

血府逐瘀汤对外伤性视神经损伤模型大鼠 Nogo-A、GAP-43 偶联蛋白组表达的影响

徐 照¹ 曾 琳¹ 王凤洲¹ 丁伟森²

(1.贵阳中医学院,贵州贵阳 550002; 2.浙江中医药大学,浙江杭州 310000)

摘 要 目的:运用血府逐瘀汤干预外伤性视神经损伤(TON)大鼠模型,观测不同时间节点视网膜神经节细胞(RGCs)数量和形态,视网膜轴突生长抑制因子-A(Nogo-A)、生长相关性蛋白-43(GAP-43)偶联蛋白组的表达变化,从而探讨该方治疗 TON 的作用机制。方法:健康 SD 大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组、中药组、神经营养因子组和中西医结合组,分别治疗 4、7、14、21、28d 后处死,HE 染色观察视网膜神经节细胞(RGCs)变化,免疫组化法观察视网膜 Nogo-A 和 GAP-43 蛋白表达情况。结果:治疗 7d 后,神经营养因子组、中西医结合大鼠视网膜节细胞数量均明显高于模型组($P<0.01$);治疗 7、14、28d,中药组大鼠视网膜节细胞数量明显高于模型组($P<0.01$)。神经营养因子组、中西医结合组大鼠治疗 7d 后,中药组大鼠治疗 14d 后,视网膜 Nogo-A 表达均较模型组明显降低($P<0.01$),GAP-43 表达均较模型组明显升高($P<0.01$)。结论:血府逐瘀汤原方对外伤性视神经损伤大鼠有治疗作用,能够增强损伤视网膜组织中 GAP-43 蛋白的表达,抑制损伤相关因子 Nogo-A 表达,提高 RGCs 的存活率。

关键词 血府逐瘀汤 外伤性视神经损伤 Nogo-A 蛋白 GAP-43 蛋白 视网膜神经节细胞
中图分类号 R774.605 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)09-0079-04

外伤性视神经损伤(Traumatic optic neuropathy, TON)系指因各种外力因素,特别是暴力、瞬间高能量冲击伤害颅、面、眼球等各处后引起的视神经损伤,可导致各种视力障碍。本病病情进展较快,并常伴有各种并发症,预后多不良。轴突生长抑制因子-A(Nogo-A)广泛分布于中枢神经系统的少突胶质细胞和部分神经元细胞中,是阻碍中枢神经系统损伤后神经元存活和再生的重要因素之一。生长相关性蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)是位于高等脊椎动物神经元细胞膜上的一种特异性磷酸蛋白,分布广泛,是目前公认的神经元细胞损伤后再生的标志性蛋白。

血府逐瘀汤源自清代王清任《医林改错》^[1]一书,具有活血化瘀、行气止痛之功效。TON 以瘀血积聚于头部为特点,无论是外伤所致的机械性损伤,还是继发性水肿、炎症反应、缺血性损伤以及轴浆运输障碍等都可归属于中医学“瘀阻”范畴。目前运用血府逐瘀汤治疗 TON 的报道并不多见,本研究拟探索血府逐瘀汤对 TON 模型大鼠的干预作用,并观察其对大鼠视网膜 Nogo-A、GAP-43 蛋白表达的影响,现将结果报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康 SD 大鼠共 208 只,3 月龄,清洁级,雌雄各半,体重(250±20)g。入选先行术前检查:双侧眼球活动正常,眼外部分无缺损,瞳孔无畸形、等圆等大,对光反射正常。实验动物由广州医科大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(粤)2012-0002。

1.2 实验药物 血府逐瘀汤,《医林改错》原方中药组成为:桃仁四钱,红花三钱,当归三钱,生地三钱,川芎一钱半,赤芍二钱,牛膝三钱,桔梗一钱半,柴胡一钱,枳壳二钱,甘草二钱。按古代计量单位换算以 1 钱约 3.33g 计^[2],药液目标浓度为 1.4g/mL^[3],以蒸馏法浓缩,电子天平测定药液质量,确定药液目标体积。中药材均采购于贵州省贵阳市济仁堂药业股份有限公司,经贵阳中医学院第一附属医院中药室鉴定为道地药材。

