引文格式:李宏松,龙潭,吴惠琴,杜蕊,陆慧琴,赵隽. 加味补阳还五汤在大鼠视神经损伤修复中的作用研究[J]. 眼科新进展,2019,39(11):1032-1035. doi:10.13389/j.cnki.rao.2019.0236

【实验研究】

加味补阳还五汤在大鼠视神经损伤修复中的作用研究△

李宏松 龙潭 吴惠琴 杜蕊 陆慧琴 赵隽

作者简介:李宏松,男,1987年3月出生,硕士。研究方向:眼表及视神经疾病。联系电话:18710949712;E-mail:lihongsong1987@126.com;ORCID:0000-0002-5681-3073

About LI Hong-Song: Male, born in March, 1987. Master degree. Tel: 18710949712; E-mail: lihongsong1987@126.com; ORCID: 0000-0002-5681-3073

收稿日期:2019-01-28
修回日期:2019-05-06
本文编辑:盛丽娜
△**基金项目**:陕西省科学技术研究发展计划项目(编号:2015SF081)
作者单位:710003 陕西省西安市,西安市第一医院,西北大学附属第一医院
通讯作者:吴惠琴,E-mail:dr_wuhuiqin@126.com;ORCID:0000-0003-2254-4976
Received date: Jan 28, 2019
Accepted date: May 6, 2019
Foundation item: Shaanxi Scientific and Technological Development Program (No: 2015SF081)
From the *Xi'an No.* 1 *Hospital*, *the First Affiliated Hospital of Northwest University*, *Xi'an* 710003, *Shaanxi Province*, *China*
Responsible author: WU Hui-Qin, E-mail: dr_wuhuiqin@126.com; ORCID: 0000-0003-2254-4976

Effects of modified Buyang Huanwu Decoction on optic nerve repair after injury in rats

LI Hong-Song, LONG Tan, WU Hui-Qin, DU Rui, LU Hui-Qin, ZHAO Jun

【Abstract】 **Objective** To explore the specific therapeutic effect of modified Buyang Huanwu Decoction on optic nerve repair in rats and to provide a reliable experiment basis for clinical practice. **Methods** A total of 30 healthy SD rats were randomly divided into decoction group, normal saline group and blank control group. Rats in the decoction group and normal saline group were given intragastric administration with modified Buyang Huanwu decoction and normal saline accordingly after the optic nerve injury modeling for their right eyes were established, and rats of blank control group were fed normally without any treatment. The changes in amplitude and latency of flash visual evoked potential (F-VEP) blank P wave of each group were observed before model establishment and 1 day, 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 6 weeks after model establishment. HE stanning method was adopted to observe changes in retinal morphology under light microscope and immunohistochemical stanning was used to detect expression of protein Caspase-3 in retina. **Results** Results of F-VEP indicated that, 4 weeks and 6 weeks after model establishment, the latency of P wave of the decoction group was significantly shortened and amplitude of P wave inclined to be stable, and the difference was statistically significant compared with normal saline group (all $P<0.05$). HE stanning indicated that, retinal structure of rats in blank control group was clear while retinal structures in the decoction group and normal saline group after model establishment were disordered with obvious visible edema. Compared with normal saline group, the morphology of retinal tissue of rats in the decoction group gradually recovered over time and morphology of their ganglion cells gradually approached similar to that of the blank control group. Immunohistochemical stanning showed that Caspace-3 protein of normal saline group and decoction group began to express on the first day after model establishment and reached the peak 1 week later and then gradually decreased; compared with normal saline group, the expression of Caspace-3 protein in the decoction group were decreased 2 weeks, 4 weeks and 6 weeks after model establishment, with statistically significant (all $P<0.05$). **Conclusion** The modified Buyang Huanwu decoction can help improve the optic nerve injuries of rats and facilitate their optic nerve repair.

