

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.18.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 18-0024-05

球周注射尼莫地平对兔慢性高眼压致 视网膜神经节细胞凋亡的干预作用

黄帅, 张新跃, 张雅馨, 刘颖, 李琰, 周亚男, 王林洪

(华北理工大学附属医院 眼科, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 观察眼球周注射尼莫地平对慢性高眼压兔视网膜神经节细胞凋亡的干预作用。**方法** 选用健康新西兰白兔 30 只, 随机分为 A、B、C、D、E 5 组, 每组 6 只。A 组为正常组, 其余各组均行复方卡波姆复制慢性高眼压模型, B 组注射生理盐水, C、D、E 组分别球周注射低 (0.125 mg)、中 (0.250 mg)、高 (0.500 mg) 剂量尼莫地平 (NMD) 注射液。第 2 周处死动物取视网膜组织行免疫组化、TUNEL 法检测及 HE 形态学观察, 比较各组间的差异。**结果** B 淋巴细胞瘤 2 基因 (*Bcl-2*) 在 B、C 组呈低表达, 在 D、E 两组呈高表达, D、E 两组均高于 B、C 两组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。B 淋巴细胞瘤 2 基因相关蛋白 X (*Bax*) 在 B、C 组呈高表达, 随 NMD 剂量增高阳性细胞表达量降低, D、E 组呈低表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TUNEL 检测, 在 B、C 组呈高表达, 在 D、E 组呈低表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 尼莫地平注射液球周注射对兔慢性高眼压视网膜神经节细胞凋亡有积极的保护作用。

关键词: 慢性高眼压; 球周注射; 视网膜神经节细胞; 尼莫地平

中图分类号: R774

文献标识码: A

Intervention effect of Nimodipine injected around eyeball of rabbit on retinal ganglion cell apoptosis caused by chronic intraocular hypertension

Shuai Huang, Xin-yue Zhang, Ya-xin Zhang, Ying Liu, Yan Li, Ya-nan Zhou, Lin-hong Wang
(Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North China University of Science and
Technology, Tangshan city 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the intervention effect of Nimodipine injected around eyeball of rabbit on retinal ganglion cell apoptosis caused by chronic intraocular hypertension. **Methods** Thirty healthy New-Zealand albino rabbits were randomly assigned to 5 groups. Group A is blank control group and the rest of the groups (B, C, D and E) were chronic intraocular hypertension (CIH) ones which were induced by compound Carbomer. Group B were injected by Saline Injection (SI). Group C, D and E were injected by Nimodipine with low (0.125 mg), medium (0.250 mg) and high (0.500 mg) dose, respectively. The models were executed at the 2nd week. The retinal tissues in the groups were detected by immunochemistry, TUNEL and HE to identify the differences. **Result** The expression level of *Bcl-2* in group D and E were significantly higher than that in group B and C ($P < 0.05$). The expression of *Bax* in group B and C had a relatively high expression, while the expression of positive cells was decreased with the increase of NMD dose. The expression levels of *Bax* in group D and E were lower than those in group B and C ($P < 0.05$). With TUNEL method, the apoptosis expression in group D and E were significantly lower than that in group B and C ($P < 0.05$). **Conclusion** Nimodipine injected around eyeball can protect the retinal ganglion cells caused by

收稿日期: 2017-08-22

[通信作者] 王林洪, E-mail: 15383055898@126.com

chronic intraocular hypertension.

