

· 实验研究 ·

藏红花素与灯盏细辛对慢性高眼压模型大鼠
视神经保护作用的比较

吕伯昌 许治国 陈涛 史娟 杨新光

710004 西安,陕西省眼科诊疗中心 西安市第四医院眼科 西安交通大学医学院附属广仁医院眼科(吕伯昌、许治国、杨新光);710032 西安,第四军医大学基础部人体解剖与组织胚胎学教研室暨梁铨璐脑研究中心(陈涛、史娟)

通信作者:杨新光,Email:xinguangyangxa@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.11.007

【摘要】 **背景** 青光眼视神经损害的主要机制是视觉神经元的凋亡和视网膜血液供应的减少,灯盏细辛已证实对高血压大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)和视神经有保护作用。研究发现,藏红花提取物具有抗炎、抑制神经元凋亡和调节血流等作用,但其能否保护青光眼患者的 RGCs 尚不清楚。**目的** 探讨藏红花素对慢性高血压模型大鼠视神经的保护作用。**方法** 采用随机数字表法将 32 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型对照组、灯盏细辛组、藏红花素组,每组 8 只,均以右眼为实验眼。模型对照组、灯盏细辛组、藏红花素组大鼠采用巩膜静脉烧灼法建立慢性高血压模型;假手术组大鼠仅剪开结膜,灯盏细辛组和藏红花素组大鼠于术前 30 min 和术后每日分别腹腔内注射灯盏细辛注射液 150 mg/kg(0.5 ml)和藏红花素 20 mg/kg(0.5 ml),共给药 4 周,假手术组和模型对照组大鼠以同样的方式注射 0.5 ml 生理盐水。各组大鼠均于术前和术后 1 d、3 d、1 周、2 周、3 周、4 周测量眼压。术后 4 周制备大鼠眼球及视神经标本,采用苏木精-伊红染色法测定视网膜厚度;采用 TUNEL 染色法计数 RGCs 凋亡数量;采用透射电子显微镜观察各组大鼠视神经轴突超微结构的变化;采用 Western blot 法检测视网膜中 bcl-2 和 bax 蛋白的表达。**结果** 模型对照组、灯盏细辛组和藏红花素组大鼠造模和干预后不同时间点眼压均明显高于假手术组,造模后不同时间点大鼠的眼压值均明显高于造模前,各组大鼠在造模前后不同时间点眼压值的变化差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 169.079, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 50.505, P = 0.000$)。假手术组、模型对照组、灯盏细辛组和藏红花素组大鼠视网膜厚度分别为(192.72 ± 4.28)、(165.15 ± 3.89)、(177.75 ± 3.35)和(182.48 ± 4.12) μm,藏红花素组大鼠视网膜厚度值明显低于假手术组而高于模型对照组和灯盏细辛组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。假手术组、模型对照组、灯盏细辛组和藏红花素组大鼠 RGCs 凋亡率分别为(2.58 ± 1.33)%、(42.10 ± 4.71)%、(28.34 ± 2.96)%和(19.95 ± 2.93)%,藏红花素组大鼠 RGCs 凋亡率明显低于模型对照组和灯盏细辛组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。藏红花素组大鼠视神经有髓纤维数量和 bcl-2/bax 值均明显高于模型对照组和灯盏细辛组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 藏红花素可抑制 RGCs 凋亡和视神经纤维的变性,对慢性高血压大鼠视网膜神经细胞发挥保护作用,其对视神经的保护作用强于灯盏细辛。

【关键词】 藏红花素/化学; 草药; 植物提取物/药理学; 高血压; 凋亡; 视网膜神经节细胞; 灯盏细辛/化学; 视神经保护

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273902)

A comparative study on protective effect of optical nerve between crocin and erigeron breviscapus in chronic ocular hypertensive rats Lyu Bochang, Xu Zhiguo, Chen Tao, Shi Juan, Yang Xinguang

Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Affiliated Guangren Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China (Lyu BC, Xu ZG, Yang XG); Department of Anatomy, Histology and Embryology and K. K. Leung Brain Research Centre, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China (Chen T, Shi J)

Corresponding author: Yang Xinguang, Email: xinguangyangxa@163.com

[Abstract] **Background** The primary cause of glaucomatous optic nerve damage is apoptosis of nerve cell and disorder of retinal circulation. Erigeron breviscapus is confirmed to have a protective effect on retinal ganglion cells (RGCs) in rats with chronic ocular hypertension, and crocin has the effect of anti-inflammation and anti-apoptosis. However, whether crocin can protect RGCs against ocular hypertension damage is unclear. **Objective** This study was to investigate the protective effect of crocin on the optic nerve in chronic ocular hypertension.