【Key words】 modified Buyang Huanwu decoction; optic nerve injury; Caspase-3; flash visual evoked potential

【摘要】 **目的** 探讨加味补阳还五汤在视神经挫伤大鼠损伤修复中的具体作用机制,为临床提供实验依据。**方法** 30只SD大鼠随机分为药物组、生理盐水组及空白对照组,前两组大鼠右眼建立视神经损伤模型后分别给予加味补阳还五汤、生理盐水灌胃,空白对照组不做处理。分别于造模前及造模后1 d、1周、2周、4周、6周,各组均行闪光视觉诱发电位观察P波振幅和潜伏期的变化,HE染色观察视网膜组织形态学改变,免疫组织化学染色检测视网膜Caspase-3蛋白表达的变化。**结果** 闪光视觉诱发电位结果显示,造模后4周、6周,药物组P波潜伏期明显缩短,P波振幅趋于平稳,与生理盐水组相比差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。HE染色结果显示,空白对照组视网膜组织结构层次清晰,药物组和生理盐水组造模后可见视网膜组织结构紊乱,明显水肿;随时间推移与生理盐水组相比,药物组的视网膜组织形态逐渐恢复,视网膜神经节细胞形态逐渐接近空白对照组。免疫组织化学染色结果显示,生理盐水组及药物组均在造模后1 d Caspase-3蛋白开始表达,造模后1周达到峰值,而后逐渐减少;与生理盐水组相比,造模后2周、4周、6周药物组Caspase-3蛋白表达均显著降低(均为$P<0.05$)。**结论** 加味补阳还五汤在大鼠视神经损伤后能改善视神经的损伤,促进视神经修复。
【关键词】 加味补阳还五汤;视神经损伤;Caspase-3;闪光视觉诱发电位
【中图分类号】 R774.6

外伤性视神经损伤是一种严重危害视功能的眼外伤疾病,常与颅脑外伤并发,占头部闭合性损伤的0.5%~5.0%[1]。目前,该病的具体发病机制尚未完全明确,因此仍缺乏较好的治疗方法,预后不佳。近

年研究表明,补阳还五汤具有益气活血、通经活络、益精明目之功效,在外周神经损伤的动物实验及临床应用中取得较好的疗效[2-4]。本实验拟建立外伤性视神经损伤的大鼠模型,探讨加味补阳还五汤在视神经损伤修复中的作用,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取健康 SD 雄性大鼠 30 只,6~8 周龄,体质量 200~250 g。眼科常规检查未见明显疾病。由西安交通大学医学院实验动物中心提供并进行常规饲养。实验动物及实验条件的配置符合《实验动物管理条例》。本研究方案通过西安市第一医院伦理委员会的审查并批准实施。

1.1.2 主要试剂和仪器 加味补阳还五汤组方:生黄芪 3 g、当归 3 g、赤芍 2 g、地龙 3 g、川芎 2 g、红花 2 g、桃仁 0.5 g、丹参 3 g(西安市第一医院制剂室制备;生药浓度约为 1 g·mL^{-1}溶液,无菌罐封后置入 4 ℃冰箱中保存备用)。TUNEL 染色试剂盒(美国 PROMEGA 公司);SP 系列试剂盒(美国 ZYMED 公司);手术显微镜(日本拓普康);眼科显微手术器械(中国苏州医疗器械厂);眼科电生理检测仪(德国罗兰公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 随机将大鼠分为药物组、生理盐水组及空白对照组,每组 10 只,药物组及生理盐水组制作动物模型,并于造模后每日固定时间灌胃加味补阳还五汤和生理盐水,每天 2 次,药物组每日总剂量 10 g·kg^{-1}[5];空白对照组不做处理。

1.2.2 动物模型制作 均以右眼为实验眼。参照文献建立单眼视神经损伤模型[6-7],具体步骤:大鼠以 100 g·L^{-1}水合氯醛注射液(3 mL·kg^{-1})腹腔注射麻醉后侧卧于显微镜下,从外眦部球结膜与穹隆结膜交界处剪开结膜及巩膜约 1/4 象限,钝性分离筋膜组织至暴露视神经,轻轻剥开视神经表面鞘膜,在球后约 2 mm 的位置使用 50 g 力的反向夹持镊垂直于视神经长轴夹持视神经 10 s,其后眼表涂红霉素眼膏。次日观察术眼,瞳孔散大,直接对光反射消失,间接对光反射存在,直接检眼镜下观察视网膜血供良好,眼球无明显突出者为造模成功。

1.2.3 闪光视觉诱发电位 于造模前及造模后 1 d、1 周、2 周、4 周、6 周检测各组大鼠右眼闪光视觉诱发电位(flash visual evoked potential,F-VEP),具体步骤:以 100 g·L^{-1}水合氯醛注射液(3 mL·kg^{-1})腹腔注射麻醉大鼠后,复方托品酰氨散瞳。采用银针电极,阻抗 <2 kΩ,暗适应后在暗室内用全视野闪光刺激器检查双眼,频率 2 Hz,通频带宽 1~100 Hz,分析时间 250 ms,叠加 100 次,连续测量至少 3 次。检查右眼时,左眼用不透光黑眼罩完全遮盖。记录 P 波的潜伏期和振幅。