Keyword: chronic intraocular hypertension; peribulbar injection; retinal ganglion cell; Nimodipine

青光眼是继白内障之后的第二大致盲性疾病, 研究显示全球青光眼患病量在 2040 年将达 11 180 万^[1]。青光眼的视神经损害主要表现在视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 的凋亡, 多种研究显示青光眼的发病类似于老年痴呆、帕金森等中枢退行疾病, 首先病变可能起始于中脑上丘, 进一步发展至 RGCs, 最终引起 1 个投射单位的凋亡^[2-3]。因此, 刘光旭等^[4]认为青光眼属于中枢神经系统疾病, 在降眼压的同时, 对视神经的保护成为治疗重点。众所周知, 钙通道阻滞剂 (calcium channel blockers, CCB) 作为中枢神经保护药物应用临床已有多多年^[5], 与其他 CCBs 相比尼莫地平 (nimodipine, NMD) 具有高脂溶性, 可以轻易跨过头-脑屏障, 对中枢神经系统具有较高亲和力, 能阻断钙离子内流, 保护神经元^[5]。但相关研究显示, 尼莫地平口服给药生物利用率相对较低, 只有 4% ~ 13%^[6]。在神经外科, 较多学者通过大量动物实验及毒理实验证实局部给药是安全有效的, 支持 NMD 通过蛛网膜下腔^[7]、脑室^[8]及皮下注射等^[9]途径给药, 认为局部给药即可避免全身给药的血压等并发症, 也可在局部达到有效的药物浓度, 提高治疗效果^[7-9]。本研究拟通过尼莫地平注射液球周注射的方法, 进一步评估尼莫地平局部高浓度对慢性高血压兔视网膜损伤的保护作用, 及局部注射对眼外肌等眶内组织的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康新西兰白兔 30 只 (由华北理工大学动物实验中心提供), 体重 2 ~ 2.5 kg, 雄性, 普通级实验动物, 外眼及眼底无异常。适用性喂养 1 周, 随机分成 5 组, 每组 6 只, 右眼为实验眼, 实验前 3 d 开始点抗生素滴眼液, 每日 3 次。

1.2 主要实验材料

卡波姆 940 (美国诺誉), Tono-pen AVIA 眼压计 (美国 Mentor 公司), B 淋巴细胞瘤 2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤 2 基因相关蛋白 X (BCL2-Associated X, Bax) 兔单克隆抗体 / 免疫组织化学 (简称免疫组化) 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), TUNEL 试剂盒 (美国 ROCHE 药业), 尼莫地平注射液 (尼膜同, 德国拜耳医疗)。

1.3 方 法

1.3.1 制备卡波姆溶液 卡波姆及地塞米松注射液溶入无菌注射用水中, 配置成 3 g/L 复方卡波姆 (含地塞米松 0.25 g/L)。

1.3.2 复制慢性青光眼模型 A 组为正常组不做任何处理。其余放入兔盒内限制自由活动, 双眼点表面麻醉药 2 次, 间隔 3 min。眼压计连续测量 3 次, 取平均值, 计兔基础眼压。采用“隧道”法复制慢性青光眼模型即: 5 ml 注射器针头, 自右眼 11 点方向角膜缘后 1 mm 处进针, 角度约 15°, 角膜缘层间走行约 1 ~ 2 mm 自透明角膜进入前房, 待针头尾端可见前房液时, 退出 5 ml 注射器针头, 泪道冲洗针头自穿刺口进入前房瞳孔区, 缓慢推注 0.2 ml 卡波姆溶液。术眼滴入 1 滴洛美沙星眼用凝胶。注入后逐渐出现球结膜充血, 角膜雾状混浊, 术后 3 h 测量眼压, 均超过 2.93 kPa, 可见前房轻度加深, 瞳孔竖椭圆形。第 1 周每日测量眼压, 以后每 3 ~ 4 天测量眼压 1 次。慢性高血压模型眼压维持在 2.93 ~ 6.67 kPa。对眼压低于 2.93 kPa 者给予补充卡波姆溶液 0.1 ml。B 组为对照组, 给予生理盐水 1 ml 球周注射, C、D、E 为 NMD 低、中、高剂量组, 分别球周注射 NMD 注射液 0.25 ml (0.125 mg) + 生理盐水 0.75 ml 和 0.5 ml (0.25 mg) + 生理盐水 0.5 ml 及 1 ml (0.5 mg), 每日 1 次。

