

【文章编号】 0258 - 5898 (2006) 11 - 1267 - 04

· 基础研究 ·

## 灯盏细辛对兔高眼压视网膜神经节细胞及视神经损伤的保护作用

钟一声<sup>1</sup>, 项敏泓<sup>2</sup>, 叶纹<sup>3</sup>( <sup>1</sup>上海交通大学医学院瑞金医院眼科, 上海 200025; <sup>2</sup>上海中医药大学普陀医院眼科; <sup>3</sup>复旦大学华山医院眼科)

**【摘要】**目的 观察灯盏细辛对慢性高眼压兔视网膜神经节细胞(RGCs)及视神经损伤的保护作用。方法 20只兔制成慢性高眼压模型后随机分成灯盏细辛治疗组(高眼压加灯盏细辛治疗亚组和正常眼压加灯盏细辛治疗亚组)和未治疗组(单纯高眼压亚组和单纯正常眼压亚组),治疗组于高眼压持续7 d后行灯盏细辛灌胃。60 d后取眼球和视神经标本做光镜及电镜检查,观察RGCs密度、视网膜神经纤维层(RNFL)厚度和视神经轴突,并采用计算机图像分析系统定量分析。电镜观察RGCs和视神经轴突超微结构改变。结果 高眼压两亚组与正常眼压两亚组比较,RNFL厚度、RGCs密度减小,轴突数量减少( $P < 0.05$ );高眼压加灯盏细辛治疗亚组与单纯高眼压亚组比较,RNFL厚度和RGCs密度大,轴突数量多。高眼压两亚组胞浆内细胞器数量减少,线粒体空泡变性,轴突排列紊乱,髓鞘变性,但高眼压加灯盏细辛治疗亚组仍有散在细胞器,髓鞘相对不规则,轴突内微管和微丝肿胀,但不消失。结论 灯盏细辛对高眼压后RGCs和视神经变性有一定的保护作用。

**【关键词】**灯盏细辛; 慢性高眼压; 视网膜神经纤维层; 视网膜神经节细胞; 视神经; 保护作用; 兔

【中图分类号】R775

【文献标识码】A

## Protective Effect of Erigeron Breviscapus( Vant ) Hand-Mazz on Retinal Ganglion Cells and Optic Nerve in Rabbits with Elevated Intraocular Pressure

ZHONG Y i-sheng<sup>1</sup>, XIANG M in-hong<sup>2</sup>, YE W en<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Huashan Hospital, Fudan University)

**Abstract:** Objective To observe the protective effect of Erigeron Breviscapus(Vant) Hand-Mazz(EBHM) on retinal ganglion cells(RGCs) and optic nerve in rabbits with elevated intraocular pressure(DP). Methods Twenty rabbits with chronic elevated DP were divided into two groups randomly: EBHM treated group (the ocular hypertension with EBHM treated subgroup and the normal DP with EBHM treated subgroup) and untreated group (the simple ocular hypertension subgroup and the simple normal DP subgroup). EBHM was irrigated into the stomachs to the treated group after DP elevated continuously for 7 d. For light and electron microscopy studies, the rabbits' eyes were made into eyeball samples and optic nerve samples after 60 d. The density of RGCs, thickness of retinal nerve fiber layer(RNFL), and optic nerve axons were observed and quantitated by computer image analysis system. The ultra-microstructure changes of RGCs and optic nerve axons were observed by electron microscope. Results

The RNFL thickness, RGCs density and number of axons of the two ocular hypertension subgroups were decreased, compared with those of the two normal DP subgroups( $P < 0.05$ ). But the RNFL thickness, RGCs density and number of axons of the ocular hypertension with EBHM treated subgroup were more than those of the simple ocular hypertension subgroup. The number of the organelles in RGCs plasm was decreased, mitochondrion was vacuolated and optic nerve axon arrangement was disordered. Myelin sheath was degenerated in the two ocular hypertension subgroups. But there were still some dispersive organelles in the RGCs plasm, and the myelin sheath was relatively irregular, while microtubule and microfilament were swelling but not disappeared in the ocular hypertension with EBHM

**【作者简介】**钟一声(1968-),男,湖北崇阳人,主任医师,博士,博士生导师

treated subgroup. Conclusion EBHM may have partial protective effect in preventing RGCs and optic nerve axons from degeneration.

