受体的表达增高。所以,选择视神经部位的 BDNF 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”,我们的前期研究已经从视网膜、视中枢角度观察了补肾活血对青光眼视功能保护的作用及机理,结果显示:补肾活血中药(杞菊地黄丸和复方丹参片合用)可以抑制 EIOP 大鼠视网膜神经纤维层 (retinal nerve fiber layer, RNFL) 和视网膜神经节细胞层 (retinal ganglion cells layer, RGCL) 变薄,改善 RGCs 超微结构,防止 RGCs 和 RNFL 损害,有助于多焦视网膜电图 (multifocal electroretinogram, mfERG) 总波及 1、2、3、4 环 P1 波反应密度、总波 P1 波峰潜时、2 环及 3 环 N1 波反应密度,3 环、4 环 N1 波峰潜时的恢复^[6,7],上调 RGCs 抗凋亡基因 Bcl-2,抑制凋亡促进基因 Bax^[8],并

可修复初级视皮质(primary visual cortex, PVC)及外侧膝状体(lateral geniculate nucleus, LGN)的损伤,提高 EIOP 大鼠 PVC 及 LGN 的 BDNF 表达^[9,10]。临床观察也发现,加用补肾活血中药(杞菊地黄丸和复方丹参片合用)后,青光眼患者的视功能可以得到不同程度的改善^[11,12]。

本研究通过观察慢性 EIOP 大鼠视神经部位的 BDNF 表达改变,进一步探讨补肾活血中药对青光眼视功能保护的作用机理。结果发现,慢性高血压可导致大鼠视神经 BDNF 表达低下,而补肾活血中药对模型大鼠视神经的 BDNF 表达具有恢复作用,从而对视神经起到保护作用。杞菊地黄丸为经典古方,为滋补肝肾明目的代表方剂,复方丹参片活血化瘀通络,两者均为《中国药典》载入药品、非处方用药,价廉物美,服用方便,可作为临床青光眼视神经保护药物推广应用。

5 参考文献

[1] Akira S, Arthur H. Neufeld. Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Experimental Eye Research*, 1999, 69(5): 525-531.

[2] Marquis RE, Whitson JT. Management of Glaucoma: Focus on Pharmacological Therapy [J]. *Drugs & Aging*, 2005, 22(1): 1-21.

[3] Mey J. Tbaos Intravital injection of neurotrophic factor supports survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo [J]. *Brain Res*, 1993, 60(2): 304-317.

[4] Mertz K, Koscheck T, Schilling K. Brain-derived neurotrophic

factor modulates dendritic morphology of cerebellar basket and stellate cells [J]. *An in vitro study Neuroscience*, 2000, 97(2): 303-310.

[5] Osbrone NN, John P M Wood, Glyn Chidlow, Ji-Hong Bae, JO Melena, Mark S Nash. Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know [J]. *B. J. Oph*, 1999, 83(8): 980-986.

[6] 李翔, 毛欣, 张富文. 补肾活血中药对大鼠慢性高血压模型视网膜病理改变的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2010, (6): 390-393.

[7] 李翔, 毛欣, 张富文. 补肾活血中药对大鼠慢性高血压模型多焦视网膜电图的影响 [J]. *四川中医*, 2009, 10(8): 18-21.

[8] 李翔, 曹水清, 毛欣, 黄江丽. 补肾活血中药对大鼠慢性高血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.

[9] 李翔, 谢钊, 郭红建, 谢学军, 路雪婧, 王毅, 王超. 补肾活血中药对大鼠慢性高血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.

[10] 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 (国际眼科杂志)*, 2013, 13(4): 647-651.

[11] 李翔, 文晓霞, 张敏, 谢钊. 补肾活血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): 95-97.

[12] 李翔, 郭红建, 谢学军, 王万杰. 补肾活血中药联合甲钴胺片治疗眼压控制后青光眼的疗效观察 [J]. *辽宁中医*, 2010, 37(9): 1703-1706.