

白蒺藜皂苷对慢性高眼压兔视网膜神经节细胞的保护作用

李 诺¹, 黄丽娜², 曾 平², 刘 军²

作者单位:¹(430061)中国湖北省武汉市,湖北中医学院;
²(518001)中国广东省深圳市眼科医院

作者简介:李诺,毕业于湖北中医学院,硕士研究生,研究方向:
中西医结合治疗青光眼、白内障。

通讯作者:李诺. linuo0419@163.com

收稿日期:2010-02-08 修回日期:2010-02-16

Protective effect of gross saponins from tribulus terrestris L on retinal ganglion cells in rabbits with chronic high intraocular pressure

Nuo Li¹, Li-Na Huang², Ping Zeng², Jun Liu²

¹Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China; ²Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518001, Guangdong Province, China

Correspondence to: Nuo Li. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China. linuo0419@163.com

Received: 2010-02-08 Accepted: 2010-02-16

Abstract

• **AIM:** To study the protective effect of gross saponins from tribulus terrestris L (GSTT) and Erigeron Breviscapus (Vant.) Hand-Mazz (EBHM) on retinal ganglion cells (RGCs) in rabbits of chronic high intraocular pressure (HIOP) mode 1.

• **METHODS:** Twenty-four rabbits were randomly divided into control group, HIOP group, EBHM treated group, GSTT treated group. The HIOP models were made by injected 20g/L methylcellulose into anterior chamber in rabbits of HIOP group and two treated groups. The rabbits in two treated groups were treated with EBHM and GSTT extract every day, 4.5mg/kg and 5mg/kg respectively. When the HIOP lasted for four weeks, killing rabbits, removal of the eye, electron microscopy of RGCs were done.

• **RESULTS:** After modeling in each group were elevated intraocular pressure, ultrastructure of RGCs have obvious damage under electron microscope for HIOP group in relation to the two treatment groups.

• **CONCLUSION:** GSTT and EBHM have a protective effect on RGCs in rabbits with chronic high intraocular pressure.

• **KEYWORDS:** chronic high intraocular pressure; rabbit; Erigeron Breviscapus (Vant.) Hand-Mazz; gross saponins from tribulus terrestris L; retinal ganglion cell; ultrastructure

Li N, Huang LN, Zeng P, et al. Protective effect of gross saponins

from tribulus terrestris L on retinal ganglion cells in rabbits with chronic high intraocular pressure. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):459-461

摘要

目的:观察白蒺藜皂苷(gross saponins from tribulus terrestris L, GSTT)及灯盏细辛注射液[Erigeron Breviscapus (Vant.) Hand-Mazz, EBHM]对慢性高眼压模型兔视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的保护作用。

方法:健康新西兰白兔24只,随机分为对照组、高眼压组、EBHM治疗组和GSTT治疗组,高眼压组和EBHM治疗组及GSTT治疗组的兔眼前房内注射20g/L甲基纤维素制成慢性高眼压模型,EBHM治疗组的兔每日耳缘iv EBHM注射液4.5mg/kg, GSTT治疗组的兔每日耳缘iv GSTT注射液5mg/kg,高眼压持续4wk时,处死实验兔,摘取眼球,做RGCs电镜检查。