**Key words:** Erigeron Breviscapus(Vant) Hand-Mazz; chronic elevated intraocular pressure; retinal nerve fiber layer; retinal ganglion cells; optic nerve; protective effect; rabbit

青光眼是一患病率较高的致盲性眼病,目前治疗方式主要是降低眼压,以期减缓视神经损伤的进展。然而,临床上有一部分患者眼压正常或眼压已降至正常,但仍不能阻止其视神经进行性损伤<sup>[1]</sup>,因而,有必要寻求保护视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的有效药物。灯盏细辛(Erigeron Breviscapus(Vant) Hand-Mazz, EBHM)对眼压已控制的原发性晚期青光眼的视功能的保护作用已被临床证实<sup>[2-3]</sup>;实验<sup>[4-5]</sup>也证实它具有提高鼠急性高眼压下 RGCs 细胞色素氧化酶及恢复轴浆运输的作用。但这些实验多采用急性高眼压模型,而临床上青光患者的病程多呈缓慢进行性发展,因此,有必要研究 EBHM 对慢性高眼压下视网膜及视神经的保护作用。

## 材料与方 法

**动物和药物** 清洁级新西兰白兔 20 只,体质量 2.5~3 kg,3 月龄,雌雄不拘,由上海宝牧实验动物养殖场提供,生产许可证号码:SCXK(沪)2004-0007,使用许可证号码:SYXK(沪)2003-0026。实验前检查双眼眼前节、眼底及眼压均正常。EBHM 中药粉剂由湖南湘雅制药有限公司提供。

**高眼压模型制作** 随机选择动物的右眼为模型眼,左眼为对照眼。固定白兔,5 g/L 地卡因滴眼 2~3 次,用 Schiotz 眼压计测量基础眼压并记录。模型眼于角膜缘前房穿刺,抽取房水 0.1~0.2 mL,换针管注入等量 40 g/L 的甲基纤维素。对照眼除用生理盐水代替甲基纤维素外,其余步骤相同。30 min 后测眼压,使模型眼眼压 30 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),若眼压 < 30 mmHg,则补充注入上述甲基纤维素。每天观察兔双眼情况,每周测量眼压 3 次。若模型眼眼压 < 30 mmHg,则用上述方法调整。

**动物分组** 20 只动物随机分为 EBHM 治疗组 ( $n=10$ ) 和未治疗组 ( $n=10$ )。治疗组于高眼压持续 7 d 后行 EBHM 悬浊液灌胃,剂量为 200 mg/kg,每天 1 次,连续 60 d。模型眼为高眼压加 EBHM 治疗亚组,对照眼为正常眼压加 EBHM 治疗亚组。未治疗组整个实验过程不予 EBHM 灌胃治疗,模型眼为单

纯高眼压亚组,对照眼为单纯正常眼压亚组,实验期与治疗组相同。

**取材及标本制作** 所有实验动物于观察期满后处死,立即完整摘除眼球,并在 6 点钟方位角膜缘缝线标记,球后 1 mm 处切断视神经,分为眼球及球后 1 mm 的视神经标本。随机选择两组的各 1 只兔双眼球和视神经,用戊二醛固定,制成电镜标本。余兔眼球标本固定于中性甲醛溶液中,常规乙醇梯度脱水,平行于视神经纵行剖开眼球,二甲苯透明、浸蜡、包埋。平行于眼球剖面通过视神经做 5  $\mu$ m 连续切片 6~9 张,常规 HE 染色。视神经按光镜方法制作标本,行视神经横断面切片,3  $\mu$ m 连续切片 3 张,甲苯胺蓝染色。

**阅片与图像分析** 眼球标本选择在视乳头旁 3 mm 部位,随机选择每个切片中的 3 个视野,用 KS-400 图像分析系统进行分析。HE 染色片测量视网膜视神经纤维层(retinal nerve fiber layer, RNFL)厚度(内界膜至节细胞层内侧)和 RGCs 密度(1 mm<sup>2</sup> 视网膜中 RGCs 个数)。将油镜下的甲苯胺蓝视神经切片图像输入计算机,根据轴突区域与结缔组织区域的色差不同,对轴突进行识别,每个切片取 3 个视野,计数视野面积中不同大小轴突数目。H-500 透射电镜观察视网膜和视神经轴突超微结构改变。

**统计学处理** 采用 SAS 6.04 软件进行方差分析,分别采用 Duncan 及 Dunnett 检验进行均数间两两比较。

## 结 果

**大体观察** 右眼注射 40 g/L 甲基纤维素后,立即出现睫状充血,角膜水肿,瞳孔散大,房水混浊,眼球变硬等高眼压体征。实验过程中,模型眼眼压始终维持在 30.39~42.12 mmHg 之间,平均 (35.28  $\pm$  3.89) mmHg。

