

黄斑明目胶囊对 MNU 诱导大鼠视网膜光感受器细胞损伤的防护作用

王延东, 王炜

(1. 中山大学中山眼科中心, 广东广州 510060) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641)

摘要: 本文探讨了黄斑明目胶囊(含桑椹、菊花、酵母、胡萝卜素、党参、白术、苦茯苓、薏苡仁、丹参, 中山眼科中心制)对 MNU 诱导的大鼠视网膜光感受器细胞变性动物模型的防护作用。将鼠龄为 43 d 的♀性 SD 大鼠 33 只随机分为 3 组。黄斑明目胶囊组 ($n=10$) 以黄斑明目胶囊溶解后灌胃, 正常对照组 ($n=10$) 和模型对照组 ($n=10$) 以等量蒸馏水灌胃, bid, 连续 7 d。给药 7 d 后, 黄斑明目胶囊组和模型对照组大鼠予 MNU $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip; 正常对照组注射等量生理盐水。观察 MNU 处理后 12、24、48、72 h 各组大鼠视网膜电图 a 波及 b 波的变化, 并于 MNU 作用后 7 d 处死大鼠, 取眼球测定视网膜全层及外核层厚度。结果表明正常对照组大鼠不同时间点视网膜电图 (ERG) a 波及 b 波的振幅差异无统计学意义 ($P>0.05$); 模型对照组在 MNU 处理后 ERG a 波及 b 波的振幅均呈持续性、进行性下降, 黄斑明目胶囊可明显抑制 ERG a 波及 b 波振幅的降低 ($P<0.05$)。眼病理结果, 黄斑明目胶囊组与模型对照组比较, MNU 诱导的大鼠视网膜光感受器细胞损伤明显减轻 ($P<0.05$)。

关键词: 黄斑明目胶囊; 光感受器细胞; N-甲基-N-亚硝脲; 视网膜变性

文章编号: 1673-9078(2011)1-22-25

Protective Effects of Huangbanmingmu Capsule on Retinal Photoreceptor Damage of Rats Induced by MNU

WANG Yan-dong, WANG Wei

(1. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: To approach the protective effects of Huangbanmingmu capsule on retinal photoreceptor damage of rats induced by N-Methyl-N-nitrosourea (MNU), 43-day-old female SD rats were randomly divided into control group, model control group and Huangbanmingmu Capsule group. Huangbanmingmu capsule was intragastrically administrated into rats of Capsule group twice one day for continuous 7 days. For Control group and model group, equal water was used. SD rats in 7 days after treatment received a single injection of $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MNU in model group and Huangbanmingmu Capsule group, ip; while control group was given equal normal saline. Change of a wave and b wave of electroretinogram (ERG) were observed in 12, 24, 48, 72 hours after MNU injection. The rats were killed in 7 days after MNU treatment. Retinal full-thickness and outer nuclear layer thickness were determined. Results showed that the difference of the average amplitude of ERG a-wave and b-wave was not significant at different time in control group ($P>0.05$). And the average amplitude of ERG a-wave and b-wave gradually decreased after MNU treatment in model group. Huangbanmingmu capsule could evidently inhibit lose of a-wave and b-wave, $P<0.05$. Ocular pathology showed that the retinal photoreceptor damage of rats induced by MNU was obviously relieved in Huangbanmingmu Capsule group, compared with model control group ($P<0.05$).

Key words: huangbanmingmu capsule; photoreceptor; N-methyl-N-nitrosourea; retinal degeneration

视网膜变性疾病如年龄相关性黄斑变性、视网膜

收稿日期: 2010-09-12

基金项目: 广东省科技计划项目 (2007A020100001-4); 广东省中医药局基金项目 (2009165)

作者简介: 王延东(1977-), 男, 主管药师, 主要研究方向为眼科药学

通讯作者: 王炜 (1971-), 女, 博士, 主要研究方向为食品营养

色素变性等是目前主要的致盲性眼底疾病, 此类疾病发生机制复杂。研究表明, 视网膜光感受器细胞凋亡是视网膜变性的共同特征^[1-2]。因此, 如何抑制光感受器细胞凋亡、保护光感受器细胞成为近年来人们针对此类疾病研究的热点。食物治疗黄斑变性具有很大优势, 现代医学没有特效的治疗方法, 由于食物独特