Methods Thirty-two SD rats were randomized into the sham operation group, model control group, erigeron group and crocin group, 8 rats for each group. The right eyes served as experimental eyes. Chronic ocular hypertensive models were established by episcleral vein cauterization in the rats of the model control group, erigeron group and crocin group, and only conjunctiva was cut off in the sham operation group. Erigeron (150 mg/kg) and crocin (20 mg/kg) was intraperitoneally injected in the erigeron group and crocin group respectively 30 minutes before operation and once daily after operation for 4 weeks, and 0.5 ml normal saline was used in the sham operation group and model control group. Intraocular pressure (IOP) was measured before surgery and 1 day, 3 days, 1 week, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks after surgery. The samples of eyeballs and optic nerve in the rats were prepared at 4 weeks after surgery. Retinal thickness was measured by hematoxylin and eosin staining. The apoptosis of RGCs was detected by TUNEL assay. The ultrastructure change of optic nerve was examined under the transmission electron microscope, and the expression of bcl-2 and bax proteins in retinal homogenates was analyzed by Western blot. The use and care of the animals followed the Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Committee. **Results** The IOPs were significantly elevated in the model control group, erigeron group and crocin group in comparison with the sham operation group, and the IOPs was significantly higher in various time points after surgery than that before surgery ($F_{\text{group}} = 169.079, P = 0.000; F_{\text{time}} = 50.505, P = 0.000$). The retinal thickness was (192.72 ± 4.28), (165.15 ± 3.89), (177.75 ± 3.35) and (182.48 ± 4.12) μm in the sham operation group, model control group, erigeron group and crocin group, and rat retinal thickness in the crocin group was significantly lower than that in the sham operation group and higher than that in model control group and erigeron group (all at $P < 0.05$). The percentage of apoptotic RGCs in the sham operation group, model control group, erigeron group and crocin group, showed significant reduction in comparison with the model control group and erigeron group (all at $P < 0.05$). The number of myelinated nerve fibers and bcl-2/bax values were significantly increased in the crocin group compared with the model control group and erigeron group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Crocin affords a optic nerve by inhibiting RGC apoptosis and optic nerve degeneration in SD rats with chronic ocular hypertension, and the protecting effect of crocin is more prominent than that of erigeron breviscapus.

[**Key words**] Crocus/chemistry; Herbal medicine; Plant extracts/pharmacology; Ocular hypertension; Apoptosis; Retinal ganglion cells; Erigeron/chemistry; Optic nerve protection

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81273902)

青光眼是一种慢性视觉神经衰退性疾病,是导致视力丧失的主要原因之一。其主要表现为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)进行性死亡和视神经萎缩,最终导致视力不可逆损伤或丧失^[1-2]。目前降低眼压是治疗青光眼的主要方法,但即使临床研究发现眼压降低至理想水平,部分青光眼患者仍存在视神经的损伤。目前认为虽然眼压恢复到了正常水平,但 RGCs 损伤后引起的凋亡和轴突的缺失仍在继续,同时,视盘血液循环的障碍也是青光眼患者视功能持续损伤的重要原因之一^[3-6]。因此,对于青光眼的治疗除了降低眼压外,还应改善视神经的血液供应。研究表明,藏红花提取物有抗炎、抗动脉粥样硬化、抗遗传毒性和抗细胞毒性等功能,还可以抑制神经元凋亡^[7]。我们先前的研究发现,藏红花提取液对慢性高眼压兔眼视网膜具有保护功能^[8],但是藏红花素作为藏红花的主要活性成分之一,在青光眼中的具体作用及机制尚不十分清楚。本研究观察藏红花素对大鼠实验性青光眼模型是否起到视神经保护作用,并与临床上已证实对青光眼患者具有良好视神经保护作用的灯盏细辛进行对照。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 32 只 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠,体质量 250 ~ 300 g,由第四军医大学实验动物中心提供。所有大鼠经眼科常规检查排除眼部疾病。实验动物的使用和饲养符合国家科学技术部发布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 灯盏细辛注射液(云南生物谷灯盏花药业有限公司);藏红花素(美国 Sigma 公司);TUNEL 染色试剂盒(德国罗氏公司);小鼠抗大鼠 bcl-2 一抗(sc-7382, 1:500)、小鼠抗大鼠 bax 一抗(sc-23959, 1:500)、HRP 标记山羊抗小鼠二抗 IgG(sc-2005, 1:5 000)(美国 Santa Cruz 公司);质量分数 0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液(美国爱尔康公司);氯霉素滴眼液(山东博士伦福瑞达制药有限公司)。Tonopen II 眼压计(美国 Medtronic SALON 公司);光学显微镜(日本奥林巴斯株式会社);透射电子显微镜(日本日立株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的分组 按照随机数字表法将大鼠随机分为假手术组、模型对照组、灯盏细辛组和藏红花素组,每组 8 只。