### 组织学观察

1. RNFL 厚度和 RGCs 密度:单纯正常眼压亚组及正常眼压加 EBHM 治疗亚组视网膜各层组织结构清晰,RGCs 密集排列,细胞体积较大,细胞核边缘清

楚,呈圆形或略呈卵圆形, RNFL层均匀,未变薄;两组间 RNFL厚度和 RGCs密度相当 ( $P > 0.05$ )。单纯高眼压亚组和高眼压加 EBHM 治疗亚组,视网膜各层结构仍可见, RGCs多数崩解消失,细胞核固缩;其 RNFL厚度和 RGCs密度较正常眼压两亚组显著减少 ( $P < 0.05$ )。但高眼压加 EBHM 治疗亚组与单纯高眼压亚组比较, RNFL厚度和 RGCs密度大,有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 各亚组实验 60 d后 RNFL厚度及 RGCs密度比较 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Tab 1 Comparison of RNFL thickness and RGCs density of each subgroup after 60 d ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Subgroup	RNFL thickness ( $\mu\text{m}$ )	RGCs density (/mm <sup>2</sup> )
Ocular hypertension with EBHM treated	5.02 $\pm$ 0.95	35.97 $\pm$ 8.94
Normal intraocular pressure with EBHM treated	6.41 $\pm$ 1.07*	46.65 $\pm$ 7.14*
Simple ocular hypertension	3.42 $\pm$ 0.40*	23.22 $\pm$ 6.50*
Simple normal intraocular pressure	6.11 $\pm$ 2.09*	46.22 $\pm$ 7.75*

\*  $P < 0.05$  vs the ocular hypertension with EBHM treated subgroup

2 视神经轴突:单纯正常眼压亚组及正常眼压加 EBHM 治疗亚组轴突分布均匀,视神经轴突外包以髓鞘,染成深蓝色,大小不等,但完整,两组间轴突数量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。单纯高眼压亚组和高眼压加 EBHM 治疗亚组轴突数量较正常眼压两亚组明显减少 ( $P < 0.05$ )。其中单纯高眼压亚组可见散在轴突萎缩变性灶,结缔组织瘢痕增多,轴突数量明显减少;高眼压加 EBHM 治疗亚组视神经也存在变性灶,但轴突数量较单纯高眼压亚组多,但其差异无显著性 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。

表 2 各亚组实验 60 d后轴突数量比较 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Tab 2 Comparison of number of axons of each subgroup after 60 d ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Subgroup	Number of axons
Ocular hypertension with EBHM treated	409.56 $\pm$ 109.79
Normal intraocular pressure with EBHM treated	500.22 $\pm$ 46.91*
Simple ocular hypertension	370.44 $\pm$ 41.02
Simple normal intraocular pressure	493.22 $\pm$ 47.93*

\*  $P < 0.05$  vs the ocular hypertension with EBHM treated subgroup; visual field area: 15 057.8  $\mu\text{m}^2$

## 电镜观察

1. RGCs:单纯正常眼压亚组胞浆内散在大量细胞器,以线粒体和核糖体为主,散在粗面内质网,线粒体嵴完好。正常眼压加 EBHM 治疗亚组胞浆内细胞器丰富,核糖体、粗面内质网丰富,线粒体完好。

单纯高眼压亚组核周细胞器数量减少,胞浆水肿致电子密度降低,细胞界限不清晰,线粒体肿胀、空泡变性,线粒体膜崩解,粗面内质网和核糖体消失。高眼压加 EBHM 治疗亚组胞浆内细胞器数量略为减少,散在线粒体、粗面内质网和核糖体,部分线粒体肿胀、空泡变性,部分线粒体嵴完好 (图 1)。

2 轴突:单纯正常眼压亚组轴突结构完整,微管、微丝和线粒体均可见。正常眼压加 EBHM 治疗亚组轴突结构大小规则,排列整齐,呈较高的电子密度,轴突内微管和微丝完整。单纯高眼压亚组轴突结构排列紊乱,髓鞘变性普遍存在,多数髓鞘溶解、疏松,部分髓鞘崩解,结构消失;微管和微丝结构消失,线粒体肿胀、空泡变性。高眼压加 EBHM 治疗亚组髓鞘相对不规整,部分髓鞘变薄、疏松、分离;轴突内微管和微丝肿胀,但不消失,部分线粒体空泡变性 (图 2)。