单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液,购自北京四环制药有限公司(20111102)。注射剂量:0.36mg/100g(计算公式:人用剂量×K,人用剂量=40g/d, K=0.018^[3])。

1.3 实验试剂 兔抗鼠 GAP-43 多克隆抗体(一

基金项目:贵州省科技厅资助项目(黔科合中药字[2011]LKZ7039 号)

抗),bs-0199R,博奥森生物技术有限公司;兔抗鼠 Nogo-A 多克隆抗体(一抗),bs-0007R,博奥森生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS液),0.01mol/L,北京中衫金桥生物技术有限公司;抗原修复液(枸橼酸盐缓冲液),武汉博士德生物科技公司;山羊抗兔(二抗)试剂盒,SP-0023,博奥森生物技术有限公司;Triton-X-100,T8200,Solarbio 公司;OCT 包埋剂,德国 Leica(莱卡)公司;DAB 显色剂,AR1022,博士德生物工程有限公司;无水蔗糖,20110416,天津协和昊鹏色谱科技有限公司。

1.4 主要仪器 眼科用手术显微镜系统,SOM 2000D 型,江苏苏州市六六视觉有限公司;冰冻切片机,CM1950,德国 Leica(莱卡)公司;奥林巴斯相差光学显微镜及图像成像分析系统,OLYMPUS;恒温水浴箱,DH3620B,天津市泰斯特电器有限公司。

2 实验方法

2.1 分组 实验大鼠按随机、双盲、对照分为空白对照组、假手术组、模型组、中药组、神经营养因子组、中西医结合组,后 5 组再分为 4d、7d、14d、21d、28d 5 个亚组。其中空白对照组 8 只,其余各组每组 40 只,每个亚组 8 只,按时间节段分别治疗 4、7、14、21、28d 后处死。

2.2 造模 术前检查完毕后以大鼠左眼作为手术眼制作 TON 模型,选用 Vincent Tropepe 等^[4]的大鼠视神经横断伤造模法,保留视神经髓鞘。造模成功标准:左侧术眼瞳孔散大,直接对光反射消失,无术眼外凸,巩膜、结膜观察无出血,无睑闭不全,无术后器官功能衰竭^[5]。208 只大鼠先分组后进行造模,共成功造模 196 只。中药 4 天组、中药 7 天组、中西医结合 4 天组、中西医结合 7 天组均因造模原因,实际各存活 7 只。假手术组处理方法:仅暴露而不离断视神经。

2.3 治疗 中药组大鼠每日灌胃中药汤剂,灌胃剂量为每日 4mL/200g 体重(生药量:5.6g),分 2 次灌胃^[3],采用单人操作法进行^[6]。神经营养因子组大鼠在手术麻醉清醒前(术后 1h 内)予单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液肌肉注射,后每日注射 1 次,部位为术鼠双侧大腿外侧轮流,注意防止继发感染和肌肉萎缩。中西医结合组大鼠中药灌胃和神经营养因子注射同时进行。空白对照组、假手术组、模型组予等量生理盐水灌胃,假手术组、模型组及各治疗组均按每个亚组时间,分别治疗 4、7、14、21、28d 后处死,空白对照组干预 4d 后处死。

2.4 取材与观察指标 取材前大鼠禁食 12h,称重后 10%水合氯醛深度麻醉,迅速取出眼球,制作冰

冻切片[室温下 40%多聚甲醛溶液固定 2h,30%蔗糖溶液 4℃冰箱中脱水(过夜),冰冻切片机包埋组织进行修片、切片,多聚赖氨酸防脱磨砂载玻片贴片,37℃恒温箱烤片后过夜备用]。采用 HE 染色观察视网膜神经节细胞变化和免疫组化法检测各组大鼠视网膜中 Nogo-A/GAP-43 偶联蛋白表达情况。大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)计数:每个标本取一张切片,显微镜下(10×40)随机选取 5 个不重复的高倍视野,计 RGCs 数量,取均值^[7]。Image-pro plus 6.0 软件对眼球视网膜 Nogo-A、GAP-43 阳性细胞进行计数;计数及统计方法同大鼠视网膜 RGCs 计数。