的药理作用,对于慢性反复性的变性,疗效很好,有利于保护视细胞,稳定和提高视力。黄斑明目胶囊由桑椹、菊花、酵母、胡萝卜素、党参、白术、苦茯苓、薏苡仁、丹参等组成,对N-甲基-N-亚硝脲(N-methyl-N-nitrosourea, MNU)诱导的视网膜变性大鼠灌胃给药,通过记录视网膜电图(electroretinogram, ERG)的潜伏期和振幅,测定视网膜全层及外核层厚度,旨在探讨黄斑明目胶囊对视网膜光感受器细胞损伤的防护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

MNU, Sigma公司产品,避光-20℃保存。临用前,用生理盐水配制至所需质量浓度。黄斑明目胶囊(中山大学中山眼科中心制剂室提供,批号:20090318)。Neuropack-II型电生理仪(日本光电公司),刺激系统为美国LKC公司Grass PS-22光刺激器和全视野刺激球,德国徕卡手动转轮切片机,日本Olympas生物显微镜。

1.2 动物

鼠龄为43 d的健康清洁级♀性SD大鼠30只,由广东省医用动物实验中心提供,饲养于本中心实验动物中心,许可证号为:SYXK(粤)2005-0058,SPF饲养条件,温度(22±2)℃,循环光照(光照12 h,黑暗12 h)。

1.3 实验步骤

所有大鼠均于实验前12 h禁食,可自由饮水。大鼠随机分为正常对照组、模型对照组和黄斑明目胶囊组,每组10只。黄斑明目胶囊组予黄斑明目胶囊1.3 g·kg⁻¹(由于成人的常用剂量为25 g·d⁻¹,体质量按照60 kg计算,药物剂量按照与人体质量换算,大鼠与人之间换算系数为6.25,则大鼠用药量:6.25×25 g/60kg=2.6 g·kg⁻¹),溶解于2 mL蒸馏水中,ig, bid;模型对照组和正常对照组给予蒸馏水2 mL,ig, bid。给药7 d后,模型对照组和黄斑明目胶囊组分别按体质量予MNU 40 mg·kg⁻¹[5],ip;正常对照组给予等量生理盐水,ip。实验期间每天观察所有动物一般情况及体质量变化。各组分别于12、24、48、72 h行右眼闪光ERG检查。在MNU作用后7 d处死动物,取眼球,测量周边视网膜总厚度和外视网膜厚度。

1.4 ERG的检测

采用Neuropack-II型电生理仪进行检测,刺激条件: I_g单次白光刺激,通频带为:1~1000 Hz。动物检查前暗适应2 h,10%水合氯醛(3 mL·kg⁻¹,ip)麻醉,0.5%托吡卡胺滴眼液点眼散大瞳孔,头部固定,测量

眼安放自制银丝环状电极,电极尽量与角膜产生最大接触,避免产生尖端接触,电极线固定,参考电极置于舌头,接地电极置于尾部皮下组织,所有操作均在微弱的红灯下暗室内进行,检查前后用氯霉素滴眼液点眼,未检查眼用不透光黑布遮盖避光[6]。每个时间点至少测量3次,间歇期间点0.9%氯化钠注射液防止发生暴露性角膜炎,室温维持在20~25℃。记录a波潜伏期,b波潜伏期,a波振幅,b波振幅。

1.5 视网膜厚度的形态学分析

在MNU作用后7 d处死动物,取眼球。10%甲醛液固定过夜,在与视轴和视神经平行的视网膜中心切开、取材,做病理切片。测量周边视网膜(两侧睫状体约400 μm)的总厚度(从内界膜到色素上皮层)和外视网膜厚度(外颗粒层和光感受细胞层)。分析时于400倍镜下,在HE染色片中利用SPOT-Basic软件分析系统测定视网膜全层及外核层厚度[7]。

1.6 统计学分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用SPSS 10.0统计软件,组内用配对t检验,组间用单因素方差分析,P<0.05认为差异有统计学意义,P<0.01认为差异有高度统计学意义。

2 结果

2.1 黄斑明目胶囊对MNU诱导的大鼠视网膜光感受器细胞损伤ERG潜伏期的影响

由表1可知,模型对照组和黄斑明目胶囊组不同时间点与正常对照组比较,a波潜伏期和b波潜伏期均明显缩短(P<0.05、0.01),各组a波潜伏期和b波潜伏期在第3天缩短较为明显。黄斑明目胶囊组和模型对照组比较,a波潜伏期和b波潜伏期无明显差异(P>0.05)。结果表明,黄斑明目胶囊对MNU所致的大鼠视网膜外核层光感受器细胞损伤的ERG a波潜伏期和b波潜伏期无明显影响。

