

【实验研究】

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[△]

李翔 谢钊 郭红建 谢学军 路雪婧 王毅 王超

作者简介:李翔,女,1964年7月出生,四川西昌人,博士,主任医师、教授,博士研究生导师。四川省中医药学会眼科专业委员会副主任委员。联系电话:13658080415; E-mail: jeannelxiang@126.com

About LI Xiang: Female, born in July, 1964. PhD, director of physician, professor, doctoral tutor. Tel: 13658080415; E-mail: jeannelxiang@126.com

收稿日期:2011-07-25
修回日期:2011-09-22
本文编辑:方红玲

△基金项目:四川省教育厅2010年重点基金项目基金资助(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:谢钊, E-mail: xiezha2003@qq.com

Received date: Jul 25 2011
Accepted date: Sep 22 2011

Foundation item: The Key Projects of Sichuan Provincial Education Office (No: 10ZA096)

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

Responsible author: XIE Zhao, E-mail: xiezha2003@qq.com

BuShenHuoXue can repair the LGN injury in the rat model of chronic EIOP.

[Rec Adv Ophthalmol 2012 32(1): 20-23]

Effects of traditional Chinese medicine of BuShenHuoXue on pathological changes of lateral geniculate in rat model of chronic elevated intraocular pressure

LI Xiang, XIE Zhao, GUO Hong-Jian, XIE Xue-Jun, LU Xue-Jing, WANG Yi, WANG Chao

【Key words】 glaucoma; traditional Chinese medicine of BuShenHuoXue; optic neuro-protection; rat model of chronic elevated intraocular pressure; lateral geniculate nucleus

【Abstract】 Objective To observe the effect of traditional Chinese medicine (TCM) of BuShenHuoXue on the pathological changes of lateral geniculate nucleus (LGN) injury in 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 three episcleral vessels, then randomly divided into 3 groups: control group, model group and treatment group. The effect of TCM drugs of BuShenHuoXue on the EIOP rat model's intraocular pressure (IOP) and pathological changes of LGN were observed. Results Unilaterally cauterizing episcleral vessels increased IOP of the rat model obviously, there was significant difference compared with pre-operation ($P < 0.01$). At the end of the experiment (8 weeks), the level of IOP was 2.5-3.0 times than before modeling; Semi-quantitative pathological analysis showed that the density of neuron cells in the model group was $(51.14 \pm 10.52) \mu\text{m}^{-2}$, cell density of sectional area was $(6.57 \pm 1.59) \mu\text{m}^{-2}$, density of myelinated fiber was $(0.3556 \pm 0.1019) \mu\text{m}^{-2}$, integrated optical density of Nissl body was 31826 ± 3796 , compared with the control group, there were statistical differences ($P < 0.01$ or 0.05). There was statistical difference in integrated optical density of Nissl body between the model group and treatment group 33906 ± 3213 ($P < 0.05$), significant difference in the density of neuron cells between the treatment group $(54.27 \pm 12.67) \mu\text{m}^{-2}$ and control group $(60.95 \pm 13.35) \mu\text{m}^{-2}$ ($P < 0.01$), statistical difference in density of myelinated fiber between the treatment group $(0.5611 \pm 0.1385) \mu\text{m}^{-2}$ and model group ($P < 0.05$). Conclusion TCM of