1.4 标本的制备

每组于治疗 2 周时处死动物, 100 g/L 水合氯醛耳缘静脉麻醉, 右眼点丙美卡因滴眼液 2 次, 迅速取材, 分离眼外肌, 摘取眼球, 40 g/L 多聚甲醛中固定 30 min, 自角膜缘剪去角膜, 去除晶状体, 继续固定 24 h 以上; 将眼球壁自视乳头处纵向切开, 于距视乳头旁 0.3 cm 以外, 沿视神经水平和垂直方向各取约 1.0 cm × 0.5 cm 的视网膜组织。均放入包埋盒中, 经脱水、透明、石蜡包埋、切片, 分别行 HE 染色、TUNEL 检测及免疫组化检测 Bcl-2、Bax 表达量。

应用相关试剂盒说明操作, 放置显微镜下计数, 计数方法: 每只眼球随机选取 2 个 200 倍视野, 计数阳性细胞数及总细胞数, 计算阳性表达率。阳性表达率 = 阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%。视网膜神经节细胞凋亡指数按照 TUNEL 试剂盒说明操作, 凋亡细胞的细胞核呈棕色或棕褐色, 放置显微镜下计数, 计数方法同上, 计算凋亡指数, 凋亡指数 = 阳性细胞数 /

细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所得数据行满足方差分析条件 (正态分布 / 方差齐性) 的检验。多组间采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Bonfereoni 校正的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

复方卡波姆溶液注入兔前房, 兔眼压逐渐升高, 在 3 h 及达到 2.93 kPa, 约于第 3 天达到峰值, 可以维持在 2.93 kPa 以上 2 周。剔除眼压超过 50 mmHg、角膜扩张等未完成实验者。

2.1 各组视网膜病理切片情况

A 组 (正常组) 可见视网膜各层次清晰, 细胞核排列紧密。B 组 (对照组) 可见视网膜水肿, 神经节

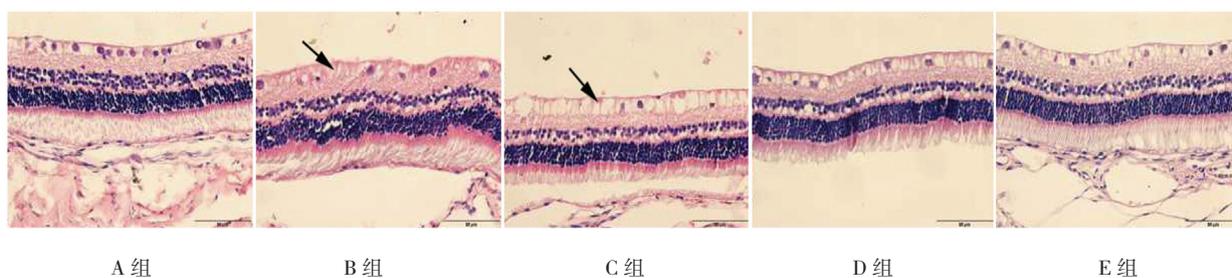
细胞数量减少, 内外核层排列疏松、紊乱。治疗组 C、D、E 组上述改变较 B 组减轻, 以 D、E 组损伤最轻。见图 1。

2.2 Bcl-2 蛋白表达

视网膜可见 Bcl-2 表达于细胞浆, 染色呈黄色或棕黄色, 主要位于 RGCs 层及内核层。正常视网膜无 Bcl-2 阳性表达 A 组 (见图 2A)。在 B、C 组 (见图 2B、2C) 呈低表达, 在 D、E 两组 (见图 2D、2E) 呈高表达。