2.2 黄斑明目胶囊对MNU诱导的大鼠视网膜光感受器细胞损伤ERG振幅的影响

由表2可知,正常对照组大鼠不同时间点视网膜电图a波和b波振幅差异无明显差异(P>0.05)。模型对照组和黄斑明目胶囊组不同时间点与正常对照组比较,a波振幅和b波振幅均明显下降(P<0.05、0.01);黄斑明目胶囊组各时间点的a波振幅和b波振幅均明显高于模型对照组(P<0.05、0.01)。各组a波振幅和b波振幅在第3天降低较为明显。黄斑明目胶囊组不同时间点的a波振幅和b波振幅仍低于正常对照组。结果表明,黄斑明目胶囊对MNU所致的大鼠视网膜外核层光感受器细胞损

伤的ERG a波振幅和b波振幅的降低,有一定程度的阻抑作用。

表1 黄斑明目胶囊对MNU诱导的大鼠视网膜光感受器细胞损伤ERG潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 1 Effects of Huangbanmingmu capsule on ERG latent period of rats retinal photoreceptor damage induced by MNU

组别		不同时间点的 ERG 潜伏期/ms			
		12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	a 波	17.22±2.31	17.23±2.54	17.38±2.05	17.55±1.99
	b 波	75.77±6.22	75.26±5.94	76.55±6.09	73.55±5.06
模型对照组	a 波	11.25±5.97*	6.32±4.65**	5.69±2.66**	3.33±3.05**
	b 波	40.22±9.87*	28.69±14.55**	19.55±9.86**	13.65±14.51**
黄斑明目胶囊组	a 波	14.56±7.24*	11.53±9.64**	8.57±6.40**	8.37±7.10**
	b 波	51.62±12.50*	44.24±18.55**	37.50±12.22**	27.55±12.54**

注: 与正常对照组比较: *P<0.05; **P<0.01。

表2 黄斑明目胶囊对MNU诱导的大鼠视网膜光感受器细胞损伤ERG振幅的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 2 Effects of Huangbanmingmu Capsule on ERG amplitude of rats retinal photoreceptor damage induced by MNU

组别		MNU 处理后不同时间点 a 波和 b 波振幅/ μV			
		12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	a 波	104.01±8.55	100.05±9.53	99.20±11.72	102.82±11.16
	b 波	200.67±20.21	194.38±17.71	195.69±18.68	196.77±17.22
模型对照组	a 波	45.60±9.68**	28.83±9.70**	18.50±8.56**	14.63±7.58**
	b 波	96.28±15.31*	71.24±15.11**	51.52±12.54**	32.90±7.61**
黄斑明目颗粒组	a 波	75.20±8.26#	60.86±9.28##	52.11±8.15###	43.15±7.29###
	b 波	167.61±17.30#	146.25±11.63##	127.67±14.49###	113.74±13.33###

注: 与正常对照组比较: *P<0.05, **P<0.01; 与模型对照组比较: #P<0.05, ##P<0.01。

2.3 黄斑明目胶囊对 MNU 作用 7 d 后 SD 大鼠视网膜厚度的影响

经 MNU 作用 7 d 后, 模型组的周边视网膜和中心视网膜的厚度明显变薄, 尤其是外颗粒层和光感受细胞层, 几乎完全消失。给予黄斑明目胶囊 14 d 后, 周边视网膜内的光感受细胞数明显增加, 视网膜总厚度和外视网膜厚度均有所增加。结果见表 3。

表3 各组周边视网膜总厚度和外视网膜厚度

Table 3 Retinal full-thickness and outer nuclear layer thickness

组别	眼数	视网膜总厚度/ μm	外视网膜厚度/ μm
正常对照组	11	79±3	41±2
模型对照组	11	33±2*	3±2*
黄斑明目胶囊组	11	60±3#	22±2#