【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; 外侧膝状体

【摘要】 目的 观察补肾活血中药对大鼠慢性高眼压(elevated intraocular pressure, EIOP)模型外侧膝状体损伤的干预作用,探讨其作用机理。方法 采用烙闭上巩膜静脉法建立大鼠慢性EIOP模型,随机分为3组:空白组、模型组、给药组,观察补肾活血中药对EIOP大鼠眼压、外侧膝状体(lateral geniculate nucleus, LGN)病理形态学变化的影响。结果 本实验采用的烙闭上巩膜静脉的造模方法使大鼠眼压明显升高,与造模前比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。在造模后8周(实验结束)眼压仍为造模前的2.5~3.0倍;LGN病理切片半定量分析表明:模型组神经元细胞密度($51.14 \pm 10.52) \mu\text{m}^{-2}$ 、神经元面积密度($6.57 \pm 1.59) \mu\text{m}^{-2}$ 、有髓纤维密度($0.3556 \pm 0.1019) \mu\text{m}^{-2}$ 、Nissl小体积分光密度 31826 ± 3796 ,与空白组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。模型组Nissl小体积分光密度低于给药组(33906 ± 3213),给药组神经元细胞密度($54.27 \pm 12.70) \mu\text{m}^{-2}$ 与空白组($60.95 \pm 13.35) \mu\text{m}^{-2}$ 比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$),给药组有髓纤维密度($0.5611 \pm 0.1385) \mu\text{m}^{-2}$ 与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 补肾活血中药有助于EIOP大鼠LGN损伤的修复。

[眼科新进展 2012 32(1): 20-23]

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。而视功能的正常维持依赖于视

路中各级神经元在结构和功能上的完整性及协调性。近年来,许多学者提出青光眼是一种中枢神经

退行性疾病^[1],认为青光眼的视功能障碍是从视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)到高级视中枢的广泛区域发生损伤的过程^[2]。因此,对青光眼视中枢损害机制的研究成为新的热点。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(elevated intraocular pressure, EIOP)动物模型,选取杞菊地黄丸和复方丹参片作为干预药物,通过对EIOP大鼠眼压、外侧膝状体(lateral geniculate nucleus, LGN)病理形态学变化的影响等客观指标观察补肾活血中药对慢性EIOP大鼠模型视中枢LGN损害的干预作用,探讨补肾活血中药视功能保护的作用机理,为补肾活血中药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 清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只(购于成都中医药大学动物实验中心),雌雄各半,鼠龄 8~12 周,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。纳入标准:(1)无外眼疾病;(2)双眼瞳孔对光反射正常;(3)无歪颈。

1.2 分组与给药方法

1.2.1 分组 动物购回后适应性喂养 3 d,进行眼压测量,正常眼压区间估计,取平均眼压在 9~18 mmHg(1 kPa=7.5 mmHg)者,以 SPSS 统计软件产生随机数字,分为模型组、给药组、空白组 3 组,每组 10 只,空白组不作处理,模型组和给药组进行单眼(右眼)造模。因为灌胃等原因动物死亡 4 只。

1.2.2 给药方法 将 3 组大鼠连续给药 8 周,方法如下:空白组、模型组每天予 3 mL 生理盐水灌胃;给药组每天灌胃予复方丹参片 0.96 g·kg⁻¹、原生药 3.0 g·kg⁻¹ 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 周称体质量 1 次,调整给药量。

1.3 眼压测量 选用 TONO-PEN 笔式眼压计测量眼压,在每天同一时间进行,连续测量术前 3 d 眼压,取平均值作为正常眼压;术后即刻,术后 1 周、2 周、4 周、6 周、8 周各测 1 次眼压。

1.4 病理组织学观察

1.4.1 取材及固定 取材及固定参考文献[3],于造模 8 周后以颈椎脱臼法处死大鼠,开颅完整剥离脑组织,固定 72 h 后按大鼠中枢神经解剖定位切取 LGN^[4],做 4 μm 连续切片,烘干备用。

1.4.2 甲苯胺兰染色和计数 每组皆测定 6 只大鼠的各 1 张 LGN 切片(每张取 10 个视野)的共 60 个视野的 Nissl 小体含量、神经元细胞剖面密度和神经元个数,当细胞剖面压在边线时均不计入,按照体视学要求,只计数有明显细胞核的细胞剖面数。用 Mias-2000 型图形图像分析仪(成都中医药大学病理室)分析。

