

倍他洛尔对实验性视网膜缺血再灌注损伤后视神经的保护作用

荣华 艾明 邢怡桥 陈长征 易莲芳 杨安怀

【摘要】 目的 探讨倍他洛尔对实验性视网膜缺血再灌注损伤后视神经的保护作用及其可能的作用机制。方法 采用升高眼内压的方法,制作大鼠实验性视网膜缺血再灌注损伤模型。将 68 只 SD 大鼠随机分为正常对照组(8 只)、0.25%倍他洛尔治疗组(30 只)和生理盐水对照组(30 只)。其中后两组根据再灌注的不同时间各分为 1、3、7 d 组,每组 10 只大鼠。治疗组鼠右眼滴入 0.25%倍他洛尔眼药水,生理盐水对照组鼠右眼滴入生理盐水。观察治疗组和生理盐水对照组及正常对照组鼠视网膜电图(ERG)b 波振幅及光学显微镜、电子显微镜下视网膜结构变化;免疫组织化学法检测神经性一氧化氮合酶(nNOS)的表达,分光光度法测定丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果 从再灌注 1 d 开始,生理盐水对照组 ERG 的 b 波振幅持续下降,病理组织损害逐渐加重,视网膜中 nNOS 阳性表达明显增多,MDA 水平持续升高,SOD 水平持续下降,其差异与正常对照组比较均有统计学意义($P < 0.01$);与生理盐水对照组相比,再灌注各时段倍他洛尔治疗组 ERG 的 b 波振幅明显恢复($P < 0.01$),病理组织损害明显减轻,nNOS 阳性神经元明显减少($P < 0.01$),MDA 含量降低($P < 0.01$),SOD 活性升高($P < 0.01$),其中 nNOS 阳性神经元与正常对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 倍他洛尔可能通过减少细胞内 Ca^{2+} 超载,抑制 NO 的产生和提高抗氧化能力,对大鼠实验性视网膜缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

【关键词】 倍他洛尔/治疗应用; 视网膜/药物作用

中图分类号:R774.1 R453.9 R446

Protective effect of betaxolol on optic nerves after experimental retinal ischemia-reperfusion injury
RONG Hua, AI Ming, XING Yi-qiao, et al. Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: RONG Hua, Email: ronghuawdyxy@21cn.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of betaxolol on optic nerves after experimental retinal ischemia-reperfusion injury. **Methods** Retinal ischemia was induced in SD rats by increasing intraocular pressure through intracameral infusion. Sixty-eight rats were randomly divided into 3 groups: normal control (eight rats), 0.25% betaxolol treatment (thirty rats) and saline control group (thirty rats). The latter two groups were subdivided into group 1 day, 3 and 7 days after reperfusion, respectively, with 10 rats in each group. Betaxolol and normal saline was applied to the right eyes of the rats in the treatment group and to the ones in normal saline control group, respectively. The amplitude of b-wave of electron retinograph (ERG) was observed and the histological and ultrastructural changes were detected by light and electron microscopy. The expression of neural nitrogen oxide synthase (nNOS) was detected by immunohistochemistry. The content of malonyldialdehyde (MDA) and the superoxide dismutase (SOD) activity were measured by spectrophotometer. **Results** Began from the first day after reperfusion, in saline control group, the amplitudes of ERG b-wave reduced continuously, the histopathological damages of retina were aggravating, the expression of nNOS increased, MDA level increased and SOD level decreased persistently, which significantly differed from the normal control group ($P < 0.01$); in contrast to the saline control group, the amplitudes of b-wave of ERG in betaxolol treatment group after reperfusion got right obviously ($P < 0.01$), with alleviated histopathological damages, decreased nNOS positive neurons ($P < 0.01$), decreased MDA content ($P < 0.01$), and increased SOD activity ($P < 0.01$), in which no statistical significance of nNOS positive neurons was found between the treatment group and normal control group ($P > 0.01$). **Conclusion** Betaxolol, by reducing intracellular overfreight of Ca^{2+} , inhibiting production of NO and elevating the ability of anti-oxidation in rat retina, can protect retinal neurons from ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Betaxolol/therapeutic use; Retina/drug effects