1.2.2 高眼压模型的建立及药物干预 参考 Shareef 等^[9]的方法建立大鼠高眼压模型:大鼠用质量分数 4% 水合氯醛腹腔内注射,剂量为 10 ml/kg,选取右眼用 0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液点眼行表面麻醉,沿角巩膜缘从 8:00 ~ 13:00 位剪开球结膜约 2 mm,暴露 4 条表浅巩膜静脉,分别于上直肌和外直肌周围分离出静脉,大头针加热后灼烧颞侧、颞上以及颞下静脉,保留鼻侧静脉;假手术组仅剪开右眼球结膜,巩膜静脉不予以处理。术后妥布霉素地塞米松眼膏点眼。各组大鼠左眼均不予以处理。采用 Tono-pen II 眼压计测量大鼠眼压,术后眼压大于 22 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)时视为造模成功。每组实验动物若有死亡时及时补充。分别于术前和术后 1 d、3 d、1 周、2 周、3 周、4 周时测量大鼠眼压,测量时先用 4% 水合氯醛溶液腹腔内注射,0.5% 盐酸丙美卡因点眼行表面麻醉,用眼压计连续测量眼压 3 次,取其平均值。测量完毕后用氯霉素滴眼液点眼。术前 30 min 及术后每日 10:00 ~ 11:00,灯盏细辛组大鼠腹腔内注射灯盏细辛注射液 150 mg/kg(0.5 ml),藏红花素组大鼠腹腔内注射藏红花素 20 mg/kg(0.5 ml),假手术组和模型对照组大鼠腹腔内注射 0.5 ml 生理盐水,共注射 4 周。

1.2.3 组织病理学检查大鼠视网膜厚度 造模后 4 周,过量麻醉法处死大鼠,摘取右眼球,用质量分数 10% 中性甲醛固定,常规脱水,透明,石蜡包埋,选取颞下方后极部视网膜行 4 μm 连续切片,苏木精-伊红染色后于 200 倍光学显微镜下观察并拍照,每张切片中任意选取 3 个视野测量视网膜内界膜至外界膜的距离作为视网膜厚度。

1.2.4 TUNEL 法检测大鼠 RGCs 凋亡率 取石蜡包埋切片用蛋白酶 K 工作液室温处理 20 min, PBS 漂洗 2 次,加入 50 μl TUNEL 反应混合液(50 μl TdT+450 μl 荧光素标记的 dUTP 混匀)37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次,用 DAPI 染细胞核 5 min,再用 PBS 漂洗 3 次,抗荧光淬灭封片剂封片,在 200 倍荧光显微镜下观察并拍照。TUNEL 阳性细胞呈绿色荧光,每张载玻片随机选取 5 个视野,计算 TUNEL 阳性细胞占总 RGCs 的比例。

1.2.5 透射电子显微镜下观察视神经纤维的超微结构 选取视盘筛板后视神经纤维标本,用质量分数 5% 戊二醛固定,逐级乙醇和丙酮脱水,环氧树脂包埋,制成约 70 nm 超薄切片,透射电子显微镜下观察。每张切片任意选取 5 个视野,计数单位面积内(100 μm²)有

髓神经纤维的数量。

1.2.6 Western blot 法检测视网膜中 bcl-2 和 bax 蛋白的表达 取出视网膜标本后加入冰冷的 RIPA 裂解液,匀浆器充分匀浆。4 °C 下 1 000×g 离心 10 min,收集上清并测定蛋白质浓度。每孔取 50 μg 蛋白行 SDS-PAGE 电泳,并将蛋白转印到硝酸纤维素膜上,脱脂奶粉封闭后加入一抗,4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,加入二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 显色,拍照。对图像进行灰度值分析,以 β-actin 为内参,计算 bcl-2/bax 灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Bartlett 检验方差齐。采用完全随机分组多水平实验设计,假手术组、模型对照组、灯盏细辛组和藏红花素组间大鼠手术前后不同时间点眼压测量值差异比较采用重复测量两因素方差分析;术后 4 周时 4 个组间视网膜厚度、RGCs 凋亡率、有髓神经纤维数和 bcl/bax 蛋白表达比值的总体差异比较均采用单因素方差分析,多重比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型的一般情况

用加热大头针灼烧巩膜静脉时可见大鼠近端巩膜静脉充血怒张,远端巩膜静脉血流消失,同时未出血。术后大鼠的平均眼压为 35.26 mmHg,均高于 22 mmHg。

2.2 造模前后各组大鼠的眼压变化及比较

模型对照组、灯盏细辛组和藏红花素组大鼠造模后不同时间点眼压均明显高于假手术组,造模后不同时间点大鼠的眼压值均明显高于造模前,各组大鼠造模前后不同时间点眼压值的变化差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 169.079, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 50.505, P = 0.000$)。各组大鼠造模前眼压比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),造模后各时间点模型对照组大鼠眼压明显高于假手术组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),灯盏细辛组和藏红花素组大鼠眼压均高于假手术组而低于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。至造模后第 4 周,灯盏细辛组和藏红花素组大鼠眼压均接近假手术组。造模后 1 d、3 d 及造模后 1、2、3 周,灯盏细辛组和藏红花素组大鼠眼压均明显高于其造模前值,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),但造模后 4 周,灯盏细辛组和藏红花素组大鼠眼压接近造模前值,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 造模前后不同时间点 4 个组大鼠眼压比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mmHg}$)

