

【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
脑源性神经营养因子表达的影响[△]李翔 谢钊 郭红建 谢学军 路雪婧 王毅 王超 杨东梅
王桃

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 Ju-
ly, 1964. Doctor degree, chief physi-
cian professor. Tel: 13658080415; E-
mail: jeannelxiang@126.com

收稿日期:2012-06-20

修回日期:2012-07-08

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:谢钊, E-mail: xiezha-
o2003@qq.com

Received date: Jun 20 2012

Accepted date: Jul 8 2012

Foundation item: 2010 Key Projects of
Sichuan Provincial Education Depart-
ment(No: 10ZA096)

From the Department of Ophthalmolo-
gy, the Affiliated Hospital of Chengdu
University of Traditional Chinese Medi-
cine, Chengdu 610072, Sichuan Prov-
ince, China

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

Effects of traditional Chinese medicine of Bushenhuoxue on expression of brain-de- rived neurotrophin factor in lateral genicu- late in rat model of chronic elevated in- traocular pressure

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

【Key words】 glaucoma; Bushenhuoxue; optic neuroprotection; rat model of chronic el-
evated intraocular pressure; lateral geniculate; brain-derived neurotrophin factor

【Abstract】 Objective To observe the effect of traditional Chinese medicine (TCM)
of Bushenhuoxue on the expression of brain-derived neurotrophin factor (BDNF) in
lateral geniculate (LGN) in the rat model of chronic elevated intraocular pressure
(EIOP) and preliminarily explore its mechanism. Methods By unilaterally cauterizing
3 episcleral vessels, the rat model of chronic EIOP was established. Thirty rats were ran-
domly divided into normal group, model group and treatment group, 10 cases in each
group. After giving TCM drugs of Bushenhuoxue and normal saline for 8 weeks, the rats
were sacrificed and the brains were taken out. The effect of Bushenhuoxue on the ex-
pression of BDNF in LGN and intraocular pressure (IOP) were observed. Results Uni-
laterally cauterizing episcleral vessels increased IOP of the rat model obviously ($P < 0.01$).
At 8 weeks after modeling, the level of IOP was 2-3 times than before modeling.
IOP at postoperative immediate 8 weeks in model group were (28.140 ± 7.391) mm-
Hg ($1 \text{ kPa} = 7.5 \text{ mmHg}$), (27.580 ± 6.312) mmHg, respectively, which in treatment
group were (31.740 ± 8.315) mmHg, (25.640 ± 5.589) mmHg, respectively; Com-
pared with control group, there were significant differences (all $P < 0.01$). Semi-quant-
itative pathological analysis showed that the total area, mean optical density, integrated
optical density of BDNF expression in model group were ($168\ 614 \pm 10\ 724$) μm^2 , 3066 ± 708 and $44\ 443 \pm 3721$, respectively,
which in control group were ($255\ 985 \pm 31\ 225$) μm^2 , 6070 ± 609 and $61\ 174 \pm 6226$, respectively, there were significant differ-
ences between model group and control group (all $P < 0.01$). The total area and integrated optical density of BDNF expres-
sion in treatment group were ($211\ 739 \pm 28\ 336$) μm^2 and $55\ 793 \pm 7608$, there were significant differences compared with
model group (all $P < 0.01$). There was significant difference in total area of BDNF expression compared with control group
($P < 0.01$). Conclusion TCM of Bushenhuoxue can improve the expression of BDNF in LGN in EIOP rat model.

[Rec Adv Ophthalmol 2012, 32(10): 918-921]

【关键词】 青光眼; 补肾活血法; 视神经保护; 大鼠慢性高眼压模型; 外侧膝状体; 脑源性神经营养因子

【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(lateral geniculate nu-
cleus, LGN)脑源性神经营养因子(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SD大鼠3支上巩膜静脉,建立大鼠慢性EIOP模型。将30只(30眼)大鼠随机分为空白组、模型组、给药组,每组
各10只。连续灌胃8周,并于8周末处死大鼠,观察补肾活血法对EIOP大鼠眼压及BDNF表达的影响。结果 造模后大鼠眼
压均较造模前明显升高(均为 $P < 0.01$)。在造模后8周眼压仍为造模前的2~3倍。造模后,模型组造模后即刻、造模后给药组
8周眼压分别为(28.140 ± 7.391) mmHg ($1 \text{ kPa} = 7.5 \text{ mmHg}$)、(27.580 ± 6.312) mmHg,给药组分别为(31.740 ± 8.315) mmHg、(25.640 ± 5.589) mmHg,与空白组相比,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。LGN病理切片半定量分析
表明:模型组BDNF表达总面积($168\ 614 \pm 10\ 724$) μm^2 、平均光密度(3066 ± 708)、积分光密度($44\ 443 \pm 3721$),与空白组的总