1.4.3 电镜下 LGN 超微结构观察 各组随机选取 1 只大鼠,剥离脑组织浸泡于体积分数 3% 戊二醛组织固定液,72 h 后根据图谱^[4]取材 1~2 mm³,体积分数 1% 钨酸后固定,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色。日立 H7650 透射电镜(四川大学华西医学中心病理电镜室提供)下观察。

1.5 统计学方法 本研究数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,组间比较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 慢性 EIOP 大鼠眼压 各组大鼠组间及造模、用药前后眼压比较见表 1。由表 1 可见:造模前各组大鼠眼压比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);造模后,眼压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 模型成功。

表 1 各组大鼠组间及造模、用药前后眼压比较

Table 1 Comparison of IOP before and after modeling in each group ($\bar{x} \pm s$, P/mmHg)

Group	Eyes	Pre-models	Models building	8 weeks after-models
Control	9	10.36 ± 2.47	11.42 ± 3.13	12.04 ± 3.83
Model	9	10.54 ± 3.49	28.14 ± 7.39 [▲]	27.58 ± 6.31 [▲]
Treatment	8	9.52 ± 4.02	31.74 ± 8.32 [▲]	25.64 ± 5.59 [▲]
<i>F</i>		0.253	28.573	22.565
<i>P</i>		0.778	0.000	0.000

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

2.2 补肾活血中药对 EIOP 大鼠 LGN 神经元分布的影响 LGN 神经元计数结果见表 2。由表 2 可见:造模后 LGN 神经元个数密度、神经元剖面密度均明显降低,差异均有显著统计学意义(均为 *P* < 0.01)。而给予补肾活血中药后, LGN 神经元细胞计数有所提高,与空白组比较:神经元细胞剖面密度和平均神经元细胞大小差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05)。

表 2 LGN 神经元计数结果

Table 2 Results of LGN neuron counting ($\bar{x} \pm s$)

Group	Number density of neuron	Neuron cell density of sectional	Mean area of neuron
	cells(neuron · μm ⁻²)	area(neuron · μm ⁻²)	cells(S/μm ²)
Control	60.95 ± 13.35	7.49 ± 1.89	1 249.00 ± 253.84
Model	51.14 ± 10.52 [▲]	6.57 ± 1.59 [▲]	1 304.00 ± 302.37
Treatment	54.27 ± 12.70 [▲]	6.95 ± 1.73	1 320.00 ± 362.63
<i>F</i>	10.042	3.995	0.739
<i>P</i>	0.000	0.020	0.479

Note: Compared with control group, [▲]*P* < 0.01

2.3 补肾活血中药对 EIOP 大鼠 LGN Nissl 小体含量的影响 3 组大鼠 LGN Nissl 小体甲苯胺兰染色结果见图 1-图 3; LGN Nissl 小体含量比较见表 3。由表 3 可见:造模后大鼠 LGN Nissl 小体面积和积分光密度均降低,与空白组比较,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05)。而给予补肾活血中药后,无论是总面积、平均光密度、积分光密度还是平均黑度均有

所提高,但与空白组比较,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。

表3 LGN Nissl 小体含量

Table 3 Content of Nissl body in LGN ($\bar{x} \pm s$)

Group	Total area($S/\mu\text{m}^2$)	Mean optical density	Integrated optical density	Mean black degree
Control	119 255 ± 18 867	399.0 ± 54.2	36 867 ± 4 797	100.0 ± 3.7
Model	98 482 ± 10 384 [▲]	316.0 ± 83.0	31 826 ± 3 796 [▲]	103.0 ± 2.9
Treatment	106 831 ± 10 818	344.0 ± 92.3	33 906 ± 3 213	101.0 ± 3.3
F	0.701	7.829	0.084	2.043
P	0.512	0.005	0.920	0.164