2.5 统计学方法 实验数据采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,以($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用方差分析,多组间比较采用 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 视网膜神经节细胞观察 空白对照组大鼠视网膜各层次结构清楚,节细胞呈单层排列,分层清晰,胞体较大。假手术组大鼠 RGCs 排列稍显稀疏,与空白对照组比较无明显差异。模型组大鼠视网膜各层均不同程度变薄,随时间延长细胞数量逐渐减少。各治疗组 RGCs 数量均比模型组增多。治疗 7d 时,神经营养因子组视网膜节细胞数量开始明显增高,但细胞排列显散乱,治疗第 14、21、28 天视网膜节细胞数量比较无明显差异,细胞排列较为整齐。治疗 7d 内,中药组节细胞数量与模型组比较无明显差异,治疗第 14 天节细胞数量开始增多。中西医结合组治疗 7d 后,RGCs 细胞数量明显增多,细胞散乱程度得到部分恢复,排列较为整齐。见图 1、表 1。

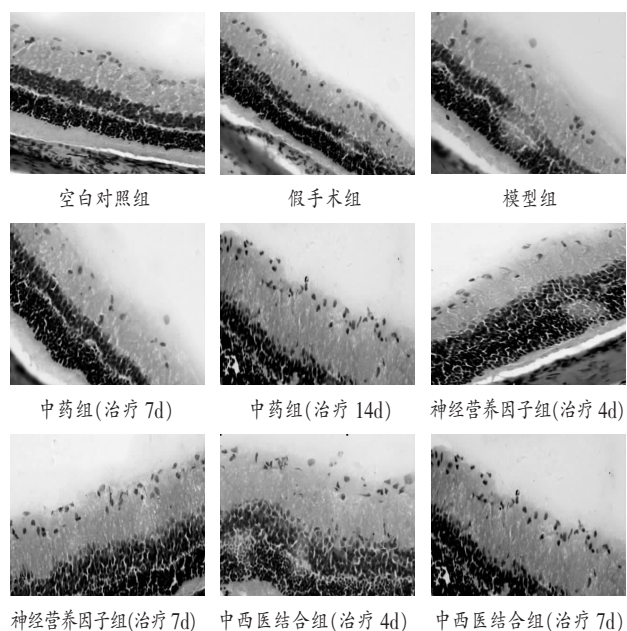


图 1 各组大鼠视网膜神经节细胞(HE,10×40)

表1 各组大鼠治疗各时期视网膜神经节细胞计数($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗4d	治疗7d	治疗14d	治疗21d	治疗28d
空白对照组	27.68±4.56				
假手术组	27.68±5.54 [△]	27.25±3.75 [△]	28.05±4.60 [△]	25.93±5.50 [△]	27.78±5.35 [△]
模型组	17.00±3.13 [■]	15.50±1.70 [■]	14.03±2.39 [■]	19.65±3.86 [■]	20.95±2.36 [■]
中药组	15.65±1.02 [■]	16.25±2.59 [■]	20.45±2.34 [■]	21.1±3.92 [■]	19.20±1.88 [■]
神经营养因子组	14.97±1.76 [■]	23.20±1.44 [■]	25.63±1.83 [■]	25.50±1.57 [■]	25.16±1.26 [■]
中西医结合组	14.78±1.66 [■]	23.32±1.34 [■]	26.13±1.53 [■]	26.86±1.37 [■]	26.98±1.06 [■]

注:动物数中药4天组、中药7天组、中西医结合4天组、中西医结合7天组7只,其余各时段组均为8只。与空白对照组比较, $\Delta P>0.05$;与假手术组比较, $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$;与模型组比较, $**P<0.01$;与中药组比较, $\blacksquare P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠治疗各时期视网膜 Nogo-A 蛋白表达阳性细胞计数 见图2、表2。