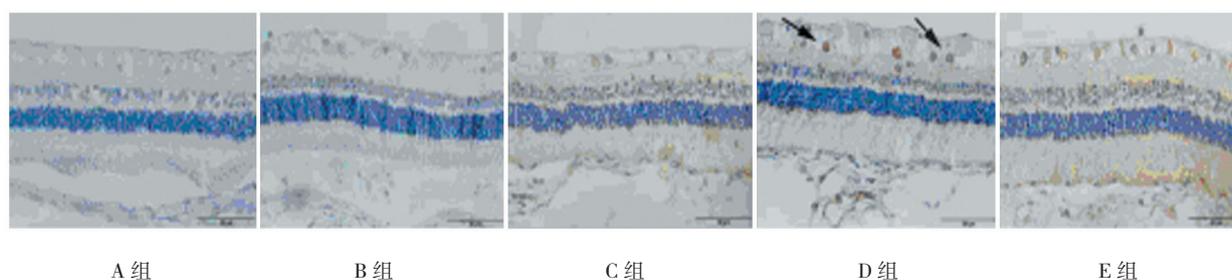
2.3 Bax 蛋白表达

Bax 阳性表达于细胞浆, 颜色呈黄色或棕黄色。Bax 在 A 组 (见图 3A) 正常视网膜无 Bax 阳性表达。在 B、C 两组 (见图 3B、3C) 呈高表达, 随着 NMD 剂量增高阳性细胞表达量降低, 在 D、E 两组 (见图 3D、3E) 呈低表达, 随着 NMD 剂量的增加, Bax 表达量逐渐减缓。



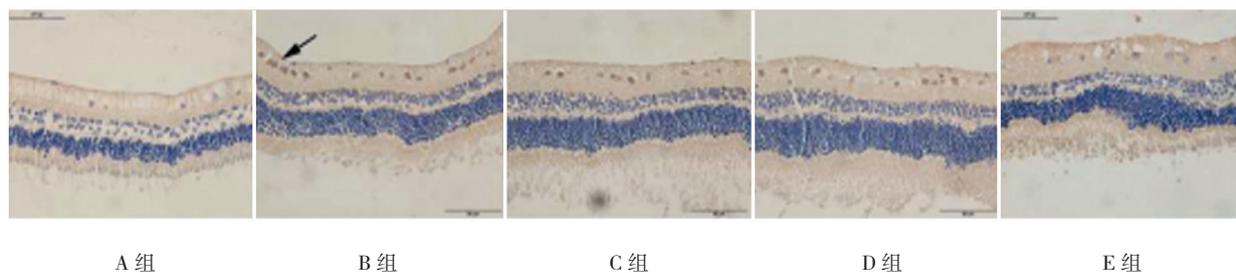
B 组可见 RGCs 层水肿 (箭头)

图 1 各组视网膜病理切片 (HE $\times 50 \mu\text{m}$)



D、E 两组呈高表达 (箭头)

图 2 各组视网膜 Bcl-2 表达 ($50 \mu\text{m}$)



阳性细胞表达于细胞浆, 呈棕黄色 (箭头)

图 3 各组视网膜 Bax 表达 ($50 \mu\text{m}$)

2.4 视网膜神经细胞凋亡指数

按照 TUNEL 试剂盒说明书操作, 阳性细胞主要表达于细胞核, 染色呈棕色或棕褐色。在正常视网膜无阳性细胞表达 A 组 (见图 4A)。在 B、C 两组 (见

图 4B、4C) 呈高表达, 在 D、E 组 (见图 4D、4E) 呈低表达。NMD 可降低细胞凋亡 TUNEL 检测的表达量, 在 NMD 0.25 mg 时达最低表达点, 结果与 Bax 表达量相符。见附表。