作者单位:430060 武汉大学人民医院眼科(荣华,现在上海复旦大学附属金山医院眼科)

通讯作者:荣华,Email:ronghuawdyxy@21cn.com

视网膜血管阻断性疾病、高眼压及影响视网膜血流量的眼科手术等均能造成视神经不同程度的损伤,危害视功能,因而,视神经保护是眼科研究领域的热点之一。倍他洛尔是一种高选择性 β_1 受体阻滞剂,同时具有钙通道阻滞作用,已用于降眼压治疗。有报道倍他洛尔能改善青光眼患者的视野^[1,2]。我们利用前房加压法制造大鼠视网膜缺血再灌注模型,观察倍他洛尔对大鼠视网膜组织形态学和超微结构及视网膜功能变化的影响,并检测视网膜组织中神经性一氧化氮合酶(nNOS)的表达水平及丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性,以探讨大鼠视网膜缺血再灌注损伤后,倍他洛尔对视神经的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

健康成年 SD 大鼠 68 只(武汉大学医学院实验动物中心提供),体重 220~240 g,雌雄不分,饲养在正常昼夜周期的环境中。随机选取 8 只鼠为正常对照组。其余 60 只鼠随机平均分为 0.25%倍他洛尔治疗组和生理盐水对照组;按再灌注时间,每组再分别分为再灌注后 1、3、7 d 组,每组 10 只大鼠,每只鼠右眼为缺血再灌注眼。

1.2 动物模型的建立

采用眼内灌注法^[3],1%戊巴比妥钠按 40 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉大鼠,1%地卡因点眼局部麻醉。以 7 号小儿头皮针刺入右眼前房固定,升高输液瓶高度至与右眼垂直距离 150 cm 处,此高度在眼内形成 110 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)的眼内压。肉眼见眼球结膜苍白,在 +8~+10 D 直接检眼镜下观察,出现眼底血流中断,视网膜苍白发肿,维持 60 min,而后降低输液瓶高度达大鼠右眼水平,拔出针头,可见眼结膜充血,视网膜血液恢复,即为视网膜缺血再灌注损伤的模型建立成功。

1.3 主要试剂和仪器

0.25%倍他洛尔(日本 Alcon 公司),低温冷冻离心机(德国 Heraeus 公司),SOD 和 MDA 分析试剂盒(南京聚力生物医学研究所),兔抗大鼠 nNOS 多克隆抗体及即用性链霉素亲和素过氧化物酶复合物(SABC)免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德生物工程公司),光学显微镜(日本 Olympus 公司),直接检眼镜(苏州医疗器械厂),H-600 电子显微镜(日本日立公司),电生理诊断系统(意大利安倍公司)。

1.4 给药方法

在开始灌注时,治疗组鼠右眼点 0.25%倍他洛尔眼药水,此后每天 2 次(上午 9 至 10 点钟 1 次,晚上 8 至 9 点钟 1 次),分别持续 1、3、7 d。同法予生理盐水对照组鼠右眼点生理盐水。

1.5 观察指标和测定方法

1.5.1 视网膜电图(ERG)的测定 大鼠暗适应 30 min,1%戊巴比妥钠按 40 mg/kg 的剂量腹腔麻醉,0.5%复方托吡卡胺散瞳,固定头部,双眼安放自制的银丝盘状电极,电极尽量与角膜最大面积接触,电极线固定,参考电极置于两眼连线中点皮下,接地电极刺入耳尖皮下(暗红光下执行上述操作)。操作时白光闪耀,反应持续 200 ms,光强度 $10 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$,每个时间点至少测量 3 次,间歇期间点生理盐水,防止发生暴露性角膜炎,室温维持在 22~25℃。记录 b 波振幅与处理前 b 波振幅比值,再用对侧对照眼的比值进行标化得出 b 波恢复率,以消除个体差异和环境等各方面因素影响^[3]。