组别	样本量	不同时间点眼压值						
		造模前	造模后 1 d	造模后 3 d	造模后 1 周	造模后 2 周	造模后 3 周	造模后 4 周
假手术组	8	12.71 ± 1.34	13.06 ± 1.98	12.45 ± 1.65	12.60 ± 1.65	12.38 ± 1.53	13.85 ± 1.58	12.95 ± 1.21
模型对照组	8	13.33 ± 1.41	34.93 ± 3.64 ^{ab}	32.62 ± 4.12 ^{ab}	31.23 ± 2.52 ^{ab}	31.73 ± 3.52 ^{ab}	31.96 ± 2.19 ^{ab}	31.09 ± 3.45 ^{ab}
灯盏细辛组	8	12.54 ± 1.51	30.98 ± 2.68 ^{abc}	28.95 ± 3.62 ^{abc}	28.99 ± 2.00 ^{abc}	24.19 ± 2.26 ^{abc}	19.89 ± 2.68 ^{abc}	14.95 ± 3.16 ^c
藏红花素组	8	12.98 ± 2.31	30.26 ± 3.15 ^{abc}	27.62 ± 2.85 ^{abc}	25.09 ± 2.18 ^{abcd}	21.07 ± 2.11 ^{abcd}	19.20 ± 1.89 ^{abc}	13.26 ± 3.12 ^c

注: $F_{\text{分组}} = 169.079, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 50.505, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 739.314, P = 0.000$ 。与各自组内造模前值比较, ^a $P < 0.05$; 与同时点假手术组比较, ^b $P < 0.05$; 与同时点模型对照组比较, ^c $P < 0.05$; 与同时点灯盏细辛组比较, ^d $P < 0.05$ (单因素方差分析, SNK- q 检验)

2.3 各组大鼠视网膜厚度的比较

4 个组间视网膜厚度明显不同, 差异有统计学意义 ($F = 67.954, P = 0.000$)。与假手术组比较, 模型对照组大鼠视网膜厚度明显变薄, 灯盏细辛组和藏红花素组大鼠视网膜厚度较模型对照组均明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 藏红花素组大鼠视网膜厚度较灯盏细辛组明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1, 表 2)。

表 2 各组大鼠视网膜厚度比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

组别	样本量	视网膜厚度
假手术组	8	192.72 ± 4.28
模型对照组	8	165.15 ± 3.89 ^a
灯盏细辛组	8	177.75 ± 3.35 ^b
藏红花素组	8	182.48 ± 4.12 ^{bc}
F		67.954
P		0.000

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与灯盏细辛组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, SNK- q 检验)

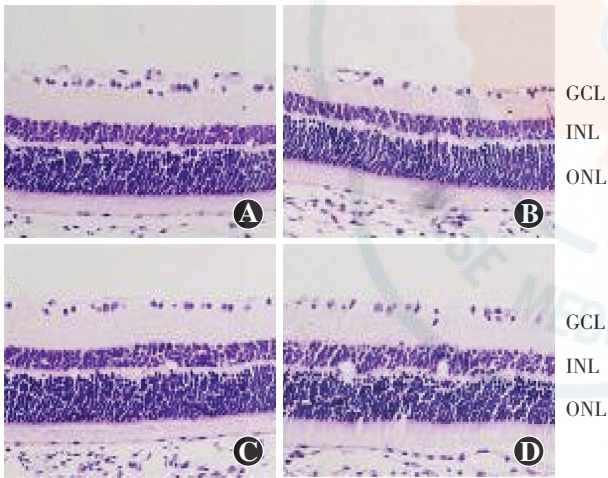


图 1 各组大鼠视网膜厚度的比较 (HE × 200) A: 假手术组大鼠视网膜厚度正常 B: 模型对照组大鼠视网膜厚度明显变薄 C: 灯盏细辛组大鼠视网膜厚度较模型对照组增加 D: 藏红花素组大鼠视网膜厚度大于灯盏细辛组 GCL: 视网膜节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层

2.4 各组大鼠 RGCs 凋亡情况

假手术组大鼠 RGCs 层未发现 TUNEL 阳性细胞。与假手术组相比, 模型对照组大鼠 RGCs 层出现大量 TUNEL 阳性细胞, 灯盏细辛组大鼠 RGCs 层可见 TUNEL 阳性细胞, 但明显少于模型对照组, 而藏红花素组大鼠 RGCs 层 TUNEL 阳性细胞明显减少 (图 2)。各组大鼠 RGCs 层 TUNEL 阳性细胞数明显不同, 差异有统计学意义 ($F = 211.950, P < 0.05$)。与模型对照组相比, 灯盏细辛组及藏红花素组大鼠 RGCs 层 TUNEL 阳性细胞数减少, 而与灯盏细辛组相比, 藏红花素组 RGCs 层 TUNEL 阳性细胞数减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2, 表 3)。