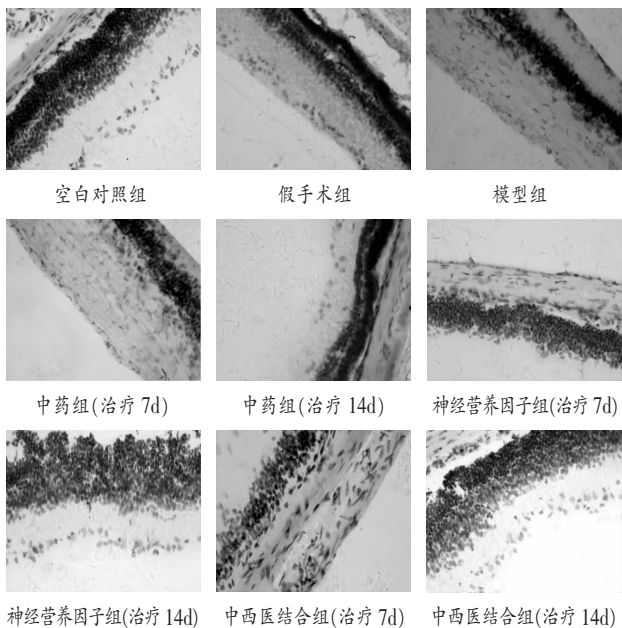


图2 视网膜 Nogo-A 蛋白表达 (HE, 10×40)

表2 各组大鼠治疗各时期视网膜Nogo-A 蛋白表达阳性细胞计数($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗4d	治疗7d	治疗14d	治疗21d	治疗28d
空白对照组	22.50±1.04				
假手术组	22.50±0.89 [△]	22.58±1.54 [△]	22.64±1.65 [△]	22.89±1.46 [△]	22.37±0.93 [△]
模型组	45.21±1.88 [■]	45.02±2.75 [■]	46.58±2.87 [■]	46.91±2.08 [■]	47.92±1.32 [■]
中药组	45.01±1.38 [■]	43.25±2.59 [■]	36.58±1.42 [■]	35.88±2.50 [■]	34.92±1.59 [■]
神经营养因子组	38.25±2.57 [■]	37.05±4.21 [■]	35.25±3.52 [■]	34.98±2.19 [■]	32.94±1.49 [■]
中西医结合组	38.20±2.84 [■]	36.95±4.55 [■]	34.52±3.12 [■]	33.05±2.47 [■]	32.21±2.55 [■]

注:动物数中药4天组、中药7天组、中西医结合4天组、中西医结合7天组7只,其余各时段组均为8只。与空白对照组比较, $\Delta P>0.05$;与假手术组比较, $\#P<0.01$;与模型组比较, $**P<0.01$;与中药组比较, $\blacksquare P<0.05$ 。

3.3 各组大鼠治疗各时期视网膜 GAP-43 阳性细胞计数 见图3、表3。

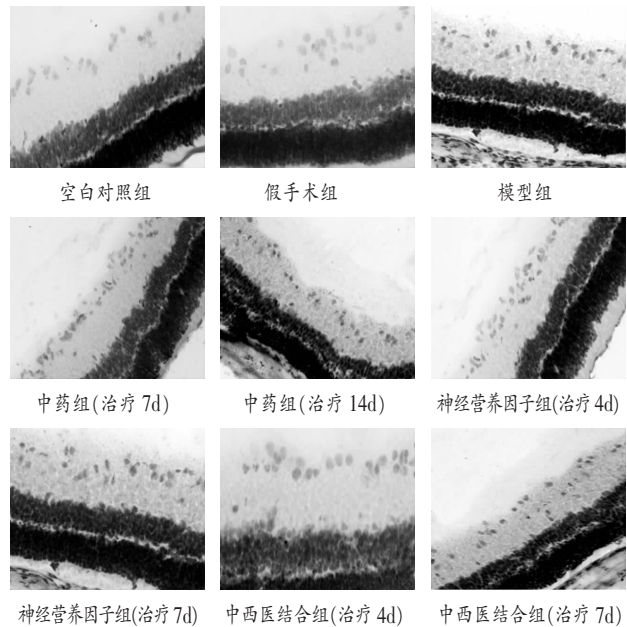


图3 视网膜 GAP-43 蛋白表达 (HE, 10×40)