1.5.2 光学显微镜标本的制作及观察 分别于再灌注后 1、3、7 d 全麻下处死相对应时间点治疗组和生理盐水对照组的实验大鼠,并于再灌注后 7 d 处死正常对照组 10 只大鼠。立即摘除右眼球,每组随机取 1 只眼球,放入自配的固定溶液^[4](纯丙酮 50 ml、冰醋酸 2 ml、甲醛 4 ml、蒸馏水 3 ml)中固定 72 h,每天更换固定液,3 d 后取材。石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察视网膜组织结构并拍照。

1.5.3 电子显微镜标本的制作及观察 将上述所摘除的眼球每组随机取 1 只浸入 2.5%戊二醛溶液中固定 24 h,赤道部剪开,弃去眼前节,取一象限视网膜,切成组织块,磷酸缓冲液冲洗,1%锇酸固定,脱水包埋,切片,醋酸铀液染色,柠檬酸铅液染色,透射电子显微镜下观察视网膜超微结构并拍照。

1.5.4 nNOS 免疫组织化学染色 采用 SABC 法,步骤严格按试剂盒说明书进行,40×10 倍光学显微镜下观察,阳性结果以细胞浆内出现棕黄色片状或颗粒状染色为准。以医学图像分析系统检测 nNOS 的吸光度(A)[旧称光密度(OD)]值。

1.5.5 MDA 含量和 SOD 活性的测定 将上述所摘除眼球的各组剩余眼球置于冰生理盐水中,剪开角膜缘,弃去眼前节及晶状体,外翻眼球壁,解剖显微镜下剥离视网膜。硫代巴比妥酸法测量 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测 SOD 活性,测量方法和步骤严格按试剂盒说明书进行,每次测量时均用新鲜配制液并测定标准管。

1.6 统计学方法

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。组间进行随机成组 t 检验,不同时间点作单因素方差分析并进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性的意义。

2 结果

2.1 ERG 测定结果

正常大鼠双眼 ERG 的 b 波振幅:右眼(160.60 ± 7.23) μV ,左眼(154.80 ± 8.87) μV ,两眼 b 波振幅差异有统计学意义($t = 1.434, P > 0.05$)。治疗组和生理盐水对照组 ERG 的 b 波振幅的恢复率:倍他洛尔治疗组各灌注时间点 b 波恢复率($57.24 \pm 4.54, 73.77 \pm 9.33, 89.23 \pm 6.75$)明显高于生理盐水对照组($32.13 \pm 7.28, 23.91 \pm 2.77, 16.51 \pm 8.38$)($t = 8.28, 14.49, 19.12; P < 0.01$);视网膜缺血再灌注损伤后随着再灌注时间的延长,b 波振幅持续下降:再灌注 7 d 时,b 波恢复明显低于 3 d 和 1 d($t = 7.40, 15.52; P < 0.01$)。经倍他洛尔治疗后,b 波在各灌注时间点都有大幅度提高:7 d 明显高于 3 d 和 1 d($t = 15.46, 31.99; P < 0.01$);3 d 与 1 d 时的 b 波差异有统计学意义($t = 16.53, P < 0.01$)。

2.2 光学显微镜观察结果

正常大鼠视网膜组织结构清晰、完整(图 1)。生理盐水对照组视网膜内层逐渐变薄,神经节细胞明显减少,细胞出现变性。再灌注 7 d,视网膜神经节细胞减少,明显肿胀;内、外核层排列紊乱,细胞减少(图 2)。治疗组损伤明显轻于生理盐水对照组,再灌注 7 d,视网膜神经节细胞排列规整,细胞核大部分存在,个别呈空泡样改变;内核层较生理盐水对照组稠密;外核层、外节结构清晰较完整(图 3)。