Note: Comperd with control group, [▲] $P < 0.05$

2.4 补肾活血中药对 EIOP 大鼠 LGN 有髓纤维密度的影响 对照组、模型组、给药组 LGN 有髓纤维密度分别为 $(0.694 5 \pm 0.158 5) \mu\text{m}^{-2}$ 、 $(0.355 6 \pm 0.101 9) \mu\text{m}^{-2}$ 、 $(0.561 1 \pm 0.138 5) \mu\text{m}^{-2}$;造模后大鼠 LGN Nissl 有髓纤维密度明显降低,与空白组比较,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。而给予补肾活血中药后,有髓纤维密度有所提高,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($P > 0.05$)。

2.5 补肾活血中药对 EIOP 大鼠 LGN 超微结构的影响 正常大鼠 LGN 细胞核呈圆形或卵圆形,双层核膜清晰可见,核内充满均匀、色浅淡的常染色质,其间有少许靠近核膜、色稍深的异染色质,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(图4)。而 LGN 的有髓纤维和无髓纤维微丝、微管和线粒体等成分清晰可见,有髓纤维髓鞘呈板层结构(图5)。造模后 LGN 细胞核内染色质变成细小颗粒,胞浆空泡化,仅存有少量线粒体高度膨胀、破裂,嵴消失,内质网扩张呈空泡状(图6);而有髓纤维和无髓纤维微丝、微管颗粒化,线粒体肿胀明显,髓鞘间隙变宽、松解(图7)。而给予补肾活血中药组大鼠 LGN 细胞核内染色质聚集,胞浆中细胞器、线粒体肿胀,内质网扩张(图8),有髓纤维和无髓纤维微丝、微管颗粒化,髓鞘间隙变宽、松解等均较模型组轻(图9)。

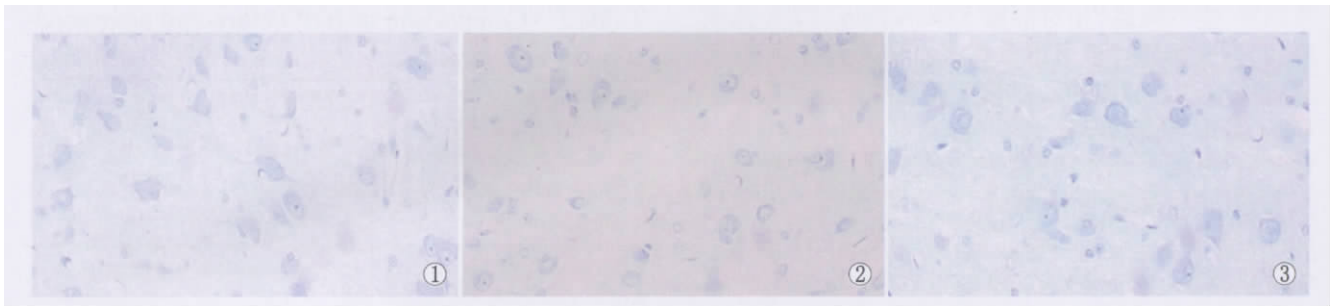


Figure 1 Toluidine blue staining of Nissl body in control group. **Figure 2** Toluidine blue staining of Nissl body in model group. **Figure 3** Toluidine blue staining of Nissl body in treatment group 图1 空白组 Nissl 小体甲苯胺兰染色。图2 模型组 Nissl 小体甲苯胺兰染色。图3 给药组 Nissl 小体甲苯胺兰染色

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。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 RGC 进行性凋亡及视神经纤维的丢失^[5],临床上即使眼压控制到正常范围,视野缺损和 RGC 的凋亡仍在继续,因此视神经的保护很重要。但视觉系统由三级神经元构成,视功能的正常维持依赖于视路中各级神经元在结构和功能上的完整性及协调性;因此许多学者提出青光眼是一种中枢神经退行性疾病。有研究表明^[6], LGN 的人为损伤可以诱导 RGC 发生变性,其机制被认为是由于 RGC 从中枢获得的神经营养因子的减少;另一方面,RGC 进一步损伤必然导致视觉传入冲动的进一步减少,加重 LGN 神经元的废用性萎缩、变性。这种存在于 RGC 与 LGN 神经元损伤之间的恶性循环,可能在青光眼视功能损伤的进展中起重要作用^[7]。所以,LGN 是观察青光眼大鼠中枢损伤的主要部位。

