

引文格式: 李翔, 马世勇, 李娟, 王毅. 补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型视神经病理改变的影响[J]. 眼科新进展, 2013, 33(2): 122-125.

【实验研究】

补肾活血中药对大鼠慢性高眼压模型视神经病理改变的影响[△]

李翔 马世勇 李娟 王毅

作者简介: 李翔, 女, 1964年7月出生, 博士, 主任医师、教授, 硕士、博士研究生导师。联系电话: 13658080415; E-mail: jeannelxiang@126.com

About LI Xiang: Female, born in July, 1964. Doctor degree. Tel: 13658080415; E-mail: jeannelxiang@126.com

收稿日期: 2012-07-27
修回日期: 2012-10-10

本文编辑: 付中静

△基金项目: 四川省教育厅 2010年重点项目(编号: 10ZA096)

作者单位: 610072 四川省成都市, 成都中医药大学附属医院眼科

通讯作者: 马世勇, E-mail: msy216@163.com

Received date: Jul 27 2012

Accepted date: Oct 10 2012

Foundation item: 2010 Key Projects of Sichuan Provincial Education Department (No: 10ZA096)

From the Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Responsible author: MA Shi-Yong
E-mail: msy216@163.com

Effects of traditional Chinese medicine of Bushenhuoxue on pathological changes of optic nerve injury in rat model of chronic elevated intraocular pressure

LI Xiang, MA Shi-Yong, LI Juan, WANG Yi

【Key words】 glaucoma; TCM of Bushenhuoxue; optic neuroprotection; rat model of chronic elevated intraocular pressure; optic nerve

【Abstract】 Objective To observe the effects of traditional Chinese medicine (TCM) of Bushenhuoxue on the pathological changes of optic nerve injury in rat model of chronic elevated intraocular pressure (EIOP), and preliminarily explore its mechanism. Methods By unilaterally cauterizing 30 episcleral vessels, the rat model of chronic EIOP was established. It was randomly and equally divided into 3 groups: control group, model group and treatment group, 10 cases in each group. After giving TCM of Bushenhuoxue and normal saline for 8 weeks, the rats were killed and taken out the brains, and the effects of Bushenhuoxue on intraocular pressure (IOP) and pathological changes of optic nerve were observed. Results IOP of rat model obviously increased by unilaterally cauterizing episcleral vessels (all $P < 0.01$). At the end of the experiment, IOP was 2-3 times than before modeling; Semi-quantitative pathological analysis showed that the total area of myelin sheath in optic nerve fiber, average optical density and integrated optical density in model group were ($98\ 048.810 \pm 8139.059$) μm^2 , 517.840 ± 118.862 , $18\ 031.320 \pm 1895.210$ were significant different from the control group [($144\ 975.320 \pm 10\ 341.487$) μm^2 , 768.700 ± 167.331 , $29\ 283.350 \pm 2331.446$, all $P < 0.05$]; There were statistical differences between model group and treatment group [($109\ 420.500 \pm 55\ 263.250$) μm^2 , 710.080 ± 150.956 , $24\ 225.730 \pm 5455.363$, all $P < 0.05$]; There were obvious ultrastructural damages in optic nerve of model group, which reduced in treatment group. Conclusion

TCM of Bushenhuoxue can repair the injury of optic nerve in the rat model of chronic EIOP.

[Rec Adv Ophthalmol 2013, 33(2): 122-125]

【关键词】 青光眼; 补肾活血中药; 视神经保护; 大鼠慢性高眼压模型; 视神经

【摘要】 目的 观察补肾活血中药对大鼠慢性高眼压(elevated intraocular pressure, EIOP)模型视神经损伤的干预作用, 探讨其作用机理。方法 30只(30眼)SD大鼠采用烙闭上巩膜静脉法建立大鼠慢性EIOP模型, 随机分为三组: 对照组、模型组、给药组, 每组各10只, 观察补肾活血中药对EIOP大鼠眼压(intraocular pressure, IOP)、视神经病理形态学变化以及超微结构的影响。结果 本实验采用的烙闭上巩膜静脉法使大鼠IOP明显升高(均为 $P < 0.01$)。在造模后8周(实验结束)IOP仍为造模前的2~3倍; 视神经病理切片半定量分析表明: 视神经纤维髓鞘总面积、平均光密度值及积分光密度值分别为: 模型组($98\ 048.810 \pm 8139.059$) μm^2 、(517.840 ± 118.862)、($18\ 031.320 \pm 1895.210$), 对照组各指标分别为($144\ 975.320 \pm 10\ 341.487$) μm^2 、(768.700 ± 167.331)、($29\ 283.350 \pm 2331.446$), 两组间比较差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$); 给药组各指标分别为($109\ 420.500 \pm 55\ 263.250$) μm^2 、(710.080 ± 150.956)、($24\ 225.730 \pm 5455.363$), 与模型组各指标比较, 差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$); 模型组大鼠视神经超微结构损害明显, 给药组损害有所改善。结论 补肾活血中药有助于EIOP大鼠视神经损伤的修复。