2.3 透射电子显微镜观察结果

正常大鼠视网膜神经节细胞,内外核层细胞及视细胞超微结构正常(图 4)。生理盐水对照组视网膜神经节细胞数明显减少,部分神经节细胞严重变性,细胞浆线粒体肿胀,核质肿胀;内、外核层细胞变性,细胞核浓缩,电子密度增加不均匀,细胞变小,细胞间隙增宽(图 5);视细胞内节线粒体明显肿胀,部分空泡化,外节盘膜疏松。倍他洛尔治疗组视网膜超微结构改变较生理盐水对照组明显减轻,多数神经节细胞形态正常,核膜、核仁清楚;少数内、外核层细胞核质肿胀(图 6),视细胞内节线粒体多正常,少数轻微肿胀,外节盘膜多完整。

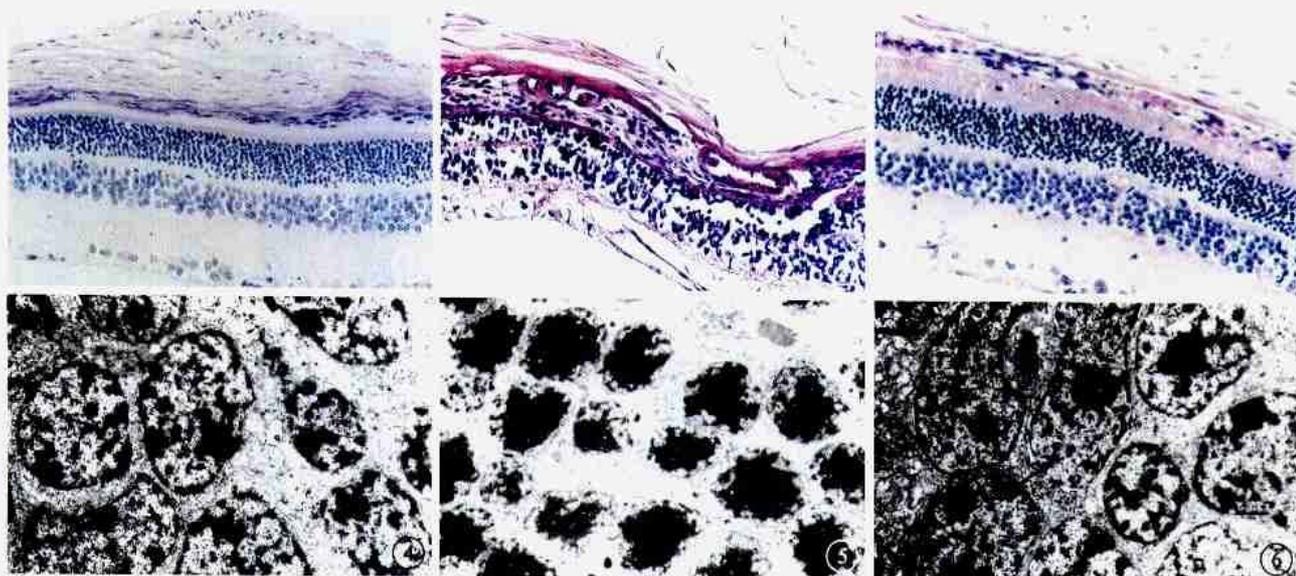


图 1 正常大鼠视网膜光学显微镜像。视网膜组织结构清晰、完整 HE $\times 200$ 图 2 再灌注 7 d 生理盐水对照组视网膜光学显微镜像。视网膜神经节细胞减少,明显肿胀,内、外核层排列紊乱 HE $\times 200$ 图 3 再灌注 7 d 倍他洛尔治疗组视网膜光学显微镜像。视网膜神经节细胞较生理盐水对照组多,水肿减轻。内、外核层较生理盐水对照组稠密、整齐 HE $\times 200$ 图 4 正常大鼠视网膜电子显微镜像。内核层细胞大小统一,核染色质分布均匀 醋酸铀、柠檬酸钴染色 $\times 5000$ 图 5 再灌注 1 d 生理盐水对照组视网膜电子显微镜像。内核层细胞缩小,细胞间隙加宽,核质固缩 醋酸铀、柠檬酸钴染色 $\times 5000$ 图 6 再灌注 1 d 倍他洛尔治疗组视网膜电子显微镜像。少数内核层细胞核质轻度肿胀 醋酸铀、柠檬酸钴染色 $\times 5000$