结果:造模后各组眼压均升高,电镜下高眼压组相对于GSTT治疗组及EBHM注射液治疗组,RGCs超微结构有明显损伤。

结论: GSTT及EBHM注射液对慢性高眼压兔RGCs均具有保护作用。

关键词:慢性高眼压;兔;灯盏细辛注射液;白蒺藜皂苷;视网膜神经节细胞;超微结构

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.018

李诺,黄丽娜,曾平,等.白蒺藜皂苷对慢性高眼压兔视网膜神经节细胞的保护作用.国际眼科杂志2010;10(3):459-461

0 引言

白蒺藜(Tribulus terrestris L)为蒺藜科蒺藜属植物,别名刺蒺藜、硬蒺藜,其果实、花及根在我国有悠久的用药历史。其果实始载于《神农本草经》,列为上品。具平肝解郁,活血祛风,明目,止痒的功效,为历版药典所收载。蒺藜的花、苗、根,也有药用记载^[1]。蒺藜化学成分的研究始于20世纪60年代,迄今已证实蒺藜主要含有皂苷类、黄酮类、生物碱、多糖类等化合物,其它尚含甾醇类、氨基酸类、萜类、脂肪酸、无机盐等成分^[2]。蒺藜皂苷(gross saponins from tribulus terrestris L, GSTT)是从白蒺藜地上全草中提制的有效成分之一。现已证实, GSTT具有降低血压、降血脂、舒张血管、抗血小板聚集、抗缺氧和保护离体心脏缺氧再给氧损伤等作用。青光眼系多种因素引起的以进行性视神经损害为特征的主要致盲眼病之一。目前对青光眼视神经损害的确切发病机制不十分清楚,但无论何种机制,其最终的结局均是视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的凋亡,因此防止或延迟对RGCs的损害,有效保护视神经,已成为21世纪青光眼研究的方向和热点。我们将GSTT用于慢性高眼压兔眼模型,通过观

察 RGCs 在电子显微镜下的改变,探讨 GSTT 对慢性高血压兔 RGCs 的保护作用,以期为青光眼 RGCs 的保护提供新药。

1 材料和方法

1.1 材料 体质量 1.8~2.5kg 健康新西兰白兔 24 只,10~12 月龄,雌雄各半,由广东省医学动物实验中心提供。用裂隙灯显微镜、直接眼底镜检查眼前节及眼底无明显异常;外眼正常,结膜无充血,角膜清亮,房水清亮,虹膜淡粉色,放射状纹理清晰可见,瞳孔圆,晶状体正位,后节(-);以 10g/L 丁卡因滴眼液表面麻醉后, Schiøtz 眼压计连续测量眼压 3d, 1 次/d, 眼压均 < 21mmHg (1mmHg = 0.133kPa) 的动物方可采用。白蒺藜皂苷 (GSTT) 粉剂由吉林敖东洮南药业提供。灯盏细辛注射液 [Erigeron Breviscapus (Vant.) Hand-Mazz, EBHM] 由云南生物谷药业有限公司提供。

1.2 方法 将 24 只健康新西兰白兔随机分为正常对照组 (A 组), 高血压模型空白组 (B 组) 和高血压模型 EBHM 治疗组 (C 组), 高血压模型 GSTT 治疗组 (D 组)。每组 6 兔 12 眼。选用对眼压无明显影响的 30g/L 戊巴比妥钠 1mL/kg 肌注麻醉,眼部表面麻醉后,9:00 位沿角巩膜缘内 1mm 抽出前房房水 0.2mL 后,高血压模型眼等量注入 20g/L 甲基纤维素,兔眼注射 20g/L 甲基纤维素后,外眼正常,睑结膜轻中度充血,球结膜混合充血,部分结膜血管充血、迂曲、扩张,角膜轻度水肿,雾化,前房加深,房水基本清亮,虹膜色淡,纹理不清,阶段性虹膜萎缩,瞳孔扩大,晶状体在位。如在实验周期中发现眼压有所下降,即予以模型眼前房补注甲基纤维素 0.1mL,使其观察期内眼压均维持在 32~39mmHg^[3]。维持高血压状态达 4wk。对照眼注入生理盐水,均在 30min 后测量眼压 (表 1)。正常对照组正常喂养,不做任何处理。高血压模型组正常喂养,制成高血压模型。EBHM 治疗组正常喂养,制成高血压模型,将给药组动物称质量,每日耳缘静脉给药 4.5mg/kg (约等于成人用量),1 次/d。GSTT 治疗组正常喂养,制成高血压模型,将给药组动物称质量, GSTT 粉剂溶于生理盐水中,每日耳缘静脉给药 5mg/kg (约等于成人用量),1 次/d,连续用药 4wk。所有实验兔于观察 28d 后处死。眼球 12:00 位缝线标记后,立即完整摘除 (包括球后视神经 2mm),沿标记缝线-视神经连线对剖眼球,去除角膜、虹膜、晶状体及玻璃体,将剩余眼球壁用 25g/L 戊二醛和 10g/L 锇酸双固定,用于透射电镜观察^[4]。采用 Schiøtz 眼压计,分别于造模前 3d,造模后 30min,造模后每日测量眼压并记录,共计 1mo^[5]。测前校正眼压计,以避免人为误差。将所取标本用 25g/L 戊二醛固定 36h 后,修整成 1mm×1mm×1mm 的组织块,10g/L 锇酸后固定 2h。平衡盐溶液漂洗 2 次,乙醇梯度脱水后,再经梯度丙酮脱水,环氧树脂包埋。最后行透射电镜观察,以了解视网膜超微结构改变。