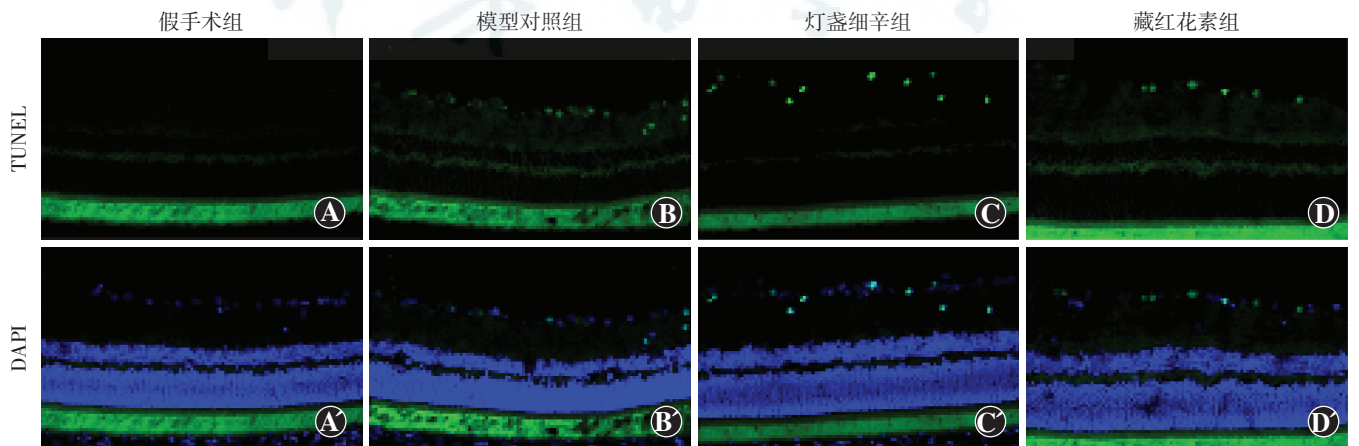


图 2 各组 RGCs 凋亡染色 (TUNEL × 200) TUNEL 阳性细胞呈绿色荧光, 蓝色示细胞核 DAPI 染色 A、A': 假手术组 RGCs 层未见 TUNEL 阳性细胞 B、B': 模型对照组大鼠 RGCs 层可见较多的 TUNEL 阳性细胞, 呈绿色荧光 C、C': 灯盏细辛组大鼠 RGCs 层可见 TUNEL 阳性细胞, 其数量少于模型对照组 D、D': 藏红花素组大鼠 RGCs 层 TUNEL 阳性细胞数少于灯盏细辛组

表 3 各组大鼠 RGCs 凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	凋亡率
假手术组	8	2.58±1.33
模型对照组	8	42.10±4.71 ^a
灯盏细辛组	8	28.34±2.96 ^b
藏红花素组	8	19.95±2.93 ^{bc}
F		211.950
P		0.000

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$;与灯盏细辛组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-q 检验) RGCs:视网膜神经节细胞

2.5 各组大鼠视网膜组织的超微结构变化

假手术组大鼠视神经纤维排列密集,直径和长度基本均匀,形状较为规则,髓鞘完整,由数层同心圆状板层结构重叠而成,结构致密,边界清楚,髓鞘间质组织少,周围可见少量细胞核及细胞器,线粒体膜完整,嵴结构清楚。模型对照组大鼠视神经纤维排列稀疏,纤维间由大量间质组织填充,大部分髓鞘的同心圆状板层结构消失,部分髓鞘结构松散,出现空泡样改变,偶可见髓鞘组织断裂,边界不清,间质内可见细胞核及空泡化的线粒体,细胞质疏松,线粒体肿胀变形。灯盏细辛组和藏红花素组大鼠视神经超微结构改变与

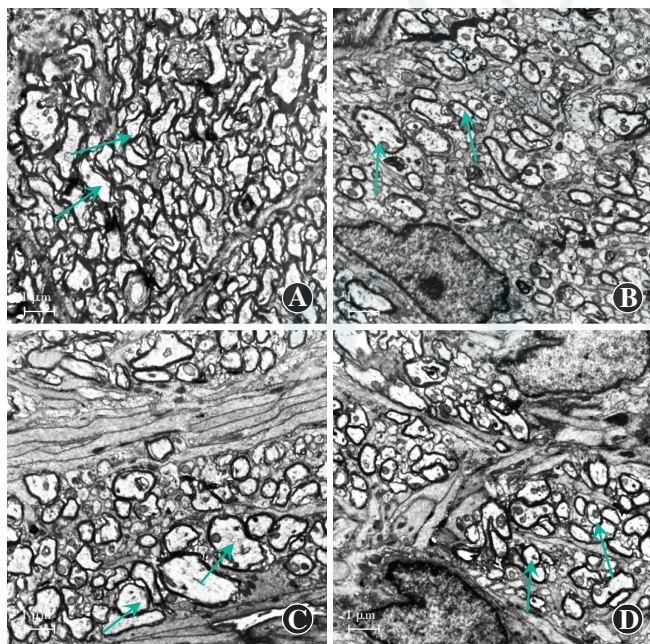


图 3 各组大鼠视神经超微结构变化 ($\times 60\,000$, 标尺 = 1 μm) A:假手术组大鼠视神经纤维排列密集,形状较规则,髓鞘完整,间质组织少,周围可见少量细胞核及细胞器,线粒体膜完整(箭头) B:模型对照组大鼠视神经纤维稀疏,纤维间由间质组织填充,部分髓鞘有空泡样改变,偶见髓鞘组织断裂,线粒体肿胀变形(箭头) C:灯盏细辛组大鼠视神经结构变化较模型对照组轻(箭头) D:藏红花素组大鼠视神经结构变化较灯盏细辛组轻(箭头)