面积($255\ 985 \pm 31\ 225$) μm^2 、平均光密度(6070 ± 609)、积分光密度($61\ 174 \pm 6226$)比较差异均有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$)。给药组的BDNF表达总面积($211\ 739 \pm 28\ 336$) μm^2 、积分光密度($55\ 793 \pm 7608$)与模型组比较差异均有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$)；给药组BDNF表达总面积与空白组比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。结论 补肾活血中药有助于增强EIOF大鼠LGN的BDNF表达。

[眼科新进展 2012, 32(10):918-921]

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,有学者提出青光眼是一种中枢神经退行变性疾病^[1],认为青光眼的视功能障碍是从视网膜神经节细胞(retinal ganglial cells, RGC)到高级视中枢的广泛区域发生损伤的过程^[2]。因此,对青光眼视中枢的作用机制探讨以及对视功能保护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且持续时间较长的慢性高眼压动物模型^[3],选取杞菊地黄丸和复方丹参片作为干预药物,通过观察补肾活血中药对高眼压(elevated intraocular pressure, EIOF)大鼠眼压及外侧膝状体(lateral geniculate nucleus, LGV)脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophin factor, BDNF)表达的影响,探讨补肾活血中药视功能保护作用的机理,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只(30 眼),雌雄各半,8~12 周龄,体重 160~200 g。饲养室温 20~25 °C,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)无斜颈。SD 大鼠购回后,适应性喂养 3 d,进行眼压测量,取眼压在 9~18 mmHg (1 kPa = 7.5 mmHg)者,以 SPSS 统计软件产生随机数字,分为 3 组,即模型组、给药组、空白组,每组各 10 只。

1.1.2 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),购于博士德生物工程有限公司。复合固定液,由成都中医药大学附属医院提供。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 模型组和给药组进行单眼(右眼)造模。造模方法如下:大鼠称体质量、麻醉及固定后,用 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠按 $1.5\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 行左下腹腔注射全身麻醉,同时术眼予 $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸丙美卡因滴眼液角膜表面麻醉,于 10 点至 2 点钟位距角膜缘 1~2 mm 剪开上方球结膜,分离筋膜,暴露角膜缘后 3~4 mm 近赤道部 10 点、12 点和 1 点处 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 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯霉素眼液滴眼,每天 2 次,连续 6 d。对照组(空白组)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,左眼不做处理。因灌胃原因动物死亡 4 只(空白组、模型组各 1 只,给药组 2 只)。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 $0.96\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 复方丹参片、原生药 $3.0\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 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 3 组体质量 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,开颅完整剥离脑组织,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)中,同时将该固定液注入大脑纵裂中部。固定 72 h 后,按大鼠中枢神经解剖定位,根据邻近核团形状判断,切取 LGN,逐节脱水、透明、石蜡包埋,做 $4\text{ }\mu\text{m}$ 连续切片,烘干备用。

1.3 测定指标

1.3.1 眼压测量 选用 TONO-PEN 笔式眼压计测量眼压,在每天的同一时间进行,连续测量造模前 3 d 眼压,取平均值作为正常眼压;造模后即刻、造模后 3 d、造模后 7 d 各测 1 次眼压,以后每 2 周测 1 次眼压,共 8 周。

1.3.2 BDNF 免疫组织化学检测 (1)染色步骤: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 °C 孵育 1~2 h;PBS 冲洗,滴加二抗,37 °C 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。(2)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,组间比较不满足方差齐时采用近似检验 Tamhane's T2 法,满足方差齐时用 LSD 法、Dunnnett 法,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 EIOF 大鼠 IOP 各组大鼠组间及造模、

用药前后眼压比较见表1、图1。由图1可见:模型组和给药组大鼠在造模后用药前眼压明显升高,约30 mmHg左右,随后出现一定幅度的波动,有小幅度的下降,在用药后1周比较明显。模型组造模后眼压升高,为26~28 mmHg,随后出现一定幅度的波动,整体有逐渐下降趋势;给药组眼压实验期间有小幅波动,为25~32 mmHg,整体有逐渐下降趋势;空白组眼压明显低于其余各组,有轻微波动,眼压波动在9~15 mmHg之间。