[眼科新进展 2013, 33(2): 122-125]

青光眼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^[1], 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

性高血压(elevated intraocular pressure, EIOP)动物模型^[2]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(intraocular pressure, IOP)、视神经病理形态学变化等指标的影响,探讨补肾活血中药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

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 清洁级SD大鼠30只(30眼,购于成都中医药大学动物实验中心),雌雄各半,8~12周龄,体质量160~200 g。室温20~25℃饲养,空气流通,相对湿度55%~75%,12 h光照维持,昼夜循环,自由摄食饮水。SD大鼠购回后,适应性喂养3 d,测量IOP,取平均IOP在9~18 mmHg(1 kPa=7.5 mmHg)者,以SPSS统计软件产生随机数字,分为3组:对照组、模型组、给药组,每组各10只。纳入标准:(1)无外眼疾病;(2)双眼瞳孔对光反射正常;(3)无斜颈。

1.1.2 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。复合固定液由成都中医药大学附属医院病理科提供。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 模型组和给药组大鼠进行单眼(右眼)造模,方法如下:大鼠称体质量、麻醉及固定后,用30 g·L⁻¹戊巴比妥钠按1.5 mL·kg⁻¹行左下腹腔注射全身麻醉,同时术眼予5 g·L⁻¹盐酸丙美卡因滴眼液行角结膜表面麻醉,于10点至2点钟位距角巩膜缘1~2 mm剪开上方球结膜,分离筋膜,暴露角巩膜缘后3~4 mm近赤道部10点、12点和1点钟位处3支上巩膜静脉,并以眼科手术止血器烙闭,整复球结膜,术眼涂金霉素眼膏,待大鼠苏醒后放回笼内,2.5 g·L⁻¹氯霉素眼液滴眼,每天2次,连续6 d。对照组单眼(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,左眼不处理。因为灌胃致动物死亡4只(对照组、模型组各1只,给药组2只)。将各组大鼠连续给药8周,方法如下:造模后第2天,对照组、模型组每天予3 mL生理盐水灌胃;给药组每天0.96 g·kg⁻¹复方丹参片、原生药3.0 g·kg⁻¹杞菊地黄丸混悬液共3 mL灌胃,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。均于每2周称体质量1次,调整给药量。

1.2.2 取材及标本处理 于造模8周后以颈椎脱臼法处死大鼠,切取后极部包括视盘和视神经在内的组织块,立即放入复合固定液(体积分数75%酒精850 mL、体积分数10%甲醛100 mL、体积分数5%醋酸50 mL混合液)中,固定72 h后,标本逐级酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,于球后2~4 mm处做4 μm连续切片,烘干备用。

1.3 IOP测量 选用TONO-PEN笔式IOP计测量IOP,在每天的同一时间进行,连续测量术前3 d IOP,取平均值为正常IOP;术后即刻、术后3 d、术后每7 d各测一次IOP,共8周。

1.4 光镜下病理形态学观察 切片脱蜡,蒸馏水冲洗,变色酸2R液染色10 min,体积分数0.2%冰醋酸洗液2~3次,加入体积分数0.5%亮绿冰醋酸液复染10 min,自来水洗2 min,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封闭。阳性结果判定:神经髓鞘呈深红色,轴索和间质呈绿色,脱髓鞘纤维不着色,髓鞘在组织内呈深红色。每组皆随机选择6只大鼠,每只大鼠各1张视神经切片(每张随机选取2个视野),共12个视野,用Mias-2000型图形图像分析仪测定每个视野下视神经纤维髓鞘的总面积、平均光密度值总和及积分光密度值总和。