1.2.4 HE 染色 分别于造模后 1 d、1 周、2 周、4 周、6 周每组各处死 2 只大鼠,分离暴露并剪断视神经,立即将眼球放入新鲜配制的 40 g·L^{-1}多聚甲醛固定液中固定 48 h,取出修整后,置于体积分数 95% 酒精过夜,然后置于体积分数 100% Ⅰ、体积分数 100% Ⅱ梯度酒精及二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ各 1 h 脱水,62 ℃烤箱浸蜡Ⅰ、蜡Ⅱ、蜡Ⅲ各 1 h,石蜡包埋、切片。各组每个时间点随机取 3 张切片行常规 HE 染色,显微镜下观察各组大鼠视网膜形态变化。

1.2.5 免疫组织化学染色 Caspase-3 免疫组织化学染色严格按照 SP 试剂盒说明进行。各组每个时间点随机取 1.2.4 内切片 3 张,采用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统,每张切片随机检测 3 个区域平均光密度值,进行半定量分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 24.0 行统计学分析。计量数据均以均数±标准差表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。检验水准:$\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点 F-VEP 变化 F-VEP 结果显示,造模前 3 组大鼠 P 波潜伏期间差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$);造模后,生理盐水组、药物组与空白对照组相比 P 波潜伏期均有延长。造模后 1 d、1 周、2 周,生理盐水组与药物组 P 波潜伏期相比差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$);造模后 4 周、6 周,与生理盐水组相比,药物组 P 波潜伏期明显缩短,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。见表 1。

造模前 3 组大鼠 P 波振幅相比差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。造模后,与空白对照组相比,生理盐水组、药物组 P 波振幅均有先升高后降低的趋势。药物组、生理盐水组在造模后 1 d、1 周与空白对照组相比,P 波振幅均略有升高,但差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。造模后 2 周、4 周、6 周,药物组和生理盐水组 P 波振幅均下降,特别是造模后 4 周、6 周生理盐水组 P 波振幅下降更明显,而药物组

表 1 各组大鼠不同时间点 F-VEP 的 P 波潜伏期

组别	P 波潜伏期/ms					
	造模前	造模后 1 d	造模后 1 周	造模后 2 周	造模后 4 周	造模后 6 周
生理盐水组	73.83±2.05	86.17±1.03	86.67±2.90	86.33±4.33	89.83±2.87	84.33±5.54
药物组	71.83±1.43	87.50±1.87	82.33±1.03	84.17±3.40	79.83±6.18	74.83±3.70
空白对照组	71.33±1.36	72.50±2.10	70.37±1.56	71.56±2.90	72.63±3.60	70.88±3.59

趋于平稳，两组相比差异均具有统计学意义（均为 $P<0.05$）。见表2。

2.2 各组大鼠视网膜形态学观察 HE染色结果显示，空白对照组大鼠视网膜层次清晰，细胞排列整齐，视网膜神经节细胞层单层排列，无明显坏死细胞；生理盐水组和药物组造模后1 d可见视网膜明显水肿、厚度增加，部分视网膜神经节细胞出现空泡样改变；生理盐水组随时间推移，视网膜厚度变薄，组织萎缩，视网膜神经节细胞发生空泡样改变的比例增加；药物组造模后1周视网膜水肿减轻，造模后2周、4周、6周空泡样改变的视网膜神经节细胞数量减少，细胞形态逐渐接近空白对照组（图1）。

表2 各组大鼠不同时间点F-VEP的P波振幅

组别	P波振幅/μV					
	造模前	造模后1 d	造模后1周	造模后2周	造模后4周	造模后6周
生理盐水组	16.02±2.33	18.66±1.56	18.59±1.90	14.96±3.33	9.23±1.36	9.22±3.68
药物组	16.22±1.96	19.01±1.23	19.96±2.63	13.99±2.48	13.49±3.25	14.01±2.97
空白对照组	15.69±1.96	16.52±2.31	15.55±2.56	15.99±2.56	15.91±2.36	14.69±2.69