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 和视网膜神经纤维层损害,有助于 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^[8-9],并可上调 RGC 抗凋亡基因 Bcl-2、抑制凋亡基因 Bax^[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 大鼠眼压、LGN 病理学改变,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,慢性 EIOP 大鼠 LGN 神经元数目、有髓神经密度明显减少,代表 LGN 细胞特征结构和功能的 Nissl 小体含量明显降低,给予补肾活血中药后 LGN 神经元数目有所增多,Nissl 小体含量、有髓神经密度有所提高,表明补肾活血中药可能挽救 LGN 细胞的死亡,使残存的 LGN 细胞增多,同时保护残存 LGN 细胞的结构和功能,使其能尽可能发挥

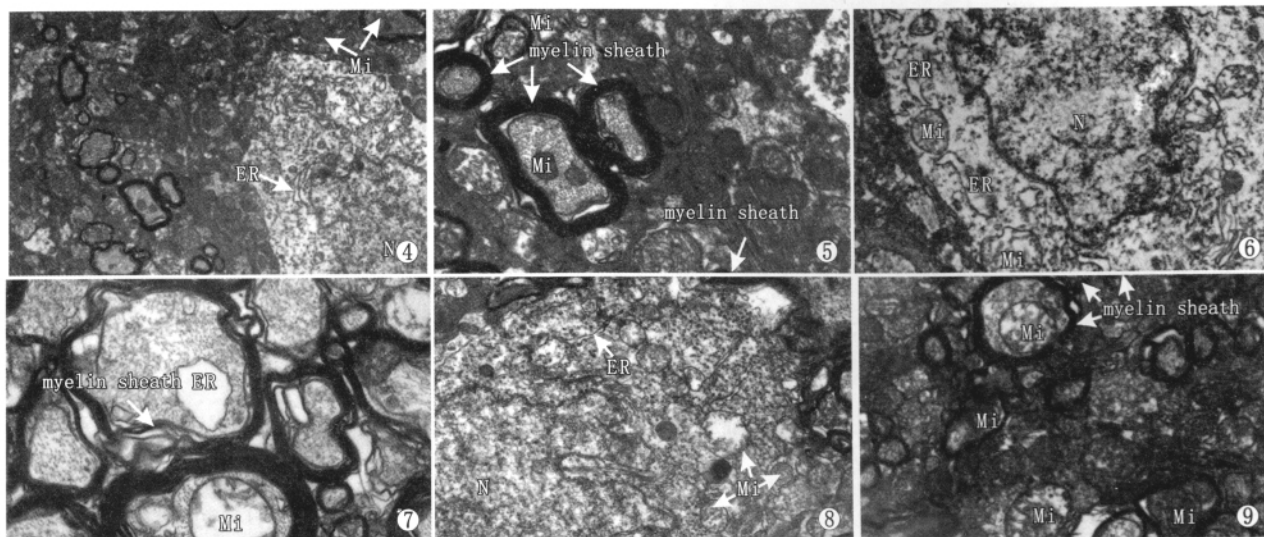


Figure 4 Clear Nuclear membrane uniform chromatin rich organelles and normal mitochondria were observed in control group (TEM, $\times 12\ 000$). **Figure 5** Microtubules mitochondria and endoplasmic reticulum of myelinated fibers and unmyelinated fiber were clearly visible, myelinated fibers showed a lamellar structure of myelin in control group (TEM, $\times 30\ 000$). **Figure 6** Chromatin in nucleus (N) changed to small particles cytoplasm vacuolized mitochondria (Mi) expanded with a high degree, ridge disappeared, endoplasmic reticulum (ER) vacuolized in model group (TEM, $\times 20\ 000$). **Figure 7** Filaments and microtubules of Myelinated fiber changed to particles mitochondria (Mi) of endoplasmic swelled reticulum (ER) vacuolized myelin sheath (myelin sheath) gap widened and released in model group (TEM, $\times 40\ 000$). **Figure 8** Chromatin in nucleus (N) mild aggregated cytosolic organelles had little reduction mitochondria (Mi) mild swelled part of endoplasmic reticulum expanded in treatment group (TEM, $\times 20\ 000$). **Figure 9** Treatment group Myelinated fibers and unmyelinated fiber filaments particles of microtubules mitochondria swelling some myelin sheath gap widened release (TEM, $\times 25\ 000$). **图 4** 空白组透射电镜下细胞核核膜清晰, 染色质均匀, 细胞器丰富, 线粒体内质网形态正常 (TEM, $\times 12\ 000$)。 **图 5** 空白组透射电镜下有髓纤维和无髓纤维微丝、微管和线粒体、内质网等成分清晰可见, 有髓纤维髓鞘呈板层结构 (TEM, $\times 30\ 000$)。 **图 6** 模型组透射电镜下细胞核内染色质变成细小颗粒, 胞浆空泡化, 线粒体高度膨胀、破裂, 嵴消失, 内质网呈空泡状 (TEM, $\times 20\ 000$)。 **图 7** 模型组透射电镜下髓鞘间隙变宽、松解, 有髓纤维微丝、微管颗粒化 (TEM, $\times 40\ 000$)。 **图 8** 给药组透射电镜下细胞核内染色质轻度聚集, 胞浆中细胞器减少不明显, 线粒体轻度肿胀, 部分内质网扩张 (TEM, $\times 20\ 000$)。 **图 9** 给药组透射电镜下有髓纤维和无髓纤维微丝、微管颗粒化, 线粒体肿胀, 髓鞘间隙变宽、松解 (TEM, $\times 25\ 000$)。

生理功能。

电镜下的超微结构观察也发现,慢性EIOP大鼠LGN损伤明显,细胞核内染色质成细小颗粒,胞浆空泡化,线粒体高度膨胀、破裂,内质网扩张呈空泡状;有髓纤维和无髓纤维微丝、微管颗粒化,线粒体肿胀明显,髓鞘间隙变宽、松解。而给予补肾活血中药后,细胞核内染色质聚集、胞浆中细胞器减少、线粒体肿胀、内质网扩张,有髓纤维和无髓纤维微丝、微管颗粒化等程度均减轻,髓鞘间隙变宽、松解明显减轻,说明补肾活血中药能保护LGN细胞的结构和功能。

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。根据前期研究及本实验结果显示,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 Schwartz M. Physiological approaches to neuroprotection boosting of protective autoimmunity [J]. *Surv Ophthalmol* 2001, 45 (13): S256.

2 Gupta N, Yucel YH. Glaucoma and the brain [J]. *J Glaucoma*, 2001, 10(11): S28-29.
3 谢学军, 王毅, 李翔, 杨红, 谢春光, 肖丹. 糖尿病大鼠视觉系统三级神经元的病理学研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2001, 9(6): 348-350.
4 王平宇. 大白鼠中枢神经系统解剖学基础 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 9-10.
5 Marquis RE, Whitson JT. Management of glaucoma: focus on pharmacological therapy [J]. *Drugs Aging* 2005, 22(1): 1-21.
6 Pearson HE, Stoffler DJ, Sonstein WJ. Response of retinal terminals to loss of postsynaptic target neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the adult cat [J]. *J Comp Neurol*, 1992, 315(3): 333-343.
7 Gupta N, Yucel YH. Glaucoma and the brain [J]. *J Glaucoma*, 2001, 10(5): 28-29.
8 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.
9 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, 27(8): 18-21.
10 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.
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(2): 95-97.
12 李翔, 郭建, 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.