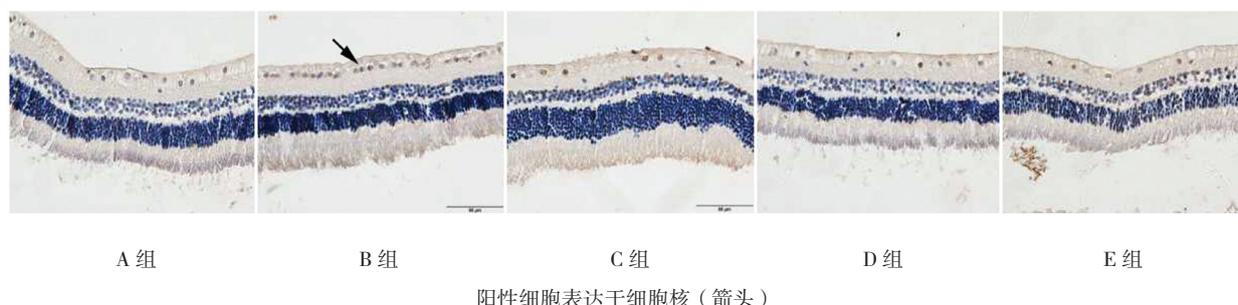


图 4 各组视网膜神经节细胞凋亡 (50 μ m)

附表 视网膜凋亡相关因子及神经细胞凋亡指数比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2/%	Bax/%	Bcl-2/Bax	神经细胞凋亡指数 /%
A 组	0.227 \pm 0.411	0.606 \pm 0.707	0.333 \pm 0.188	0.303 \pm 0.447
B 组	8.257 \pm 1.253	18.560 \pm 1.955	0.451 \pm 0.093	17.954 \pm 1.556
C 组	9.545 \pm 1.424 ¹⁾	18.905 \pm 1.781	0.521 \pm 0.085	16.893 \pm 1.368 ¹⁾
D 组	18.257 \pm 1.422 ¹⁾²⁾	11.075 \pm 1.127 ¹⁾²⁾	1.833 \pm 0.257 ¹⁾²⁾	9.696 \pm 0.975 ¹⁾²⁾
E 组	19.621 \pm 1.837 ¹⁾²⁾³⁾	9.015 \pm 0.905 ¹⁾²⁾	2.196 \pm 0.296 ¹⁾²⁾³⁾	8.939 \pm 0.936 ¹⁾²⁾
F 值	413.244	350.815	77.669	481.958
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与 B 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 C 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 D 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

尼莫地平属于第 2 代二氢吡啶类钙拮抗剂, 具有脂溶性高, 溶解度低, 可以透过血-脑屏障、胎盘屏障等生理屏障^[9], 已在临床广泛应用。1998 年 PILTZ^[10] 最早应用于正常眼压性青光眼 (normal tension glaucoma, NTG) 患者 100 例, 通过对视野范围和视敏度及视力的观察, 表明尼莫地平对 NTG 患者具有一定疗效。随后相似的研究进一步观察 NTG 的视网膜血液循环, 表明 NMD 改善了 NTG 患者的视网膜血液循环^[11]。大量的实验室也证实 NMD 具有保护神经节细胞, 减少凋亡发生^[12]。但临床的病例对照性研究中似乎并不是那么理想, 因为口服给药需经过消化道吸收^[7], 其口服生物利用度低。NMD 对神经外科蛛网膜下腔出血早期给药可以减少脑血管痉挛的发生。HÄNGGI^[8] 通过制备尼莫地平-聚乙二醇 (Nimodipine-poly (DL-lactide-co-glycolide), PLGA) 悬液, 将极低剂量的

NMD-PLGA 注入小鼠和狗脑池内, 分别检测 29 d 血清和脑脊液, 取得持久的 NMD 浓度, 也通过对 SAH 模型狗的治疗, 降低了脑血管痉挛的发生。该缓释制剂减少静脉给药所引起的低血压等并发症的发生, 也避免口服给药较低的生物利用度^[8]。球周注射给药是眼科常用的并熟练掌握的给药途径, 可以在眼内及局部达到有效、稳定的药物浓度, 是口服给药难以达到的, 也是静脉给药难以保障的。本实验显示, 尼莫地平注射液球周注射, 具有较好的 RGCs 保护作用。

细胞凋亡是凋亡基因控制下发生的, 研究最广泛的 Bcl-2 是抑制凋亡基因, Bcl-2/Bax 比值对细胞凋亡发生与否起决定性作用。本研究显示, Bcl-2 在各组间有差异, NMD 可以上调 Bcl-2 因子的表达, 而保护 RGCs 的凋亡。Bax 表达量在 B、C 两组呈高表达, 而在 D、E 两组呈低表达, D、E 两组与 B、C 两组比较有差异, 证实 NMD 可以通过下调 Bax 表达抑制凋亡。在 3 种