模型对照组相似,但结构异常程度较模型对照组轻(图 3)。假手术组、模型对照组、灯盏细辛组和藏红花素组大鼠存活的有髓神经纤维数量总体比较差异有统计学意义($F = 309.603, P = 0.000$);模型对照组大鼠有髓神经纤维数量明显少于假手术组、灯盏细辛组及藏红花素组,藏红花素组大鼠有髓神经纤维数量明显高于灯盏细辛组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 4)。

表 4 各组大鼠视网膜组织中有髓神经纤维数量的比较 ($\bar{x} \pm s, /100 \mu\text{m}^2$)

组别	样本量	髓神经纤维数
假手术组	8	95.62±2.51
模型对照组	8	54.25±3.85 ^a
灯盏细辛组	8	71.50±2.27 ^b
藏红花素组	8	83.52±2.45 ^{bc}
F		309.603
P		0.000

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$;与灯盏细辛组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-q 检验)

2.6 各组大鼠视网膜组织中凋亡相关因子 bcl-2 和 bax 蛋白表达的比较

假手术组大鼠视网膜仅有微量 bax 和 bcl-2 蛋白表达,条带较弱,模型对照组大鼠视网膜中 bax 蛋白表达较强,而 bcl-2 蛋白表达较弱,灯盏细辛组和藏红花素组大鼠视网膜中 bcl-2 蛋白表达明显增强,bax 蛋白表达明显减弱(图 4)。假手术组、模型对照组、灯盏细辛组和藏红花素组大鼠视网膜中 bcl-2/bax 值总体比较差异有统计学意义($F = 168.274, P = 0.000$);与假手术组相比,模型对照组大鼠视网膜中 bcl-2/bax 值明显低于假手术组、灯盏细辛组和藏红花素组大鼠视网膜中 bcl-2/bax 值明显高于模型对照组,藏红花素组大鼠视网膜中 bcl-2/bax 值明显高于灯盏细辛组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 5)。

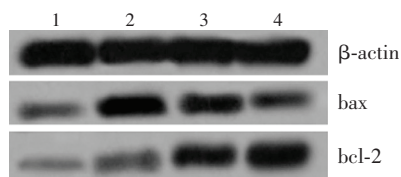


图 4 各组大鼠视网膜组织中 bcl-2 和 bax 蛋白的表达 假手术组 bax 和 bcl-2 蛋白表达条带较弱,模型对照组 bax 蛋白表达条带较强,而 bcl-2 蛋白表达条带较弱,灯盏细辛组 bcl-2 蛋白表达条带明显增强,bax 蛋白表达条带减弱,而藏红花素组 bax 蛋白表达条带弱于灯盏细辛组,bcl-2 蛋白表达条带强于灯盏细辛组 1:假手术组 2:模型对照组 3:灯盏细辛组 4:藏红花素组

表 5 各组大鼠视网膜组织中 bcl-2/bax 值的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	bcl-2/bax
假手术组	8	0.62±0.085
模型对照组	8	0.29±0.037 ^a
灯盏细辛组	8	1.06±0.087 ^b
藏红花素组	8	2.18±0.200 ^{bc}
F		168.274
P		0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与灯盏细辛组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,SNK- q 检验)

3 讨论

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。青光眼视神经的损伤可能是多因素相互作用的结果。有研究表明,除了眼压是青光眼视神经损伤的一个重要的因素外,可能还存在着缺血性因素^[10]。青光眼由于眼压升高,眼内组织的血液供应障碍,会发生视网膜和视神经的缺血缺氧改变,进而可能导致 RGCs 凋亡,但目前的研究以及临床观察而言,尚未有显著改善视网膜血液循环的药物。灯盏细辛是一种中草药,先前的研究表明,灯盏细辛可刺激血管内皮细胞的溶栓和抗凝血功能,扩张血管,减少血管阻力,增加血流量,改善微循环,抑制血栓形成,并且对眼压得到控制的青光眼患者的视力具有保护作用^[11],因此本研究中我们选择灯盏细辛作为对照,评估藏红花素对慢性高血压大鼠视神经的保护作用及其机制。

