

· 实验研究 ·

依托咪酯对成年大鼠视网膜神经节细胞的 差异性保护作用

徐召溪 胡军民 徐国政 马廉亭

【摘要】目的 探讨依托咪酯对成年大鼠视神经损伤后视网膜不同部位视网膜神经节细胞(RGCs)存活的影响。**方法** 取 55 只成年雌性 SD 大鼠,于双侧上丘和顶盖前区及外侧膝状荧光金逆行标记 RGCs,然后随机分为 6 组:正常组(n=5),模型组(n=10),脂肪乳组(n=10;视神经损伤后腹腔注射等体积脂肪乳,1 次/d),以及低、中、高剂量依托咪酯组(n=30;视神经损伤后腹腔注射依托咪酯,剂量分别为 2、4、6 mg/kg,1 次/d)。RGCs 标记后 5 d,距视神经根部 1 mm 处切断左侧视神经,7、14 d 后采用视网膜平铺技术计数距视盘边缘 1、2、3 mm 处荧光金逆行标记的 RGCs。**结果** 正常组距视盘边缘 1、2、3 mm 处 RGCs 密度分别为(2652±116)个/mm²、(2196±145)个/mm²、(1758±137)个/mm²,越靠近视盘,RGCs 密度越高($P<0.05$);但是,模型组视神经损伤后 7、14 d,距视盘边缘 3 mm 处 RGCs 存活率明显高于 1、2 mm 处 RGCs 存活率($P<0.05$)。视神经损伤后 7 d,低剂量依托咪酯显著增加距视盘边缘 1 mm 处 RGCs 存活率($P<0.05$),中、高剂量依托咪酯显著增加距视盘边缘 1、2、3 mm 处 RGCs 存活率($P<0.05$)。视神经损伤后 14 d,低剂量和中剂量依托咪酯对距视盘边缘 1、2、3 mm 处 RGCs 存活率均无明显影响($P>0.05$);高剂量依托咪酯明显增加距视盘边缘 1 mm 处 RGCs 存活率($P<0.05$)。**结论** 大鼠 RGCs 在视网膜中分布是不均匀的,不同部位 RGCs 对视神经损伤反应不一样,对依托咪酯治疗敏感性也不一样;距视盘越近,对损伤反应越重,对依托咪酯治疗反应越敏感;依托咪酯剂量越高,对 RGCs 保护作用范围越广,作用持续时间越长。

【关键词】 视网膜神经节细胞;视神经损伤;依托咪酯;成年大鼠

【文章编号】 1009-153X(2021)04-0274-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1+5

Differential protective effect of etomidate on retinal ganglion cell survival in adult rats after optic nerve injury

XU Zhao-xi, Hu Jun-min, XU Guo-zheng, MA Lian-ting. Department of Neurosurgery, General Hospital of Central Theater Command, PLA, Wuhan 430070, China

【Abstract】Objective To explore the effect of etomidate on the survival of retinal ganglion cells (RGCs) in different parts of retina in adult rats after the optic nerve injury (ONI). **Methods** Fifty-five adult SD rats were randomly divided into 6 groups: normal group (n=5), model group (n=10) and vehicle group (n=10; intraperitoneal injection of equal volume lipid emulsion, once a day), and low-, medium- and high-dose etomidate groups (n=30; intraperitoneal injection of etomidate at 2, 4, 6 mg/kg, respectively; once a day). Five days after the RGCs labeled by fluoro-gold in bilateral superior colliculus, pretectal region and lateral geniculate bodies, the left optic nerve was transected 1.0 mm from the optic disc, and the RGCs 1, 2 and 3 mm from the edge of optic disc (1-, 2- and 3-EOD, respectively) were calculated 7 and 14 days after the ONI. **Results** The 1-, 2- and 3-EOD RGC densities of normal rats were (2652±116) cells/mm², (2196±145) cells/mm² and (1758±137) cells/mm², respectively. Closer to the optic disc, the higher the RGC densities in normal rats ($P<0.05$). However, the survival rate of 3-EOD RGCs was significantly higher than those of 1- and 2-EOD RGCs 7 and 14 days after the ONI ($P<0.05$) in model group. Seven days after the ONI, low-dose etomidate significantly increased the survival rate of 1-EOD RGCs ($P<0.05$), and medium- and high-dose etomidate significantly increased the survival rate of 1-, 2- and 3-EOD RGCs ($P<0.05$). Fourteen days after the ONI, low- and medium-dose etomidate had no significant effect on the survival rate of 1-, 2- and 3-EOD RGCs ($P>0.05$); high-dose etomidate significantly increased the survival rate of 1-EOD RGCs ($P<0.05$). **Conclusions** The distribution of rat RGCs in the retina is uneven. Different RGCs have different responses to the ONI, and their sensitivities to etomidate treatment are also different. The closer to the optic disc, the more serious the injury, and the more sensitive to etomidate treatment. The higher the dose of etomidate, the wider the protective range of RGCs and the longer the duration of the effect.