统计学分析:使用 SPSS 13.0 软件包统计分析,实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

透射电镜下超微结构单纯正常眼压组 RGC 胞质内散在大量细胞器,以线粒体和核糖体为主,散在粗面内质网,线粒体嵴完好 (图 1A)。高血压组核周细胞器数量减少,胞质水肿,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 (图 1B)。EBHM 治疗组及 GSTT 治疗组,胞质内细胞器数量略为减少,散在

表 1 各组造模前后眼压比较 ($\bar{x} \pm s$, mmHg, n = 12)

分组	造模前	造模后 30min	造模后 2wk	造模后 4wk
A 组	12.6±1.1	33.4±3.0	12.4±1.5	12.9±1.2
B 组	11.6±1.1	37.6±2.8	38.4±2.9	38.9±2.4
C 组	13.0±1.6	38.1±2.4	38.1±2.7	38.4±2.9
D 组	13.4±1.8	37.3±2.4	38.7±3.1	37.8±2.7

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 1C, D)。

3 讨论

青光眼是一组以眼压升高为主证并视神经凹陷性萎缩和视野缺损为共同特征的眼病。在中医属“五风内障”范畴,是由于风火上攻头目,或气郁生火上逆及痰火上攻造成阴阳偏盛、气机失调等诸种原因,导致气血失和、经脉不利,目中玄府闭塞,气滞血瘀,神水瘀积而发病^[6]。中药治疗青光眼主要以清火、解郁、活血、利水、祛风,开窍,后期以滋补肝肾、舒肝解郁等法为主。与现代医学认为的由于机械性损伤、缺血性损伤其导致的氧化损伤等因素使视网膜 RGC 不断死亡及神经轴突不断减少基本一致。蒺藜,为蒺藜科 (Zygophyllaceae) 蒺藜属 (tribulus) 植物蒺藜 (tribulus terrestris L) 的干燥成熟果实,性微温,味辛苦,有小毒,有平肝解郁、活血祛风、明目、止痒的功效,用于治疗头痛眩晕、胸胁胀痛、乳闭乳痛、目赤翳障、风疹瘙痒等症。《本经》:“蒺藜味苦温,久服明目,轻身”。叶天士等注释:“刺蒺藜久服而肝木攸畅,肝开窍于目,故目明”。叶长华等^[7]发现,刺蒺藜单体成分白蒺藜醇甙 (tribulus fruit alcohol glycoside, TFAG) 具有促进体外培养鼠视 RGC 存活及具有类似神经营养因子的作用。灯盏细辛,辛温解表,可祛风除湿止痛、活血化瘀、改善眼部血流。有效成分吡喃酮类物质有增加血流量、降低血管阻力、对抗二磷酸腺苷引起的血小板聚集等作用。现代医学认为这类物质对青光眼视神经损伤有明显保护作用^[8]。朱益华^[9]报告,EBHM 注射液具有改善大鼠实验性高血压后视神经轴突运输的作用。

青光眼是一种以视神经损害为特征的致盲眼病,至今有关青光眼的发生机制、病理变化、发展过程以及有效的治疗手段等许多问题仍在研究探讨之中,因此对青光眼的研究需进行广泛的动物实验。慢性高血压模型相对于急性高血压模型来说,对青光眼的发病机制、病理变化以及治疗的研究更有意义。甲基纤维素兔眼前房内注入是目前普遍使用及公认的引起兔慢性高血压的有效方法。甲基纤维素法是利用不溶的甲基纤维素沉积在前房,阻塞房水流出通道造成高血压。国内 1994 年贾莉君等^[10]首先报道前房内连续注入 10g/L 甲基纤维素建立兔眼慢性高血压模型。

本实验中高血压组和 EBHM 治疗组及 GSTT 治疗组在注入 20g/L 甲基纤维素后,约 30min 后眼压升高超过 30mmHg,用单因素方差分析比较了三组动物 4wk 内的眼压值,各组间没有显著性差异,说明 EBHM 及 GSTT 没有降低眼压的作用。高血压持续 4wk 后,高血压组核周细胞器数量减少,胞质水肿,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。EBHM 治疗组及 GSTT 治疗组,胞质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。本结果显示, GSTT 及 EBHM