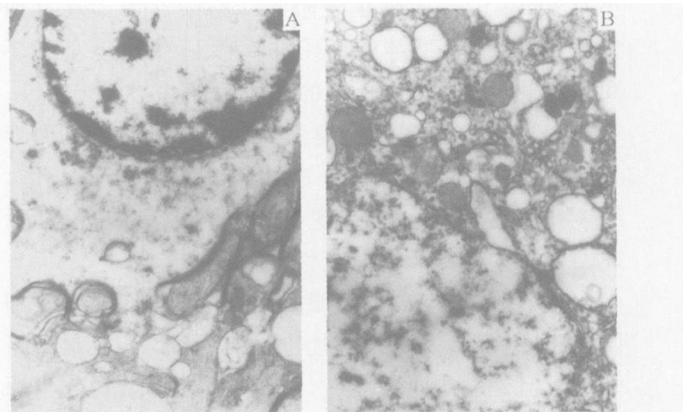


图 1 高眼压亚组的 RGCs TM  $\times 14\ 400$

Fig 1 RGCs of ocular hypertension subgroups TM  $\times 14\ 400$

A: simple ocular hypertension subgroup; B: ocular hypertension with EBHM treated subgroup

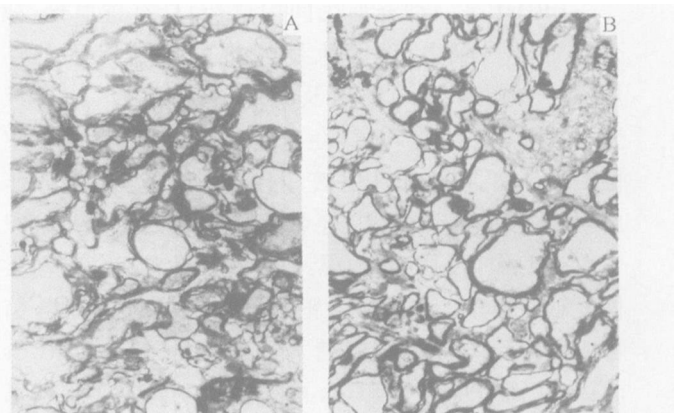


图 2 高眼压亚组的视神经 TM  $\times 5\ 400$

Fig 2 Optic nerve of ocular hypertension subgroups TM  $\times 5\ 400$

A: simple ocular hypertension subgroup; B: ocular hypertension with EBHM treated subgroup

## 讨 论

早在 1870 年,人们就开始试用不同的方法诱导产生青光眼,前房注射甲基纤维素是建立慢性高血压模型简单而有效的方法之一<sup>[6-7]</sup>。在我们的实验中发现,40 g/L 甲基纤维素相对黏稠,前房注入后立即可以看到角膜水肿,前房混浊,轻度睫状充血,眼球变硬,半小时后测眼压均 30 mmHg。随后每周测眼压 3 次,发现每注射 1 次其高眼压水平可维持 5~7 d。因此,40 g/L 甲基纤维素对于建立慢性高血压模型是有效的。

青光眼视神经损伤的确切机制尚不十分清楚,但其最终结局是 RGCs 凋亡或死亡<sup>[8]</sup>。Zhu<sup>[6]</sup>和 Manni 等<sup>[7]</sup>在前房注入 20 g/L 甲基纤维素建立高血压模型的实验中发现,高眼压导致 RGCs 密度显著减小及 RGCs 的逆向轴浆流阻滞。骆荣江等<sup>[9]</sup>在其研究中发现,视网膜各层组织在高眼压作用下呈现不同程度的损伤,最早受累的是 RGCs,其次是 RNFL。本研究建立慢性高血压模型 60 d,发现高眼压两亚组 RNFL 萎缩变薄,RGCs 多数崩解消失,分布稀疏,线粒体肿胀、空泡变性,视神经轴突数目减少,并出现轴突排列紊乱和髓鞘变性。

一般认为,一旦青光眼出现视盘的严重损伤,即使眼压被控制,恢复视功能亦非常困难,甚至是不可能的。但是一些研究<sup>[10-11]</sup>认为,青光眼损伤分为原发损伤和继发变性,那些逃避了原发损伤的正常神经元,因为临近已发生损伤的神经元产生的变性损伤微环境,而导致继发变性。因此,对这些 RGCs 及其轴突的保护和再生治疗已越来越受到重视。