表3 各组大鼠治疗各时期视网膜 GAP-43 蛋白表达阳性细胞计数($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗4d	治疗7d	治疗14d	治疗21d	治疗28d
空白对照组	19.80±1.07				
假手术组	19.50±0.99 [△]	19.48±1.04 [△]	19.82±1.05 [△]	19.55±1.26 [△]	19.55±0.83 [△]
模型组	33.30±1.98 [■]	34.57±2.85 [■]	27.18±2.97 [■]	23.54±2.18 [■]	16.88±1.30 [■]
中药组	30.80±1.30 [■]	30.80±2.07 [■]	32.01±1.47 [■]	33.88±2.51 [■]	33.92±1.98 [■]
神经营养因子组	26.78±2.97 [■]	39.95±5.05 [■]	44.65±3.72 [■]	42.30±2.59 [■]	42.33±2.49 [■]
中西医结合组	26.88±2.87 [■]	40.05±4.85 [■]	45.25±3.42 [■]	45.88±2.47 [■]	46.08±2.01 [■]

注:动物数中药4天组、中药7天、中西医结合4天组、中西医结合7天组7只,其余各时段组均为8只。与空白组比较, $\Delta P>0.05$;与假手术组比较, $\#P<0.01$;与模型组比较, $**P<0.01$;与中药组比较, $\blacksquare P<0.01$ 。

4 讨论

外伤性视神经损伤是外伤性颅脑损伤中常见和严重的并发症之一,近年来有逐渐增多的趋势。外伤性视神经损伤手术指针明确者,强调主要以手术治疗为主,主张早期手术,积极评估手术时机、适应症、并发症,最大程度减少因为延误最佳手术时间窗所带来的严重后果。在药物治疗方面,采用早期足量应用激素,合并脱水剂、Ca²⁺受体拮抗剂、营养神经药物、血管扩张药物,配合高压氧治疗,可以达到对症支持治疗的目的,对视神经损伤有一定的治疗作用。转基因治疗和氨基酸受体拮抗剂目前尚处于实验室研究阶段。神经生长因子等新药的临床应用近年引起了较大的关注。神经营养因子(neurotrophic factor, NTF)是由靶组织或胶质细胞产生、分泌的一类蛋白质或小分子肽,具有调节神经元发育、存活,促进神经元修复、轴突再生及调节突触可塑性的作用。

轴突生长抑制因子-A(Nogo-A)在视神经损伤

后的轴突胞浆运输障碍中发挥关键抑制作用,妨碍内生微环境重构,是引起 CNS 修复能力减低的主要负性因素^[8]。本实验结果表明,治疗后各治疗组 Nogo-A 蛋白均低于模型组,各治疗组中,神经营养因子组 Nogo-A 蛋白表达低于中药组,中西医结合组 Nogo-A 表达低于神经营养因子组和中药组。说明血府逐瘀汤和神经营养因子均能不同程度抑制 Nogo-A 在 TON 模型大鼠视网膜中的表达,延缓或者抑制髓鞘相关抑制因子的释放,对视神经损伤后再生修复具有保护作用。

GAP-43 与神经系统视网膜发育、神经元轴突胞浆再生及神经元突触重建、突触联系的可塑性均有密切联系^[9],是神经元发育和再生的重要内在因子^[10]。本研究结果表明,空白对照组和假手术组大鼠的视网膜中均有 GAP-43 表达,表明 GAP-43 在高级脊髓动物和成年哺乳动物确有表达。GAP-43 在伤后即开始表达,表明 RGCs 细胞具有一定的修复和再生能力,在伤后第 7 天到达峰值,随着损伤进程发展,GAP-43 的增量不断减少。