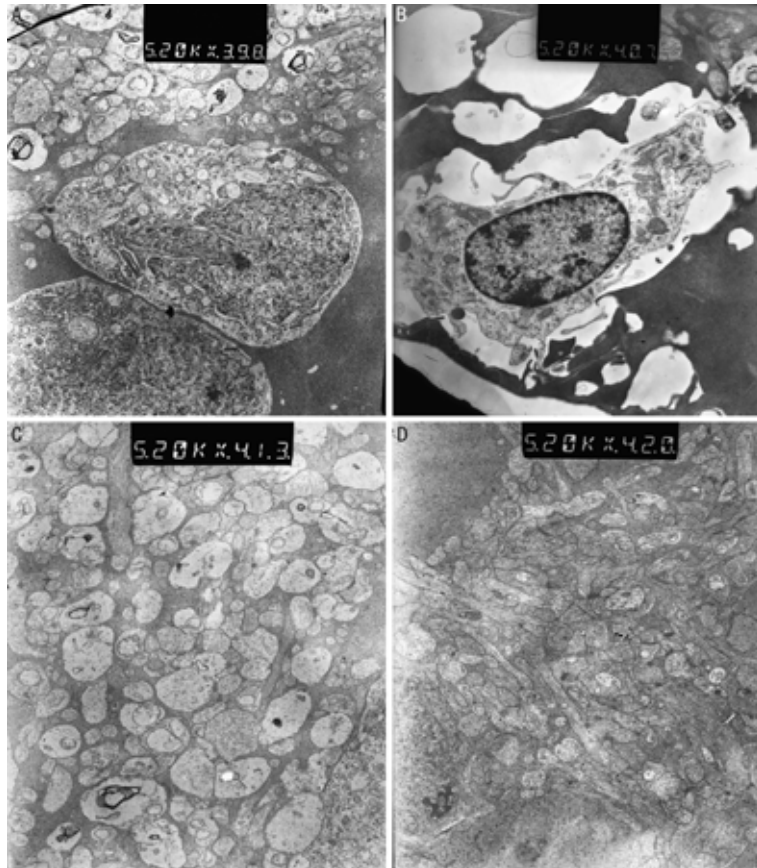


图1 兔慢性高眼压视网膜神经节细胞超微结构变化(TEM×10) A:正常;B:高眼压组;C:EBHM 治疗组;D:GSTT 治疗组。

对慢性高眼压兔 RGCs 均具有保护作用。我们为青光眼 RGCs 的保护提供一种新的中药,以往的实验研究中对活血化瘀类中药研究较多,我们从祛风药里寻找对视网膜 RGC 有保护作用的中药,具有较好的临床开发和应用前景。但是本实验样本量不足,观察时间较短,其长期的疗效仍不能做出肯定判断,其给药最佳时间、最佳剂量,是否需增加给药次数及最佳给药间隔时间等,都有待于进一步研究。

参考文献

1 张健,李俊,莫琪,等. 蒺藜提取物的药理研究进展. 中医药研究 1998;14(6):56-57
2 钱本余. 蒺藜研究概述. 中成药 1990;12(1):34
3 宋宗明,崔守信,张德秀. 川芎嗪对兔眼高压下视网膜神经节细胞和双极细胞损伤的保护作用. 第四军医大学学报 2001;22(6):

514-517
4 李志勇,张果忠,张广庆. 针刺对家兔慢性高眼压及视网膜超微结构的影响. 中国中医眼科杂志 2002;8(12):135-138
5 王强,魏厚仁,樊郑军. 家兔眼压测量的标定问题. 眼科研究 1994;12(4):224-226
6 彭清华,李建超. 青光安治疗抗青光眼术后患者临床研究. 湖南中医学院学报 2004;24(2):36-39
7 叶长华,蒋幼芹. 白蒺藜醇酞对混合培养鼠视网膜神经节细胞的作用. 视光学杂志 2001;3(3):148-151
8 蒋幼芹. 眼压已控制的晚期青光眼治疗的探讨. 眼科研究 1991;9(4):229-232
9 朱益华. 灯盏细辛注射液对大鼠实验高眼压视神经轴浆运输的影响. 中华眼科杂志 2000;36(4):289-291
10 贾莉君,蒋幼芹,吴振中,等. 前房内连续注入1%甲基纤维素建立兔眼慢性高眼压模型. 眼科新进展 1994;14(2):1-5