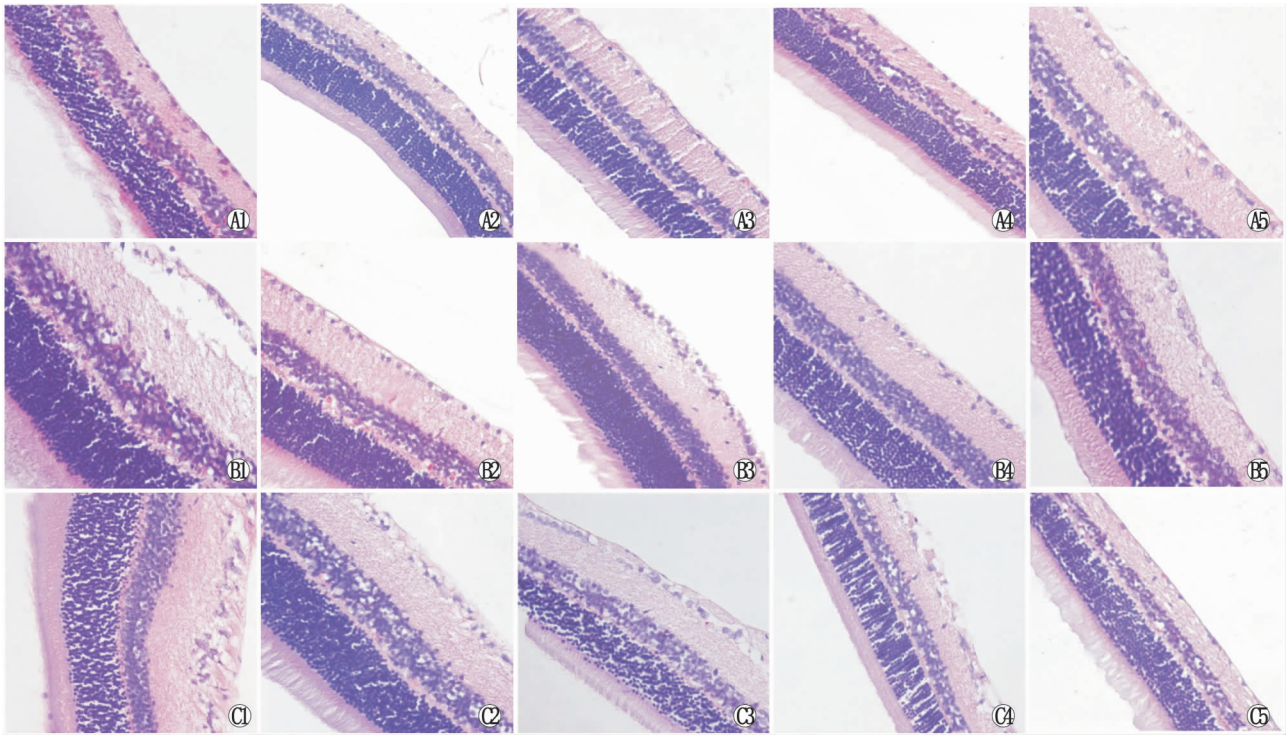


图1 各组视网膜HE染色结果（×200）。A：空白对照组；B：药物组；C：生理盐水组（1-5分别代表造模后1 d、1周、2周、4周及6周）

2.3 各组大鼠视网膜中Caspase-3蛋白表达结果 Caspase-3阳性表达细胞为细胞质内棕黄色或褐色染色。免疫组织化学染色结果显示，空白对照组未见Caspase-3蛋白明显表达，生理盐水组及药物组在造模后1 d Caspase-3蛋白开始表达。造模后1周达到峰值，而后逐渐减少。造模后2周、4周、6周，生理盐水组Caspase-3蛋白表达均明显高于药物组，差异均有统计学意义（均为 $P<0.05$）；随时间推移，药物组Caspase-3蛋白表达逐渐减少，造模后4周时Caspase-3蛋白表达量接近空白对照组。见表3。

表3 各组大鼠造模后不同时间点Caspase-3蛋白的表达

组别	造模后1 d	造模后1周	造模后2周	造模后4周	造模后6周
空白对照组	0.096±0.005	0.090±0.005	0.092±0.003	0.097±0.006	0.096±0.007
药物组	0.145±0.023	0.325±0.006	0.297±0.004	0.213±0.005	0.127±0.004
生理盐水组	0.142±0.017	0.478±0.024	0.404±0.006	0.388±0.002	0.257±0.006