本研究中采用传统的巩膜静脉灼烧法制备大鼠慢性高血压模型,使房水回流受阻,从而引起眼压升高。本研究结果显示,藏红花素和灯盏细辛均可以降低大鼠眼压,其降低眼压的机制可能与促进房水外流有关。何书英等^[12]的研究显示,藏红花素可以抑制血管平滑肌细胞外钙离子的内流及内质网钙离子的释放,提示藏红花素具有钙拮抗作用。灯盏细辛对视神经保护的作用机制与钙拮抗有较好的关联性。钙拮抗剂可改变跨细胞膜的钙摄取,阻滞细胞内钙的摄取和释放,松弛血管平滑肌,减少血管张力,促进房水外流,同时钙拮抗剂还可能改善视盘的血液供应^[13],因此藏红花素和灯盏细辛可能是作为钙拮抗剂而发挥降眼压作用。本研究中还显示,藏红花素能够增加视网膜厚度,减少 RGCs 凋亡,对视神经起到一定的保护作用。通过比较两种药物对慢性高血压模型大鼠视神经的保护作用,显示藏红花素组视网膜较灯盏细辛组厚,并且藏红花素组 RGCs 凋亡数量明显少于灯盏细辛组,说明藏

红花素在阻止视神经变性方面优于灯盏细辛。

药理学研究表明,藏红花提取物可以防治胃部和心血管疾病,抑制肿瘤细胞增生,还可以保护神经元免受缺血缺氧损伤^[14-15],此外藏红花提取物可以降低原发性开角型青光眼患者的眼压,并通过 PI3K/AKT 信号通路阻止视网膜缺血-再灌注损伤诱导的 RGCs 凋亡^[16-17]。在高眼压状态下,视盘周围血流动力学的变化会导致 RGCs 持续或间断缺血,进而影响线粒体的功能。RGCs 凋亡是青光眼发生的关键因素,Bcl-2 是一个重要的抗凋亡基因,RGCs 发育过程中 bcl-2 表达下调,成熟的 RGCs 仅表达少量 bcl-2^[18]。Bax 是促凋亡基因,bcl-2/bax 值是启动细胞凋亡的分子开关。本研究中发现,当大鼠眼压升高时,bcl-2/bax 值下调,藏红花素和灯盏细辛治疗后其比值明显升高,与 bcl-2 和 bax 在其他青光眼研究中的结果一致^[19-20]。同时,本研究中也发现藏红花素对 bcl-2 和 bax 值的调节作用比灯盏细辛更加明显。这些结果表明藏红花素对大鼠高眼压模型的视神经保护作用可能是通过上调 bcl-2/bax 值完成的,其详细的作用机制有待进一步研究。

总之,藏红花素对高眼压大鼠 RGCs 和视神经的保护作用均强于灯盏细辛,这种保护作用可能是通过调节 bcl-2 家族相关因子表达而实现的。随着对藏红花素研究的深入,可能会为中药保护青光眼的视神经功能提供新的途径。

参考文献

- [1] Liu WD, Chen LL, Shen CY, et al. Neuroprotective effect of compound anisodine in a mouse model with chronic ocular hypertension [J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128 (19): 2652-2657. DOI: 10.4103/0366-6999.166043.
- [2] Jung KI, Kim JH, Park CK. α 2-Adrenergic modulation of the glutamate receptor and transporter function in a chronic ocular hypertension model [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 765: 274-283. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.08.035.
- [3] Mayama C, Araie M. Effects of antiglaucoma drugs on blood flow of optic nerve heads and related structures [J]. Jpn J Ophthalmol, 2013, 57(2): 133-149. DOI: 10.1007/s10384-012-0220-x.
- [4] Mastropasqua R, Fasanella V, Agnifili L, et al. Advance in the pathogenesis and treatment of normal-tension glaucoma [J]. Prog Brain Res, 2015, 221: 213-232. DOI: 10.1016/bs.pbr.2015.05.007.
- [5] Prada D, Harris A, Guidoboni G, et al. Autoregulation and neurovascular coupling in the optic nerve head [J]. Surv Ophthalmol, 2016, 61(2): 164-186. DOI: 10.1016/j.survophthal.2015.10.004.
- [6] Parlak I, Parlak M, Erdur B, et al. Sudden painless visual loss after initiation of antihypertensive therapy: case report [J]. Eur J Emerg Med, 2007, 14(6): 354-355. DOI: 10.1097/MEJ.0b013e3282004969.
- [7] Khazdair MR, Boskabady MH, Hosseini M, et al. The effects of Crocus sativus (saffron) and its constituents on nervous system: A review [J]. Avicenna J Phytomed, 2015, 5(5): 376-391.
- [8] 曹娟, 吕伯昌. 藏红花提取液对慢性高血压兔视网膜的影响 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(25): 4-7.
- [9] Cao J, Lyu BC. Influence of saffron extract on the retina of rabbit with