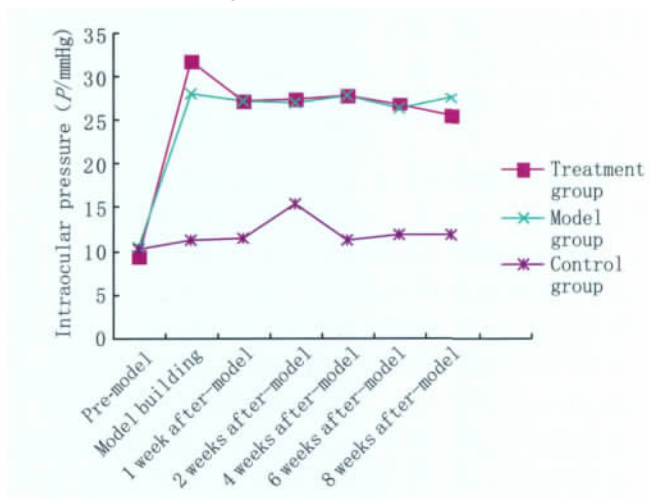


Figure 1 Graph of intraocular pressure of each group 各组大鼠眼压曲线图

表1 各组大鼠组间及造模、用药前后眼压比较

Table 1 Comparison of intraocular pressure between each group before and after modeling ($\bar{x} \pm s$ P/mmHg)

Group	n	Pre-model	Model building	8 weeks after-model
Control	9	10.360 0 ± 2.466 1	11.420 0 ± 3.131 5	12.040 0 ± 3.829 3
Model	9	10.540 0 ± 3.494 6	28.140 0 ± 7.391 9 [▲]	27.580 0 ± 6.312 9 [▲]
Treatment	8	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-model, [▲]P<0.01; Compared with control group, [▲]P<0.01

由表1可见:造模前各组大鼠眼压比较差异均无统计学意义(均为P>0.05);造模后模型组、给药组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),说明慢性EIO大鼠造模成功。造模后8周,模型组、给药组与空白组相比,差异均有统计学意义(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),提示补肾活血中药有降低EIO大鼠眼压的作用。

2.2 补肾活血中药对EIO大鼠LGN BDNF表达的影响 各组大鼠LGN BDNF的表达比较见表2、图2~图5。模型组大鼠LGN BDNF表达总面积、平均光密度、积分光密度与空白组比较,差异均有统计学意义(均为P<0.01),平均灰度值与空白组比较差异无统计学意义(P>0.05)。而给药组BDNF表达总面积、积分光密度均显著增加:总面积与空白组、模

型组相比较差异均有统计学意义(均为P<0.01),积分光密度与模型组比较差异有统计学意义(P<0.01);而平均光密度、平均灰度值与空白组以及模型组比较差异均无统计学意义(均为P>0.05)。提示慢性EIO可引起大鼠LGN的BDNF表达减少,补肾活血中药可促使BDNF增多。

表2 各组大鼠LGN BDNF表达比较

Table 2 Comparison of BDNF expression in LGN between each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Total area(S/ μm^2)	Mean optical density	Integrated optical density	Mean gray degree
Control	255 985 ± 31 225	6070 ± 609	61 174 ± 6226	83.000 0 ± 9.076 0
Model	168 614 ± 10 724 [▲]	3066 ± 708 [▲]	44 443 ± 3721 [▲]	89.000 0 ± 5.813 1
Treatment	211 739 ± 28 336 [▲]	4279 ± 1460	55 793 ± 7608 [△]	90.000 0 ± 1.823 8
F	18.147	13.667	11.882	2.200
P	0.000	0.000	0.001	0.145

Note: Compared with control group, [▲]P<0.01; Compared with model group, [△]P<0.01

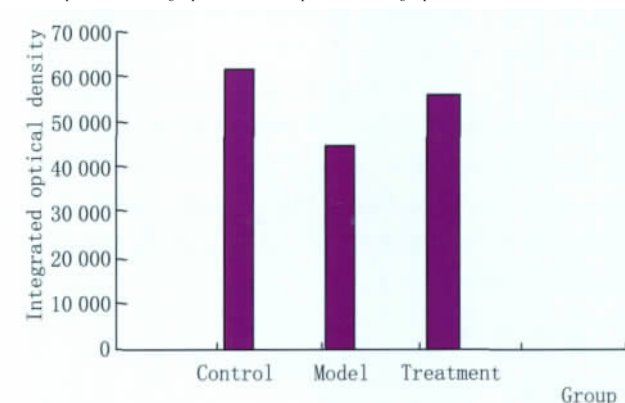


Figure 2 Integrated optical density of BDNF expression in LGN of each group 各组大鼠LGN的BDNF积分光密度表达情况