1.5 电镜下视神经超微结构观察 各组随机选取1只SD大鼠,麻醉、固定、断头取脑,将视神经球后段切成2 mm³小块,体积分数3%戊二醛组织固定液4℃冰箱内固定2 h,10 g·L⁻¹锇酸后固定30 min,梯度丙酮脱水,1:1纯丙酮与Epon812环氧树脂包埋剂混合液浸透30 min,纯包埋液浸透1~2 h,入Epon812包埋液,放入温箱-40℃中置12 h之后于-60℃中置48 h,取出包埋块,半薄切片厚度1 μm,选取要观察部位行超薄切片,厚度70 nm,铅、铀双染色后,电镜下观察视神经超微结构(由四川大学华西医学中心电镜室完成)。

1.6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 13.0软件进行统计分析,多组间比较均采用单因素方差分析,自身前后比较采用配对t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EIOP大鼠IOP 各组大鼠组间及造模、用药前后IOP比较见表1。

表1 各组大鼠组间及造模、用药前后IOP比较
Table 1 IOP comparison between each group before and after modeling and treatment

Group	$(\bar{x} \pm s, P/\text{mmHg})$		
	Pre-models	Models building	8 weeks after-models
Control	10.360 0 ± 2.466 1	11.420 0 ± 3.131 5	12.040 0 ± 3.829 3
Model	10.540 0 ± 3.494 6	28.140 0 ± 7.391 9 [△]	27.580 0 ± 6.312 9 [△]
Treatment	9.520 0 ± 4.016 2	31.740 0 ± 8.315 3 [△]	25.640 0 ± 5.589 4 [△]
F	0.253	28.573	22.565
P	0.778	0.000	0.000

Note: Compared with pre-models, [△] $P < 0.01$; Compared with control group, [△] $P < 0.01$

由表1可见:造模前各组大鼠IOP比较差异无统计学意义($P > 0.05$);造模后,IOP即刻升高至造模前的2~3倍,直至造模后8周(均为 $P < 0.01$),说明大鼠EIOP模型造模成功。造模后8周,模型组、给药组和对照组相比,差异均有显著统计学意义。

(均为 $P < 0.01$) ; 而给药组与模型组比较有所下降 , 但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) , 说明补肾活血中药可能有降低 EIOP 大鼠 IOP 的作用。

2.2 补肾活血中药对 EIOP 大鼠视神经纤维髓鞘的影响 各组大鼠视神经纤维髓鞘各指标比较见表 2。由表 2 可见: 模型组的视神经纤维髓鞘总面积、平均光密度值及积分光密度值均明显低于对照组 , 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$, 图 1-图 3) ; 与模型组相比 给药组视神经纤维髓鞘总面积、平均光密度值及积分光密度值增高 , 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$) ; 给药组各指标与对照组差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$) 。结果提示: EIOP 可导致大鼠视神经纤维髓鞘含量降低 , 补肾活血中药可以增加 EIOP 大鼠视神经纤维髓鞘的含量。

2.3 补肾活血中药对 EIOP 大鼠视神经超微结构的影响 对照组 SD 大鼠轴突排列均匀、紧密 , 细胞核呈圆形或卵圆形 , 胞浆中细胞器丰富 , 线粒体及其嵴、内质网等形态正常 , 清晰可见 , 髓鞘完整较致密 , 排列有序 (图 4) 。

模型组 SD 大鼠超微结构破坏明显 (图 5) , 表现为内质网扩张呈空泡状 , 线粒体部分肿胀、嵴断裂 , 出现空泡; 髓鞘折叠、起皱、变薄。

表 2 各组大鼠视神经纤维髓鞘各指标比较

Table 2 Comparison of each index of myelin sheath in optic nerve fiber between each group

Group	Total area($S/\mu m^2$)	Mean optical density	Integrated optical density
Control	144 975.320 ± 10 341.487	768.700 ± 167.331	29 283.350 ± 2331.446
Model	98 048.810 ± 8139.059 [▲]	517.840 ± 118.862 [▲]	18 031.320 ± 1895.210 [▲]
Treatment	109 420.500 ± 55 263.250 [△]	710.080 ± 150.956 [△]	24 225.730 ± 5455.363 [△]
F	17.853	4.775	14.740
P	0.000	0.025	0.000