- chronic ocular hypertension[J]. Chin Med Herald, 2014, 11(25): 4-7.
- [9] Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, et al. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats[J]. Exp Eye Res, 1995, 61(3): 379-382.
- [10] Mi XS, Feng Q, Lo AC, et al. Protection of retinal ganglion cells and retinal vasculature by Lycium barbarum polysaccharides in a mouse model of acute ocular hypertension[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(10): e45469[2016-01-23]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045469>.
- [11] Zhong Y, Xiang M, Ye W, et al. Visual field protective effect of Erigeron breviscapus (vant.) Hand. Mazz. extract on glaucoma with controlled intraocular pressure: a randomized, double-blind, clinical trial[J]. Drugs R D, 2010, 10(2): 75-82. DOI: 10.2165/11539090-000000000-00000.
- [12] 何书英, 钱之玉, 唐富天. 西红花苷对牛主动脉平滑肌细胞内钙离子浓度的影响[J]. 药学报, 2004, 39(10): 778-781.
He SY, Qian ZY, Tang FT. Effect of crocin on intracellular calcium concentration in cultured bovine aortic smooth muscle cells[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2004, 39(10): 778-781.
- [13] 邹燕红, 胡铮. 青光眼发病机制与抗青光眼药物的进展[J]. 国际医学: 眼科学分册, 1998, 22(2): 65-74.
Zou YH, Hu Z. The pathogenesis of glaucoma and the development of anti-glaucoma drugs[J]. Ophthalmol Sect Foreign Med Sci, 1998, 22(2): 65-74.
- [14] Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury *in vitro* and *in vivo*[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1770(4): 578-584.
- [15] Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2010, 50(8): 761-786. DOI: 10.1080/10408390902773003.
- [16] Jabbarpoor Bonyadi MH, Yazdani S, Saadat S. The ocular hypotensive effect of saffron extract in primary open angle glaucoma: a pilot study[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 399. DOI: 10.1186/1472-6882-14-399.
- [17] Qi Y, Chen L, Zhang L, et al. Crocin prevents retinal ischaemia/reperfusion injury-induced apoptosis in retinal ganglion cells through the PI3K/AKT signalling pathway[J]. Exp Eye Res, 2013, 107: 44-51. DOI: 10.1016/j.exer.2012.11.011.
- [18] Cellerino A, Bahr M, Isenmann S. Apoptosis in the developing visual system[J]. Cell Tissue Res, 2000, 301(1): 53-69.
- [19] Park HY, Kim JH, Lee DE, et al. Changes of the retina and intrinsic survival signals in a rat model of glaucoma following brinzolamide and travoprost treatments[J]. Ophthalmic Res, 2011, 46(4): 208-217. DOI: 10.1159/000324779.
- [20] Wang Z, Pan X, Wang D, et al. Protective effects of protocatechuic acid on retinal ganglion cells from oxidative damage induced by H₂O₂[J]. Neurol Res, 2015, 37(2): 159-166. DOI: 10.1179/1743132814Y.0000000421.

(收稿日期: 2016-02-04)

(本文编辑: 尹卫靖)

消息

全国卫生专业高级技术资格考试辅导用书《眼科学习题集》正式出版



为探索并建立高级卫生人才评价模式, 进一步推动高级卫生专业技术资格考试工作, 国家卫计委人才交流中心《中国卫生人才》杂志社与慧生医学网(慧生信国际教育)等单位共同组建了“高级卫生专业技术资格考试辅导用书编委会”, 负责组织编写“全国卫生专业高级技术资格考试习题集丛书”。目前《眼科学习题集》的编写工作已完成, 并由人民卫生出版社正式出版。

《眼科学习题集》由王宁利教授担任主编, 由赵堪兴、姚克、马建民教授及赵红梅主任担任副主编, 由全国 48 位具有良好医学教育背景、在临床和科研第一线工作多年、具有丰富临床和教育经验的眼科专家共同参与此习题集的编写。为进一步确保本习题集内容的科学性、准确性、严谨性及实用性, 特邀请全国眼科知名专家组建了《眼科学习题集》专家指导委员会, 聘请赵家良教授担任主任委员, 对本习题集内容进行了严格终审。《眼科学习题集》的编写旨在为我国眼科医师晋升高级职称提供考前复习和培训的参考资料, 同时为进一步提高眼科医师的临床诊疗水平发挥作用。

习题集内容紧扣高级卫生专业技术资格考试大纲(眼科学专业), 以临床常见病、多发病为主, 设有单选题、多选题及案例分析题 3 种题型, 附有案例题解析及模拟试卷, 可帮助考生熟悉考试题型和场景。习题集内容密切结合眼科临床, 除了满足考生应试需求外, 还能够帮助临床眼科医师锻炼、提高临床思维和处理疑难病症的能力, 最终让更多患者获益。

《眼科学习题集》已由人民卫生出版社正式出版, 以纸质载体配网络学习卡的形式发行。为配合人机对话的高级职称考试形式, 考生可以在线答题练习, 仿真考试场景进行模拟考试演练及自我评估; 各级医院及科室亦可通过线上系统, 随机组题, 进行业务训练及考评。

订购咨询电话: 010-87555381

官方微信服务平台: 慧生医学网

高级卫生专业技术资格考试辅导用书编委会