剂量之间,低剂量与中、高剂量比较有差异,而中高剂量比较无差异,该点与 TUNEL 检测结果与此相似,即 D、E 两组阳性细胞表达量 $P > 0.05$,提示 NMD 在 0.25 mg 时便可发挥有效的保护作用,增加剂量并不能抑制凋亡的发生,可能的机制是 NMD 抑制钙离子内流的能力和细胞外钙离子内流的趋向力存在一定浓度差,当大于这一差值时钙离子内流难以抑制。本实验未给予更高浓度的剂量,该剂量相关性的上限并未显示。一旦凋亡机制启动,凋亡将可能不可避免的发生。

实验显示,采用 NMD 注射液球旁注射对慢性青光眼兔 RGCs 具有保护作用,可能通过抑制钙离子内流上调 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达。NMD 球周注射还可以通过增加眶内段视神经周围的药物浓度,通过轴浆运输到达中脑上丘。

青光眼的神经保护是从视路性疾病的角度出发,目前研究认为 CCBs 在中枢神经系统无论是外伤性及退行性变是有积极意义的^[12]。本实验 NMD 球周注射向临床治疗提供新的思路,局部高浓度的 NMD 是神经保护的重要条件,但多次注射仍会受到限制,未来缓释系统的研发将会降低注射的次数,这将会使 NMD 眼局部给药成为理想的给药途径。

参 考 文 献:

- [1] THAM Y C, LI X, WONG T Y, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(11): 2081-2090.
- [2] CRISH S D, SAPPINGTON R M, INMAN D M, et al. Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(11): 5196-5201.
- [3] DOOZANDEH A, YAZDANI S. Neuroprotection in glaucoma[J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2016, 11(2): 209-220.
- [4] 刘旭阳,陈晓明,王宁利.再论青光眼是否属于中枢神经系统疾病[J].*中华眼科杂志*, 2010, 46(12): 1062-1065.
- [5] MARIA D N, ABD-ELGAWAD A H, SOLIMAN O A, et al. Nimodipine ophthalmic formulations for management of glaucoma[J]. *Pharm Res*, 2017, 34(4): 809-824.
- [6] YANG D, ZHU J, ZHENG Y, et al. Preparation, characterization, and pharmacokinetics of sterically stabilized nimodipine-containing liposomes[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2006, 32(2): 219-227.
- [7] SEKER F, HESSER J, NEUMAIER-PROBST E, et al. Dose-response relationship of locally applied nimodipine in an ex vivo model of cerebral vasospasm[J]. *Neuroradiology*, 2013, 55(1): 71-76.
- [8] HÄNGGI D, ETMINAN N, STEIGER H J, et al. A site-specific, sustained-release drug delivery system for aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurotherapeutics*, 2016, 13(2): 439-449.
- [9] LASLO A M, EASTWOOD J D, URQUHART B, et al. Subcutaneous administration of nimodipine improves bioavailability in rabbits[J]. *J Neurosci Methods*, 2004, 139(2): 195-201.
- [10] PILTZ J R, BOSE S, LANCHONEY D. The effect of nimodipine, a centrally active calcium antagonist, on visual function and muscular blood flow in patients with normal-tension glaucoma and control subjects[J]. *J Glaucoma*, 1998, 7(5): 336-342.
- [11] GANEKAL S, DORAIRAJ S, JHANJI V, et al. Effect of topical calcium channel blockers on intraocular pressure in steroid-induced glaucoma[J]. *J Curr Glaucoma Pract*, 2014, 8(1): 15-19.
- [12] LI R. Hot spots and future directions of research on the neuroprotective effects of nimodipine[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(21): 1933-1938.

(王荣兵 编辑)