

复方樟柳碱对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用

赵 易, 陈丽娟

作者单位:(200061)中国上海市普陀区人民医院眼科

作者简介:赵易,男,硕士,研究方向:眼底病。

通讯作者:赵易. zhaoyi0002002@sina.com

收稿日期:2010-09-13 修回日期:2010-10-27

Protection effect of compound anisodine in rats with retinal ischemia-reperfusion injury

Yi Zhao, Li-Juan Chen

Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200061, China

Correspondence to: Yi Zhao. Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200061, China. zhaoyi0002002@sina.com

Received:2010-09-13 Accepted:2010-10-27

Abstract

• **AIM:** To investigate the therapeutic effect of compound anisodine in rats with retinal ischemia-reperfusion injury.

• **METHODS:** Totally 30 adult female rats were divided into three groups at random. Group 1 ($n = 10$): normal control; group 2 ($n = 10$): high intraocular pressure (IOP) induced ocular ischemia model; group 3 ($n = 10$): compound anisodine treatment. At the 1 day, 3, 7 days the recovery condition of a-wave and b-wave by electroretinogram were observed in each group respectively. The morphology of retinal were observed by light microscope ($n = 2$) in each group randomly. Retinal morphology and ganglion cells mitochondrion were evaluated by electron microscope.

• **RESULTS:** In our research, the recovery of b-wave in group 3 were better than that in group 1 and 2, and showed significant difference ($P < 0.01$). In addition, group 3 ganglion cells mitochondrion swelling were lighter than that in group 2.

• **CONCLUSION:** Compound anisodine can ameliorate the retinal ischemia-reperfusion injury in rats.

• **KEYWORDS:** ischemia-reperfusion; compound anisodine

Zhao Y, Chen LJ. Protection effect of compound anisodine in rats with retinal ischemia-reperfusion injury. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(12):2268-2270

摘要

目的:探讨复方樟柳碱对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的治疗作用。

方法:将成年雌性 Wistar 大鼠随机分成正常对照组,造模组和复方樟柳碱组,每组 10 只。采用前房灌注升高眼压制作急性视网膜缺血模型。观察 1,3,7d 视网膜电图 a 波 b 波的恢复情况。每组随机取 2 只大鼠造模眼球光镜、电镜下观察视网膜形态结构的变化,以及神经节细胞线粒体的变化。

结果:复方樟柳碱组较造模组神经节细胞线粒体肿胀程度轻,b 波明显恢复,同造模组与正常组间 b 波的恢复比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。

结论:复方樟柳碱可减轻大鼠视网膜缺血再灌注损伤,有神经细胞保护作用。

关键词:缺血再灌注;复方樟柳碱

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.12.012

赵易,陈丽娟. 复方樟柳碱对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2010;10(12):2268-2270

0 引言

视网膜良好的血液循环是视网膜组织细胞获得充足的氧和营养物质并排出代谢产物的基本保证,而各种原因造成的视网膜血管的血流量的减少可造成视网膜的缺血性损伤。临床上许多疾病如视网膜动脉阻塞,视网膜静脉阻塞,糖尿病视网膜病变,早产儿视网膜病变等,视网膜都存在不同程度的缺血状态,并最终导致了视功能损害。但是临床上缺乏多样有效的干预措施。以大鼠眼急性缺血模型为平台,验证复方樟柳碱是否能减轻大鼠视网膜缺血再灌注损伤,从而为临床用药提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 材料 成年雌性清洁级 Wistar 大鼠 30 只,体质量 175 ~ 230g,由复旦大学医学院动物房提供,饲养条件:常温 18℃ ~ 25℃,空气流通,相对湿度 55% ~ 70%,12h 光照维持,昼夜循环每日换笼子或门口垫料(锯末)以保持其生活环境基本干燥,实验期间每组大鼠自由换食饮水。复方樟柳碱:北京紫竹药业有限公司生产。透射显微镜:Phicipcm 120,复旦电学医学院电镜教研室提供。

1.2 方法 动物适应性喂养 1wk 后 im 速眠新 0.6mL/kg 全身麻醉,左眼局部滴美多丽散瞳,待瞳孔充分散大后再滴倍诺喜。然后将连接生理盐水瓶输液 7 号头皮针刺入大鼠眼前房,然后升高输液瓶至动物垂直距离为 170cm 处,此高度可在眼内形成 120mmHg 的眼压。同时观察到眼底血管断流,视网膜缺血,眼底红光反射消失。此过程持续 45min,然后降低输液瓶高度至动物水平,拔除针头,可见视网膜恢复供血。此过程维持体外温度为 36.5℃ ~ 37℃