注: 与正常对照组比较: *P<0.01; 与模型对照组比较: #P<0.01。

3 讨论

MNU 是亚硝基化合物中亚硝酰胺类, 是强有力的致畸、致突变和诱癌剂, 可选择性地诱导视网膜感光细胞凋亡, 引起的大鼠视网膜变性模型和人类视网膜色素变性有一定的相似之处^[8]。现已证实, 单次剂

量腹腔注射 MNU 可特异性导致视网膜光感受器细胞的损伤和死亡, 该模型是用于实验研究较为理想的视网膜变性动物模型, 而采用 40 mg·kg⁻¹ 的 MNU 进行腹腔注射对大鼠损害较重, 是引起大鼠视网膜外核层光感受器细胞达到最大损害的最低剂量, 也是引起大鼠视网膜电图 a 波振幅和 b 波振幅最大下降的初始剂量, 该模型非常适用于观察药物对视网膜光感受器细胞损伤的阻抑作用和机制研究^[5,9]。

视网膜电图(ERG)是判断视网膜功能可靠且灵敏的客观指标。ERG 的 a 波反应视网膜光感受器细胞的电活动, b 波集中反应了视网膜双极细胞和 Müller 细胞的电活动, 另外, 视网膜各层, 特别是颗粒细胞层所有细胞(水平细胞、双极细胞、无长突细胞等)都可能参与 b 波的形成^[6]。因此, 用 ERG 来监测视网膜变性疾病的视锥和视杆细胞功能的异常与否及其严重程度, 有助于早期正确的诊断和评价患者视功能预后。在原发性视网膜变性, ERG 异常远早于典型的眼底改变。

本实验研究发现: 正常对照组的大鼠 ERG 波形清晰, a 波和 b 波振幅正常, 不同时间点没有显著性差异; 而 MNU 处理后 ERG a 波和 b 波振幅明显降低,

损伤时间越长降低越明显;黄斑明目胶囊组在给予黄斑明目胶囊灌胃给药后,ERG a波和b波的振幅均明显高于模型对照组^[10-11]。而且眼病理结果也发现,黄斑明目胶囊组与模型对照组比较,给予黄斑明目胶囊后,MNU诱导的大鼠视网膜光感受器细胞损伤明显减轻($P < 0.05$)。说明黄斑明目胶囊能有效抑制大鼠视网膜光感受器细胞的损伤,延缓病变的进展,对MNU诱导的大鼠视网膜变性有早期拮抗效应,促进MNU诱导的大鼠视网膜光感受器细胞损伤的功能恢复。

参考文献

- [1] Kalloniatis M, Fletcher E L. Retinitis pigmentosa: understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options [J]. Clin Exp Optom, 2004, 87(2): 65
- [2] Ishiba Y, Higashide T, Mori N, et al. Targeted inactivation of synaptic HRG4 (UNC119) causes dysfunction in the distal photoreceptor and slow retinal degeneration, revealing a new function [J]. Exp Eye Res, 2007, 84(3): 473
- [3] 曹明芳,金威尔,刘安,等.中医药治疗渗出性年龄相关性黄斑变性疗效分析[J].中国中医眼科杂志,2006,16(1):12
- [4] 任京力,杨锦南,付信远.大鼠视网膜变性中药保护作用的实验研究[J].眼科新进展,2005,25(3):209
- [5] 邓新国,林晓峰,高杨,等.灵芝孢子油对N-甲基-N-亚硝脲诱导大鼠视网膜光感受器细胞损伤的影响[J].中草药,2009,40(3):415
- [6] 吴乐正,吴德正.临床视觉电生理[M].北京:科学技术出版社,1999
- [7] 杨锦南,胡世兴,林少春,等.葛根素和灯盏花素对大鼠视网膜变性的保护作用.中国中医眼科杂志,2003,13(4):188-191
- [8] Yoshizawa K, Tsubura A. Characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals and application for the therapy of human retinitis pigmentosa [J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2005, 109(6): 327
- [9] 孟晶,翼飞,陈剑,等.N-甲基-N-亚硝脲诱导的视网膜变性大鼠模型的形态学和功能改变[J].暨南大学学报(医学版),2006,27(4):557
- [10] 钟超,吴晖,赖富饶,等.壳聚糖亚铁离子配合物的羟丙基化研究.现代食品科技,2010,26(8):784-788
- [11] 张伟,丘泰球,等.超声强化水蒸汽蒸馏法提取天然右旋龙脑.现代食品科技,2010,26(8):814-836