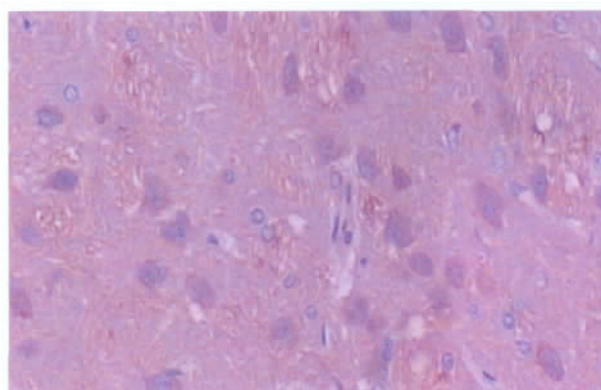


Figure 3 Staining of BDNF in control group(x200) 空白组LGN BDNF染色图(x200)

3 讨论

青光眼是一种多因素疾病,其发病机制尚未完全清楚。但是不管发病机制如何,最终导致青光眼视功能损害的病理基础是RGC的进行性凋亡及视神经纤维的丢失^[1],临床中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,

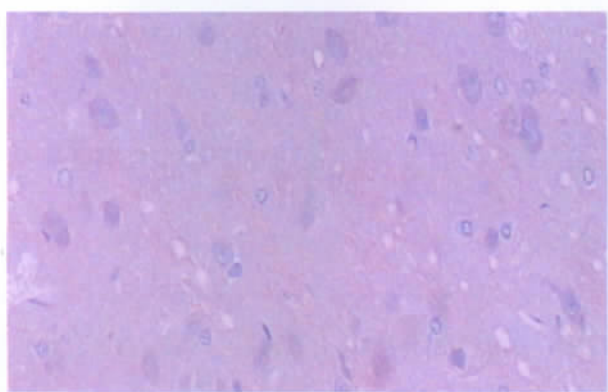


Figure 4 Staining of BDNF in model group(×200) 模型组 LGN BDNF 染色图(×200)

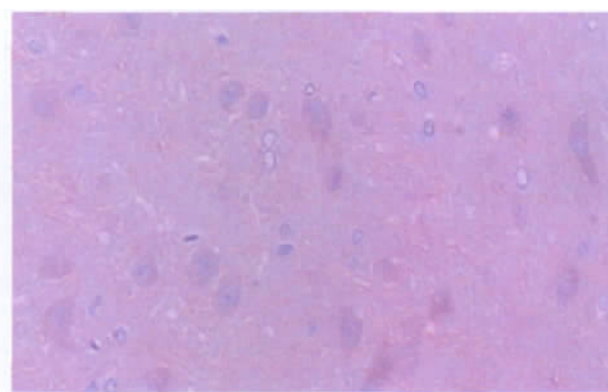


Figure 5 Staining of BDNF in treatment group(×200) 给药组 LGN BDNF 染色图(×200)

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变性疾病。有研究表明^[5] 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。RGC 的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了重要作用^[2]。而目前对于 RGC 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^[6]。当视神经损伤后,RGC 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 LGN 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 RGC 层变薄,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 P_1 波反应密度、2 环及 3 环 N_1 波反应密度、总波 P_1 波峰潜时、3 环及 4 环 N_1 波峰潜时的恢复^[7-8],并可上调 RGC 抗凋亡基因 bcl-2,抑制凋亡促进基因 Bax^[9],有助于 EIOP 大鼠 LGN 损伤的修复^[10]。临床观察也发现^[11-12],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。

本研究通过观察慢性 EIOP 大鼠 LGN 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 EIOP 可引起大鼠 LGN 的 BDNF 表达减少,使 LGN 的存活能力降低,死亡增加,补肾活血中药可促使 BDNF 表达增多,使 LGN 存活能力提高,减少 LGN 细胞的死亡。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。

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, Yücel YH. Glaucoma and the brain [J]. *J Glaucoma*, 2001 10(5 suppl 1): S28-29.
- 3 Sawada A, Neufeld AH. Confirmation of the rat model of chronic moderately elevated intraocular pressure [J]. *Exp Eye Res*, 1999 69(5): 525-531.
- 4 Marquis RE, Whitson JT. Management of glaucoma: focus on pharmacological therapy [J]. *Drugs Aging* 2005 22(1): 1-21.
- 5 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.
- 6 Osborne NN, Wood JP, Chidlow G, Bae JH, Melena J, Nash MS. Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know [J]. *Br J Ophthalmol*, 1999 83(8): 980-986.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 李翔,曹水清,毛欣,黄江丽. 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.
- 10 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,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.