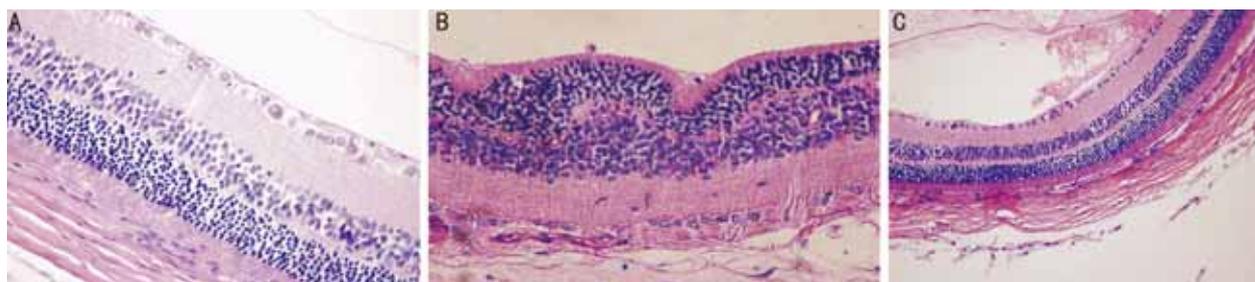


图1 大鼠视网膜组织学(HE ×400) A:正常组;B:造模组;C:樟柳碱组。

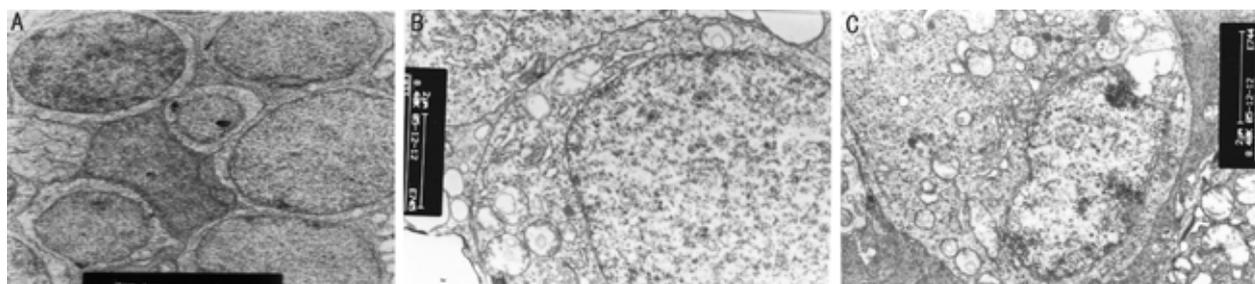


图2 大鼠视网膜神经节细胞超微结构变化(TEM ×4800) A:正常组;B:造模组;C:樟柳碱组。

再予大鼠暗适应 30min 后做电生理显示, a 波 b 波同时呈熄灭状, 视为缺血模型造模成功。将 30 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组(10 只), 造模组(10 只)和复方樟柳碱组(10 只)。正常对照组不给药, 造模组造模成功 12h 后给予大鼠耳缘后 sc 注射生理盐水(0.2mL/kg)1 次/d, 连续 7d, 复方樟柳碱组造模成功 12h 后给予大鼠耳缘后 sc 复方樟柳碱(0.2mL/kg)1 次/d, 连续 7d 造模成功后 1, 3, 7d 行视网膜电图检查, 7d 后处死大鼠取视网膜行光镜和电镜检查。

统计学分析:采 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组及各时间点的差别采用 One-way ANOVA 检验。Stata 7.0 软件包进行统计分析比较, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察 光镜检查发现:正常组视网膜各层细胞排列整齐, 无结构异常;造模组视网膜内外核层排列紊乱, 形态不规则, 组织水肿;樟柳碱组视网膜各层分界清楚, 排列基本整齐, 组织水肿(图 1)。电镜检查发现:正常组神经节细胞线粒体形态正常;造模组神经节细胞线粒体高度肿胀, 空泡化, 嵴断裂;樟柳碱组神经节细胞线粒体肿胀(图 2)。

2.2 功能学观察 樟柳碱组与造模组同正常组比较各时间点 b 波均有明显恢复($P < 0.01$, 表 1)。樟柳碱组与造模组同正常组比较各时间点 a 波也有明显恢复($P < 0.05$, 表 1)。

3 讨论

闪光 ERG 反映了除神经节细胞以外视网膜各神经元对光刺激的电反应。而 ERG 中的 a, b 波主要来自视网膜 1, 2 级神经元。a 波起源于视网膜外层的神经元主要反映了视锥及视杆细胞的功能, 而 b 波主要起源于双极细胞及 muller 细胞。b 波下降幅度与视网膜缺血时间密切相关, 并且缺血对 a, b, c 波都有影响, 但对 b 波的影响最大。因此 b 波就被广泛认可为缺血模型实验研究的评价指标。即使视网膜缺血组织形态无任何变化, b 波仍能敏感反映出缺血对视网膜造成的损伤。Grozdanic 等^[1]通过对压力

表 1 大鼠视网膜电图 a 波 b 波的变化 ($\bar{x} \pm s, \mu V$)

	波形	1d	3d	7d
正常组	a	151.9 ± 10.9	147.9 ± 8.8	153.6 ± 11.7
	b	244.1 ± 13.5	247.6 ± 10.9	238.4 ± 12.3
造模组	a	74.7 ± 6.6	90.2 ± 5.5	112.5 ± 12.7
	b	53.2 ± 6.1	62.2 ± 11	66.5 ± 2.9
樟柳碱组	a	82 ± 6	135.3 ± 6.9	137.3 ± 5.3
	b	79.3 ± 5.9	119 ± 5.8	153.8 ± 4.4