3 讨论

外伤性视神经病变在中医中属“撞击暴盲”或“青盲”范畴。《证治准绳》称之为“触伤真气证”，认为本证为“打动珠中真气、络涩滞而郁遏，精华不得上运，损及瞳神而为内障之急”。根据中医气虚理论，我们认为外伤后眼中真气受损，气虚不能推动血脉运行，致使目系脉络淤滞；或外伤损及目系，脉络受损，血溢络外，导致血淤，两者均导致目系失养，后期发生视神经萎缩。本病的病理机制为：气虚血淤，为本虚标实之证，确定补气活血为治疗本病之大法。

目前，大量研究表明，中药在外伤性视神经病变

中起到积极的治疗作用。孔祥梅等[8]观察甲钴胺治疗钳夹伤的SD大鼠发现,视神经轴突和视网膜神经节细胞异形改变明显减少,有效延缓了视神经的进一步损伤。肖家翔等[9]采用养血行血方治疗钳夹伤的大鼠,结果表明,造模后大鼠视网膜神经纤维层厚度增加,视网膜神经节细胞肿胀,呈空泡样变性,而养血行血方改善了视网膜的病理改变。

本研究建立钳夹视神经挫伤的大鼠模型,采用加味补阳还五汤进行灌胃处理,观察视神经损伤程度及修复机制。加味补阳还五汤以补阳还五汤为主,加丹参药物组成。补阳还五汤始载于《医林改错》,具有补气活血,通经活络的作用。补阳还五汤中重用黄芪为君药,取其补气以行血通络之意。丹参具有活血通络、去淤止痛之功效。加味补阳还五汤具有益气活血、通经活络、益精明目之功效。根据中医气血理论,气为血行之动力,气行则血行,气滞则血淤;该方立法为补气活血,尤其强调补气的重要作用。

F-VEP检测主要反映视网膜神经节细胞至视觉中枢的传递功能,其在鉴别伪盲、视神经挫伤中具有重要的作用[10]。本研究F-VEP结果显示,造模后1 d,生理盐水组和药物组P波潜伏期均明显延长,考虑与视神经钳夹所致直接的机械压迫效应造成轴突的急剧损伤有关。造模后1周生理盐水组P波潜伏期变化平稳,而药物组在造模后4周、6周时P波潜伏期明显缩短,但与空白对照组相比仍有一定差距,考虑在药物辅助下部分视神经功能得到恢复,但仍有部分视神经的受损是不可逆的。

HE染色结果显示,视神经损伤后视网膜水肿,与机械性冲击、压迫等原因造成视神经挫伤引起的病理改变有关。造模后4周,药物组视网膜神经节细胞部分恢复,组织结构清晰,尚可见部分细胞呈空泡样改变;而生理盐水组可见大量神经节细胞空泡样改变,且视网膜厚度变薄,组织萎缩。

细胞凋亡在视神经损伤修复过程中具有重要的作用。Caspase-3是凋亡过程中的关键蛋白酶,常以无活性的酶原形式存在,只有在凋亡信号出现时才发生裂解而活化[11]。刘晓坤等[12]研究发现,正常大鼠视网膜几乎无Caspase-3表达,视神经钳夹伤后可见视网膜组织中出现大量Caspase-3阳性染色细胞,主要位于视网膜神经节细胞层、内核层及外核层,损伤后7 d达到峰值,随后表达下降。本研究结果与之一致。本研究还发现,视神经损伤后2周、4周、6周生理盐水组Caspase-3蛋白表达均明显高于药物组,差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。考虑原因为,早期视神经损伤主要是钳夹视神经造成部分神经纤维轴浆运输阻断,部分视网膜神经节细胞失去营养供给,发生不可逆转的死亡,而另一部分视网膜神经节细胞因为组织水肿、炎症等微环境的改变,诱导细胞凋亡机制的发生,造成视神经的继发性损害。

综上所述,本研究结果表明,加味补阳还五汤在视神经挫伤的修复过程中能改善视神经的损伤,促进神经修复,并且通过抑制细胞凋亡分子的表达,为神经损伤修复提供良好的微环境。本实验为加味补阳还五汤在外伤性视神经损伤中的应用提供了实验依据,为临床治疗外伤性视神经损伤提供了新的思路。