EBHM 是一种云南民间中草药,具有抗血栓,减少外周血管阻力,改善大脑及抗血小板凝集的作用<sup>[12]</sup>。吡喃酮葡萄糖甙及新灯盏花素为其主要成分,且无直接促进 RGCs 生长的作用<sup>[13-14]</sup>。动物实验<sup>[5,15]</sup>证实,EBHM 注射液具有改善鼠实验性高血压后视神经轴浆运输及减轻急性高血压后 RGCs 组织学改变的作用,其可能使某些濒临死亡的 RGCs 轴索恢复轴浆运输,使从脑内靶细胞传出的神经营养信号或靶组织分泌的神经营养因子能顺利到达 RGCs 胞体,从而避免部分 RGCs 的死亡。我们的实验结果表明,高眼压加 EBHM 治疗亚组的 RNFL 厚度和 RGCs 密度显著高于单纯高血压亚组 ( $P < 0.05$ )。在电镜检查中也发现,高眼压加 EBHM 治疗亚组 RGCs 胞浆内细胞器数量略为减少,但仍存在线粒体、粗面

内质网和核糖体。高眼压加 EBHM 治疗亚组轴突数目较单纯高血压亚组多,但两者差异没有显著性 ( $P > 0.05$ );可能是切片太厚,影响图像分析仪下轴突的观测。电镜检查证实,高眼压加 EBHM 治疗亚组轴突相对不规整,部分髓鞘变薄、疏松、分离,但未见髓鞘崩解及微管和微丝结构消失。

综上,EBHM 对高血压后 RGCs 和视神经均有一定的保护作用,其可能与 EBHM 改善视神经的轴浆流及改善视网膜、视神经微循环有关,其确切机制尚待深入探讨。

## 【参考文献】

- [1] Monrison JC, Nylander KB, Lauer AK, et al. Glaucoma drops control intraocular pressure and protect optic nerves in a rat model of glaucoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(3): 526-531.
- [2] 蒋幼芹, 吴振中, 莫杏君, 等. 眼压已控制的晚期青光眼治疗的探讨[J]. 眼科研究, 1991, 9(4): 229-232.
- [3] 贾莉君, 蒋幼芹, 吴振中. 青光康片对眼压已控制的原发性晚期青光眼临床疗效观察[J]. 实用眼科杂志, 1994, 12(5): 269-273.
- [4] 贾莉君, 刘忠浩, 罗学港, 等. 青光康注射液对急性实验性高血压大鼠视网膜神经节细胞代谢的作用[J]. 中华眼科杂志, 1995, 31(2): 129-132.
- [5] 朱益华, 蒋幼芹, 刘忠浩, 等. EBHM 注射液对鼠实验性高血压视神经轴浆运输的影响[J]. 中华眼科杂志, 2000, 36(4): 289-294.
- [6] Zhu MD, Cai FY. Development of experimental chronic intraocular hypertension in the rabbit[J]. Aust N Z J Ophthalmol, 1992, 20(3): 225-234.
- [7] Manni G, Lambiasi A, Centofanti M, et al. Histopathological evaluation of retinal damage during intraocular hypertension in rabbit: involvement of ganglion cells and nerve fiber layer[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1996, 234(Suppl): S209-S213.
- [8] Nickells RW. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe[J]. J Glaucoma, 1996, 5(5): 345-356.
- [9] 骆荣江, 葛坚, 林建贤. 兔视网膜各组织对高血压不同易损性的研究[J]. 中华眼科杂志, 2001, 37(4): 302-304.
- [10] Yoles E, Schwartz M. Potential neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy[J]. Surv Ophthalmol, 1998, 42(4): 367-372.
- [11] Schwartz M, Belkin M, Yoles E, et al. Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy: neuroprotection and neuroregeneration[J]. J Glaucoma, 1996, 5(6): 427-432.
- [12] 周曾同. EBHM 研究概况[J]. 临床口腔医学杂志, 2001, 17(3): 238-239.
- [13] 钟一声, 蒋幼芹. 吡喃酮葡萄糖甙对培养大鼠视网膜神经细胞的影响[J]. 眼科新进展, 1999, 19(1): 5-8.
- [14] 叶长华, 蒋幼芹, 江冰. EBHM 单体成分对混合培养鼠视网膜神经节细胞的影响[J]. 眼科研究, 2002, 20(3): 222-224.
- [15] 朱益华, 蒋幼芹, 刘忠浩, 等. EBHM 对高血压鼠视网膜神经节细胞超微结构的影响[J]. 湖南中医杂志, 2000, 16(3): 71.

【收稿日期】2006-03-28

【本文编辑】吴洋