诱导的老鼠缺血模型研究证实了 b 波明显下降, 而视网膜的组织形态无明显变化。我们可以看出, 造模组 b 波的恢复率维持 21% ~ 25%, 樟柳碱组 1, 3, 7d, b 波的恢复率各为 32%, 48%, 62%, 而 a 波的恢复各组间虽然有差异但无 b 波显著。因此我们可以认为复方樟柳碱能促进促进 b 波的恢复, 减轻大鼠视网膜缺血再灌注损伤。

在缺血性视网膜病变中, 由于神经节细胞受到损伤, 最终表现为神经节细胞的死亡或凋亡。在形态学上表现为 RNFL 的变薄。目前所有的缺血模型都报道了由视网膜缺血引起的神经节细胞的损伤。研究表明, 短暂升高眼压(110mmHg, 60min)导致视网膜缺血再灌注损伤的大鼠视网膜神经元的丢失主要发生在神经节细胞层和内核层, 该模型中视网膜神经节细胞的死亡具有典型的细胞凋亡特征^[2], 再灌注 12h 有明显的组织病理改变和凋亡现象, 再灌注 24h, Tunnel 阳性细胞最多。结合我们的实验结果, 从形态学观察用药组较造模组神经节细胞线粒体的肿胀程度要轻, 可以认为复方樟柳碱对节细胞有一定的保护作用, 并且可能有潜在的视神经保护作用。

目前已经明确多种因素如自由基, 兴奋性氨基酸毒性, 细胞因子, 黏附分子等参与视网膜缺血再灌注损伤的发生与发展, 根据以往对于樟柳碱的研究主要集中于自由基对视网膜缺血再灌注损伤的影响。(1) MDA(丙二醛):视网膜组织富含多不饱和脂肪酸, 因此缺血状态下的视网膜对氧自由基引起的脂质过氧化高度敏感。MDA 是氧自由基与细胞膜成份发生脂质过氧化反应的产物, 缺

血时黄嘌呤氧化酶和来自 AMP 的次黄嘌呤在组织中堆积,再加上再灌注由于氧分子的急剧增多,自由基的产生也急剧增加^[3]。正是自由基在缺血/再灌期的暴发生成导致了不同类型的组织损伤。同时由于脂质过氧化引起细胞膜稳定性下降,及 DNA 分子的片断化,并且通过激活细胞因子和 NF- κ B 上调 iNOS 和 COX-2 的表达,引起神经兴奋性毒性物质谷氨酸生成增多,从而使钙稳态的失衡^[2],最终导致神经节细胞的死亡^[4]。(2) SOD:超氧化物歧化酶是一种金属蛋白属于酶类自由基清除剂。用于歧化 O²⁻生成 H₂O₂。哺乳类动物细胞含有两种 SOD 即胞浆中的 CuZn-SOD 和线粒体中 Mn-SOD, SOD 作用的主要意义在于清除 H₂O₂和 OH⁻的前身 O²⁻,从而保护细胞不受毒性氧自由基的损伤。(3) NO: NO 是一种气体自由基也是一种细胞信使和效应分子,在生理情况下主要由结构性(nNOS, eNOS)合成释放。少量的 NO 参与许多生理功能的调节,内皮细胞释放的 NO 具有血管松弛和抗血小板聚集和黏附效应,其作用同样被超氧化物歧化酶(SOD)和细胞色素 C 加强,被 Fe²⁺和其他氧化还原产物抑制。但 NO 产生的异常能介导多种视网膜疾病发生发展,大量的实验研究证实了 NO 参与了视网膜缺血再灌注损伤。NO 是 NOS 催化 L-arg(L-精氨酸)生成的,在调节神经传导血管扩张,神经性细胞毒性方面有重要作用。近年来大量的研究证实了

视网膜缺血后 nNOS, eNOS, iNOS 含量增加,抑制 NOS 的生成可以对视网膜组织形态和功能起保护作用,发现长期服用 iNOS 抑制剂,对视网膜缺血有保护作用^[5]。到目前为止认为 iNOS 参与视网膜缺血/再灌损伤整个的发生发展过程中。本试验显示复方樟柳碱可减轻缺血对视网膜的损伤表现为节细胞线粒体肿胀度轻, b 波明显恢复,复方樟柳碱有潜在的视神经保护作用。

参考文献

- 1 Grozdanic SD, Sakaguchi DS, Kwon YH, *et al.* Functional characterization of retina and optic nerve after acute ocular ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(6):2597-2605
- 2 Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, *et al.* Retinal ischemia; mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(1):91-147
- 3 Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, *et al.* Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* 2002;54(2):271-284
- 4 Celebi S, Dilsiz N, Yilmaz T, *et al.* Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia-reperfusion in the guinea pig retina. *Eur J Ophthalmol* 2002;12(2):77-83
- 5 Hofman P, van Blijswijk BC, Gaillard PJ, *et al.* Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion. *Arch Ophthalmol* 2001;119(6):861-866