Fig. 1 Photograph of light microscope of normal retina. Clear and intact retinal structure. HE $\times 200$ Fig. 2 Photograph of light microscope of retina in normal saline control group 7 days after reperfusion. Swelled retinal ganglion cells (RGCs) with decreased cell number and disorganized-arranged inner and outer nuclear layer. HE $\times 200$ Fig. 3 Photograph of light microscope of betaxolol treatment group 7 days after reperfusion. More RGCs, alleviated edema, and denser and more regular inner and outer nuclear layer. HE $\times 200$ Fig. 4 Photograph of electron microscope of normal retina. Cells with uniform morphology and symmetrically distributed nuclear chromatin in inner nuclear layer. Uranyl acetate and lead citrate staining $\times 5000$ Fig. 5 Photograph of electron microscope of retina in normal saline control group 1 day after reperfusion. Shrunken cells in inner nuclear layer, widened interstitial space and pyknosis of nuclear chromatin. Uranyl acetate and lead citrate staining $\times 5000$ Fig. 6 Photograph of electron microscope of retina in betaxolol treatment group 1 day after reperfusion. Light swelling of nuclear chromatin of a few inner-nuclear-layer cells. Uranyl acetate and lead citrate staining $\times 5000$

2.4 nNOS 免疫组织化学 A 值结果

正常视网膜内核层和节细胞层有少量 nNOS 表达(0.638 ± 0.042)。再灌注 1 d 时,生理盐水对照组 nNOS 的表达开始增高,3 d 时达高峰,7 d 后渐下降,与正常对照组相比,差异有统计学意义($t=7.439, 70.049, 8.526; P<0.01$)。在各灌注时间点,倍他洛尔治疗组 nNOS 的 A 值(0.657 ± 0.013, 0.684 ± 0.058, 0.670 ± 0.026)均低于生理盐水对照组(1.573 ± 0.353, 3.740 ± 0.118, 2.460 ± 0.603) ($t=7.046, 65.739, 8.388; P<0.01$),与正常对照组相比差异无统计学意义($t=1.222, 1.817, 1.832; P>0.05$)。

2.5 MDA 含量和 SOD 活性的测定

正常大鼠视网膜 MDA 水平为(5.10 ± 0.20) nmol/ml ($n=6$), SOD 水平为(173.85 ± 10.51) nU/ml ($n=6$)。再灌注 1 d,视网膜中 MDA 水平开始升高, SOD 水平开始下降。在各灌注时间点,生理盐水对照组 MDA 水平[(7.53 ± 0.99), (7.81 ± 1.12), (9.23 ± 0.83) nmol/ml]明显高于正常对照组($t=5.87, 5.80, 11.82; P<0.01$), SOD 水平[(156.25 ± 11.09), (137.46 ± 9.11), (121.83 ± 9.58) nU/ml]明显低于正常对照组($t=3.00, 6.93, 9.66; P<0.01$)。再灌注 1、3、7 d,治疗组 MDA 含量[(5.14 ± 0.64), (5.48 ± 0.96), (7.15 ± 0.45) nmol/ml]较生理盐水对照组同期值相比明显降低($t=5.74, 4.47, 6.20; P<0.01$), SOD 活性[(172.60 ± 14.67), (151.48 ± 15.22), (136.90 ± 9.04) nU/ml]明显升高($t=2.52, 2.24, 3.24; P<0.01$)。