Note: Compared with control group , [▲] $P < 0.05$; Compared with model group , [△] $P < 0.05$

给药组 SD 大鼠的超微结构有所改善 , 表现为视神经髓鞘结构破坏、排列紊乱、轴突水肿、线粒体肿胀、嵴断裂 , 内质网扩张等程度均减轻 , 轴浆较均匀 , 轴索内可见较多的微丝及线粒体等细胞器结构 , 分布、排列较均匀 , 结构稍疏松 , 神经胶质细胞核的常染色质分布较均匀 , 核周间隙较宽 , 胞浆中细胞器略减少 (图 6) 。

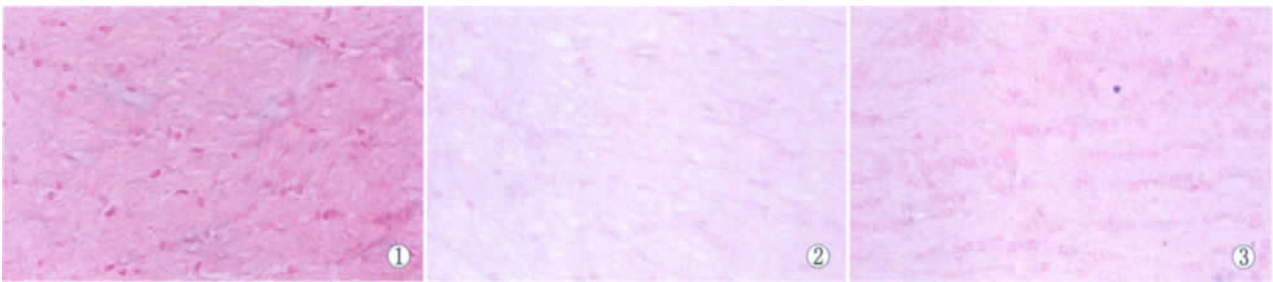


Figure 1 Chromotropic acid 2R-bright green myelin staining of optic nerve fiber myelin sheath in control group. Figure 2 Chromotropic acid 2R-bright green myelin staining of optic nerve fiber myelin sheath in model group. Figure 3 Chromotropic acid 2R-bright green myelin staining of optic nerve fiber myelin sheath in treatment group 图 1 对照组大鼠视神经纤维髓鞘染色 2R-亮绿髓鞘染色。图 2 模型组大鼠视神经纤维髓鞘染色 2R-亮绿髓鞘染色。图 3 给药组大鼠视神经纤维髓鞘染色 2R-亮绿髓鞘染色

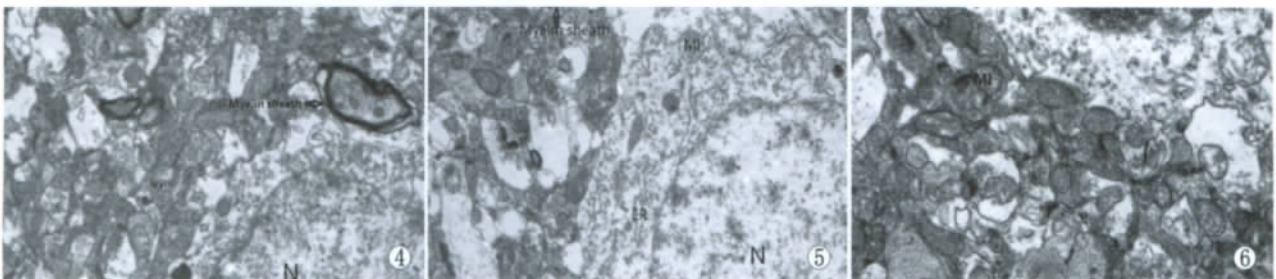


Figure 4 Ultrastructure of optic nerve in control group. Figure 5 Ultrastructure of optic nerve in model group. Figure 6 Ultrastructure of optic nerve in treatment group 图 4 对照视神经超微结构。图 5 模型组视神经超微结构。图 6 给药组视神经超微结构

3 讨论

青光眼是一个多因素疾病 , 其发病机制尚未完全清楚 , 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 , RGC) 的进行性凋亡及视神经纤维的丢失^[3] , 临床中即使 IOP 控制到正常范围 , 视野缺损和 RGC 的凋亡仍在继续 , 因此 , 视神经的保护很重要。从青光眼的发病机制可知: 随着机械压力、缺血缺氧时间的延长 , 视神经由