参考文献

[1] JANG S Y. Traumatic optic neuropathy[J]. *Korean J Neurotrauma*,2018,14(1):1-5.
[2] ZHANG Y J,LING Y. Clinical study of Buyanghuanwu decoction on 30 cases of low median nerve injury after operation[J]. *Jiangsu J Trad Chin Med*,2013,8:26-28.
张远军,凌宇. 补阳还五汤加味治疗低位正中神经损伤术后30例临床研究[J]. 江苏中医药,2013,8:26-28.
[3] LU G S,CHEN J,GAO X P,LI H B,SHI Z Y,SUN Y,*et al*. The value of modified Buyanghuanwu decoction in the treatment of thoracolumbar fracture with acute spinal cord injury[J]. *J Emerg Trad Chin Med*,2015,(10):1822-1824.
鲁贵生,陈杰,高晓鹏,李红宾,史志勇,孙永,等. 补阳还五汤加味在胸腰椎骨折伴急性脊髓损伤治疗中的价值[J]. 中国中医急症,2015,(10):1822-1824.
[4] ZHANG Z,GONG X Y,HUANG T,HU Y F,XU C L,TAO Z F,*et al*. Effect of Buyanghuanwu decoction on vessel stasis syndrome of traumatic peripheral nerve injury and its effect on the levels of NF-kappa B and TNF-alpha[J]. *Mod J Int Trad Chin Western Med*,2018,(10):1126-1128.
张真,龚新益,黄廷,胡耀芬,许春利,陶智凡,等. 加味补阳还五汤治疗外伤性周围神经损伤脉络瘀阻证疗效及对NF-κB、TNF-α水平的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2018,(10):1126-1128.
[5] QI X L,ZHANG H G,ZHANG J,GONG H Q. Protective effect of Buyanghuanwu decoction on experimental retinal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Int Eye Sci*,2008,8(4):732-735.
亓晓琳,张宏国,张静,宫华青. 补阳还五汤对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的作用[J]. 国际眼科杂志,2008,8(4):732-735.
[6] YAN D,LUO S P,LONG B,ZHOU L Q,ZHA X,CAO X,*et al*. The evaluation of F-VEP on the efficacy of using hyperbaric oxygen to treat the rats with optic nerve crush[J]. *J Kunming Med Univ*,2018,(2):10-14.
晏聃,罗生平,龙冰,周丽琼,查旭,曹霞,等. VEP对高压氧治疗大鼠视神经损伤疗效的评价[J]. 昆明医科大学学报,2018,(2):10-14.
[7] TEMPLETON J P,GEISERT E E. A practical approach to optic nerve crush in the mouse[J]. *Mol Vis*,2012,18:2147-2152.
[8] KONG X M,SUN X H. The ability of mecobalamin to protect the rat optic nerve from injury by crushing[J]. *Chin J Optom Ophthalmol*,2004,6(3):157-160,164.
孔祥梅,孙兴怀. 甲钴胺对钳夹伤大鼠视神经的保护作用[J]. 眼视光学杂志,2004,6(3):157-160,164.
[9] XIAO J X,WEN T,YAO Y. Morphological observation on experimental traumatic optic nerve injury managed by blood-nourishing and circulation-boosting formula[J]. *CHN J Chin Ophthalmol*,2017,27(1):11-14.
肖家翔,文婷,姚莹. 养血行血方抗大鼠实验性外伤性视神经损伤的形态学观察[J]. 中国中医眼科杂志,2017,27(1):11-14.
[10] LUO Y T. Diagnostic value of VEP applied in patients with optic nerve contusion[J]. *Mod Diagn Treatment*,2013,11(5):963-964.
骆亦婷. 视觉诱发电位对视神经挫伤早期诊断的应用价值[J]. 现代诊断与治疗,2013,11(5):963-964.
[11] COWAN C M,THAI J,KRAJEWSKI S,REED J C,NICHOLSON D W,KAUFMANN S H,*et al*. Caspases 3 and 9 send a pro-apoptotic signal from synapse to cell body in olfactory receptor neurons[J]. *J Neurosci*,2001,21(18):7099-7109.
[12] LIU X K,ZHANG X Y,WANG Y,ZHAO P. Effects of minocycline on expression of Caspase-3 in rat retina after traumatic optic neuropathy[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2013,33(12):1132-1135.
刘晓坤,张晓宇,王赟,赵平. 米诺环素对大鼠视神经挫伤后视网膜Caspase-3表达的影响[J]. 眼科新进展,2013,33(12):1132-1135.