本研究结果表明,血府逐瘀汤对外伤性视神经损伤大鼠具有治疗作用,能够增强损伤组织中 GAP-43 蛋白的表达,抑制损伤相关因子 Nogo-A 的表达,提高 RGCs 的存活率。神经营养因子制剂和血府逐瘀汤原方均能在一定程度上促进受损神经细胞的再分化。神经营养因子制剂对于外伤性视神经损伤极期(伤后 4 天内)和早期(7 天前)效果优于血府逐瘀汤。血府逐瘀汤在损伤亚急性期(14 天后)和中后期具有良好的视神经保护作用。中西医结合治疗 TON 疗效优于单纯西药或者单纯血府逐瘀汤治疗。

治疗第 4 日各治疗组视网膜神经节细胞计数、视网膜 GAP-43 蛋白阳性细胞数,治疗第 7 日中药组视网膜 GAP-43 蛋白阳性细胞数均低于模型组;治疗第 21 日,中药组视网膜神经节细胞计数与模型组比较差异无统计学差异。分析出现上述实验结果可能原因如下:(1)视网膜神经节细胞在伤后短时间内具有一定的自我修复能力,而疾病极期(伤后 4 天)运用药物治疗后可能影响了自身细胞应激、免疫应答、微环境重构等。(2)我们观察到第 4 日中药组大鼠球结膜充血较其他治疗组更明显,而血府逐瘀汤中有较多活血化瘀药物,我们考虑这与活血化瘀药物增加了血管通透性,使组织渗透压升高,以及一系列炎症因子释放、炎性细胞浸润等有关,反而一定程度上影响了中药的疗效,提示我们 TON 损伤极期或许不是应用血府逐瘀汤治疗的最佳时机。(3)本研究中各治疗组第 4 日或 7 日视网

膜 GAP-43 蛋白阳性细胞数较模型组减少,可能与损伤极期(伤后 4 天)和早期(7 天)视神经损伤疾病特点相关,具体原因仍有待于进一步的研究。(4)第 21 日,中药组视网膜神经节细胞计数与模型组比较无统计学差异,考虑可能因为实验样本数量偏少或活血化瘀类中药在治疗 TON 的“双面刃”作用有关。目前运用血府逐瘀汤治疗 TON 的动物实验报道较少,基于此方向研究的实验室数据也相对缺少,有待进一步深入研究。

本研究中我们也发现,伤后 14~28d 这个时间区中哪个时间节点是血府逐瘀汤干预治疗的最佳靶点尚不明确。课题组拟在前期研究的基础上进一步从影响视神经损伤修复关键蛋白的相关细胞核心调控通路/信号转导入手,更深入地探索视神经损伤发生和再生修复的可能机制,为血府逐瘀汤治疗 TON 的研究奠定更多良好的实验室基础和提供更充分的临床依据。

参考文献

- [1] 王清任.医林改错[M].北京:人民卫生出版社,2005:8.
- [2] 高学敏.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2007:1.
- [3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:9.
- [4] TROPEPE V.Retinal Stem Cells in the Adult Mammalian Eye[J].Science,2000,287(5460):2032.
- [5] KLINE L B,MORAWETZ R B,SWAID S N.Indirect injury of the optic nerve[J].Neurosurgery,1984,14(6):756.
- [6] 冯雪建,卢占军,高登慧.大鼠灌胃给药方法的研究[J].实验动物科学与管理,2006,23(4):53.
- [7] ROSNER M,CAPLAN M,COHEN S,et al.Dose and temporal parameters in delaying injured optic nerve degeneration by low-energy laser irradiation[J].Lasers Surg Med,1993,13(6):611.
- [8] 耿慧萍,贺翔鸽. Nogo-A/B 蛋白在 RCS 大鼠视网膜色素变性过程中的表达[J].第三军医大学学报,2012,34(10):948.
- [9] 刘晓坤,罗钢,赵平.大鼠外伤性视神经病变后 GAP-43 表达的变化[J].河北医药,2014,36(17):2568.
- [10] 尹丹萍,柳林.视神经损伤后修复与再生的研究进展[J].国际眼科杂志,2013,13(6):1153.

第一作者:徐照(1976—),男,医学硕士,副教授,解剖学专业(经络腧穴形态学方向)。

通讯作者:曾琳,本科学历,副主任医师,硕士研究生导师。1009447259@qq.com

收稿日期:2016-02-09

编辑:吴宁