最早的球内视神经层变薄萎缩到筛板区变性 , 进一步发展到球后视神经损伤、变性 , 同时由于筛板受损、神经通路受阻 , 影响神经轴浆流运输 , 使上行的顺向轴浆流不畅 , 眼球内营养不能被送达神经 , 下行的逆向轴浆流不畅 , 再加上机械压力 , 最终使球后视神经受损、变性 , 表现为球后视神经不但轴突数量明显减少 , 而且结构明显破坏 , 出现轴索变性、沃勒变性、节段性脱髓鞘、轴突萎缩、线粒体肿胀、空泡化、间质改变等一系列周围神经的超微结构改变^[4]。视

神经由 RGC 的轴突在视盘处会聚,再穿过巩膜而构成,作为中枢神经系统的一部分,视神经轴突在离开巩膜筛板后即有鞘膜包裹,髓鞘是包裹在神经细胞轴突外面的一层膜,即髓鞘由髓鞘细胞的细胞膜组成,髓鞘能通过“跳跃式传导”的机制来加快动作电位的传递,在一些轴突受损的情况下引导轴突的再生,它使神经兴奋在沿神经纤维传导时速度加快,并保证其定向传导,髓鞘的脱失会使神经冲动的传递受到影响。因此,选择视神经纤维髓鞘作为观察大鼠 EIOP 模型视神经损害的指标。

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 RGC 超微结构,防止 RGC 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^[5-6],上调 RGC 抗凋亡基因 bcl-2、抑制凋亡促进基因 bax^[7],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^[8-9]。临床观察也发现^[10-11],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改善。

本实验以实验性青光眼大鼠为研究对象,通过观察慢性 EIOP 大鼠 IOP、视神经病理形态改变,进一步探讨补肾活血法对青光眼视功能保护的作用机理。本研究结果显示, EIOP 可导致大鼠视神经纤维髓鞘含量降低,而补肾活血中药可以增加 EIOP 大鼠视神经纤维髓鞘的含量,从而对视神经起到保护作用。

电镜下的超微结构观察也发现, EIOP 大鼠视神经损伤明显,视神经髓鞘结构破坏、排列紊乱,轴膜脱离、结构消失,轴浆内微丝、微管、核糖体数量少或消失,线粒体肿胀、变性,轴索变细,髓鞘折叠起皱、

变薄,有节段性脱髓鞘,髓鞘板层疏松、分离,其间可见水肿液和崩解的碎片,轴突排列紊乱、稀疏、肿胀,数量明显减少,有较多空白区域。内质网扩张明显呈空泡状,线粒体肿胀、嵴断裂,出现空泡。而给予补肾活血中药后,视神经髓鞘结构破坏、排列紊乱、轴突水肿、线粒体肿胀、嵴断裂、内质网扩张等程度均减轻,轴浆较均匀,轴索内可见较多的微丝及线粒体等细胞器结构,分布、排列较均匀,结构稍疏松,神经胶质细胞核的常染色质分布较均匀,核周间隙较宽,胞浆中细胞器略减少。说明补肾活血中药对 EIOP 大鼠视神经超微结构的损害有所改善。

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,物美价廉,服用方便。根据前期研究及本研究结果显示,两者可作为临床青光眼视神经保护药物推广应用。

参考文献

- 1 Gupta N, Yücel YH. Glaucoma and the brain [J]. *J Glaucoma*, 2001, 10(5 suppl 1): S28-29.
- 2 Akira S, Neufeld AH. Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure [J]. *Exp Eye Res*, 1999, 69(5): 525-531.
- 3 Marquis RE, Whitson JT. Management of glaucoma: focus on pharmacological therapy [J]. *Drugs Aging*, 2005, 22(1): 1-21.
- 4 杨新光,于敬妮,王百忍.兔慢性高血压球后视神经损害的超微结构改变[J]. *中华眼底病杂志*, 2006, 22(6): 410-411.
- 5 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, 33(6): 390-393.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 李翔,谢钊,郭红建,谢学军,路雪婧,王毅,等.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.
- 9 郭红建.补肾活血对大鼠慢性高血压模型初级视皮质损害的干预及作用机制研究[D]. 2010.
- 10 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.
- 11 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.