3 讨论

视神经保护药物是针对不同的视神经损害学说提出的,包括兴奋性氨基酸学说、钙通道学说、一氧化氮学说、自由基学说、凋亡基因的调控学说等,而神经细胞内钙超载是细胞死亡的最后共同通路。因此,钙通道阻滞剂在视神经保护的研究中具有重要意义。倍他洛尔是一种 β_1 受体阻滞剂,在眼科已广泛用于青光眼的降眼压治疗。Osborne 等^[5]在离体和活体动物实验中发现,倍他洛尔通过阻断钙通道,减少细胞内钙超载,保护视神经。Cheon 等^[6]将倍他洛尔作为一种 Ca^{2+} 阻滞剂用于视网膜缺血再灌注损伤的实验研究,发现倍他洛尔能明显改善缺血再灌注对视网膜组织造成的病理损伤,促进视网膜功能的恢复。我们在验证前人实验结果的基础上,首次观察了倍他洛尔对大鼠视网膜缺血再灌注后视网膜神经原性 NOS(nNOS)及 MDA、

SOD 水平的影响,进一步探讨其保护机制。

视网膜缺血再灌注损伤的机制尚未明了,但许多证据认为细胞内钙离子超负荷及自由基大量生成是造成视网膜缺血再灌注损伤的重要原因^[7]。视网膜缺血再灌注引起细胞内 Ca^{2+} 超载,激活结构型 NOS(包括 nNOS 和内皮型 NOS),NOS 催化 L-精氨酸与分子氧反应生成 NO^[8]。NO 具有自由基作用,导致多种氧化损伤。Hangai^[3]等人实验中发现诱导型 NOS 及其产生的 NO 在视网膜缺血再灌注中引起神经元损伤。我们的实验结果证实 nNOS 及其产生的 NO 参与缺血再灌注早期视网膜的损伤过程,推测倍他洛尔可能通过阻断 Ca^{2+} 内流,减少 nNOS 的激活,使 NO 的生成减少,对视网膜起保护作用。MDA 是各类自由基攻击细胞膜中不饱和脂肪酸后形成的脂质过氧化稳定产物,通过测量 MDA 和抗氧化损伤的酶 SOD,可以推测脂质过氧化反应强度和组织损伤的程度。实验中我们发现倍他洛尔治疗组各时间段 MDA 含量均明显低于生理盐水对照组;SOD 活性高于生理盐水对照组,说明倍他洛尔通过抑制自由基的过多生成、减轻脂质过氧化反应、改善 SOD 活性,从而减轻大鼠视网膜缺血再灌注损伤。

综上所述,我们发现局部滴用倍他洛尔对大鼠视网膜缺血再灌注损伤后的视神经具有保护作用,并首次观察到倍他洛尔能对抗视网膜缺血再灌注后自由基水平的升高,抑制脂质过氧化反应,为倍他洛尔作为一种视神经保护剂用于临床提供了有益实验依据。

4 参考文献

- 1 Ronald L, Gross MD, Steven H. Retinal ganglion cell dysfunction induced by hypoxia and glutamate; potential neuroprotective effects of β -blocker. *Surv Ophthalmol*, 1999, 43:162-170.
- 2 Erkin EF, Tarhan S, Kayikcioglu OR, et al. Effects of betaxolol and latanoprost on ocular blood flow and visual fields in patients with primary open-angle glaucoma. *Eur J Ophthalmol*, 2004, 14: 211-219.
- 3 Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, et al. Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res*, 1996, 63:501-509.
- 4 陈长征,李岱,易明望,等.缺血预处理对大鼠视网膜缺血再灌注损伤保护作用. *眼科新进展*, 2001, 21:157-160.
- 5 Osborne NN, Cazeville C, Carvalho AL, et al. In vivo and in vitro experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. *Brain Res*, 1997, 751:113-123.
- 6 Cheon EW, Park CH, Kang SS, et al. Betaxolol attenuates retinal ischemia/reperfusion damage in the rat. *Neuroreport*, 2003, 14: 1913-1917.
- 7 Osborne NN, Casson RJ, Wood JP. Retinal ischemia; mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*, 2004, 23: 91-147.
- 8 Goldstein IR, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide; a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res*, 1996, 36:2979-2994.

(收稿日期:2005-03-25)

(本文编辑:朱敏)