【Key words】 Retinal ganglion cells ; Optic nerve injury; Adult rats; Etomidate

视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)进行性、不可逆性死亡是视神经损伤等疾病特征性病理表现,避免 RGCs 死亡对成功治疗这些具有重要意义^[1]。研究发现依托咪酯对脑缺血等诱发的谷氨

酸兴奋毒性作用导致的海马神经元损伤具有保护作用^[2,3],同时对大鼠脊髓撞击伤、脊髓氧化应激损伤、脊髓缺血-再灌注损伤等具有保护作用^[4-6]。研究表明,大鼠 RGCs 分为不同的类型,分布在视网膜的不同部位,发挥不同的作用^[7,8]。本文探讨成年大鼠视神经切断后不同部位 RGCs 变化及依托咪酯对不同部位 RGCs 存活的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 55 只成年雌性 SD 大鼠,体重 200~230 g,购自武汉大学医学院实验动物中心,根据视神经损伤干预方法随机分为 6 组:正常组(n=5;只标记 RGCs,不损伤视神经),模型组(n=10, RGCs 标记后损伤视神经),脂肪乳组(n=10, RGCs 标记后损伤视神经,并给予脂肪乳治疗),依托咪酯组(n=30, RGCs 标记后损伤视神经,并给予依托咪酯治疗);依托咪酯组根据剂量分为低、中、高剂量 3 亚组,每亚组 10 只大鼠。模型组、脂肪乳组以及低、中、高剂量依托咪酯组,视神经损伤后 7、14 d 分离左侧视网膜计数 RGCs,每个时间点、每组各 5 只。

1.2 荧光金逆行标记 RGCs 参照 Baptiste 等^[9]报道方法。大鼠腹腔内注射 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg;美国 Sigma 公司)深度麻醉后,自颅顶正中线切开头皮,分离腱膜下组织,切开、分离颅骨膜,暴露矢状缝和人字缝。距人字缝 1 mm 处,于矢状缝两侧旁开 1 mm 用磨钻各磨开一个 3 mm×4 mm 的骨孔,剪开脑膜,用负压吸引器吸去大脑皮层,暴露双侧上丘和顶盖前区及外侧膝状体,再用微玻管戳穿包被它们的脑膜,然后,将一小块浸有 5% 荧光金(美国 Fluorochrome 公司)的绵胶海绵放置于它们表面。然后,依次缝合各层组织。

1.3 视神经损伤模型制作及干预 RGCs 荧光金标记后 5 d,参照 Hou 等^[10]报道方法制作大鼠视神经损伤模型。大鼠深度麻醉后,显微镜下暴露左侧视神经眶内段,距视神经根部 1 mm 处剪断视神经,注意避免损伤视网膜中央动脉。然后,依次缝合各层组织。

低、中、高剂量依托咪酯组腹腔注射依托咪酯(江苏恩华制药有限公司),剂量分别为 2、4、6 mg/kg,每天一次,直至处死大鼠。脂肪乳组腹腔注射等体积脂肪乳(与 2 mg/kg 依托咪酯相当;江苏华瑞制药有限公司)。

1.4 RGCs 计数 参照 Hou 等^[9]报道方法进行 RGCs 计数^[9]。过量麻醉处死大鼠,立即分离左侧视网膜并做 4 个切口,将视网膜分成大致相等的颞上、颞下、鼻上

和鼻下 4 个象限,4%多聚甲醛固定后,平铺于载波片,封片后荧光显微镜下观察。以物镜 20 倍的栅格框(0.5×0.5 mm²)界定样本区。沿每一象限中线,距视盘边缘 1、2、3 mm 处各选取一个样本区,在紫外光激发模式下,计数每一样本区荧光金标记的 RGCs。

1.5 评估指标 RGCs 密度指每平方毫米内 RGCs 数量,单位为个/mm²。RGCs 存活率是指视神经切断后 RGCs 密度与正常 RGCs 密度的比值。距视盘边缘 1、2、3 mm 处 RGCs 密度分别为 1、2、3 mm 所计数 4 个样本区 RGCs 总数与 4 个样本区面积的比值。

1.6 统计学处理 应用 SPSS18.0 软件分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 Tuckey 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 形态学观察 荧光金标记的 RGCs 胞体多呈卵圆形,边界清晰,大小不一;其分布由中央向周边部逐渐变稀少;而小胶质细胞胞体细长,形态不规则。视神经切断后 7、14 d, RGCs 数量明显减少,伴有小胶质细胞激活(图 1)。

2.2 视神经切断后不同部位 RGCs 密度变化 正常组距视盘边缘 1、2、3 mm 处 RGCs 密度分别为(2652±116)个/mm²、(2196±145)个/mm²、(1758±137)个/mm²;越靠近视盘, RGCs 密度越高(P<0.05)。

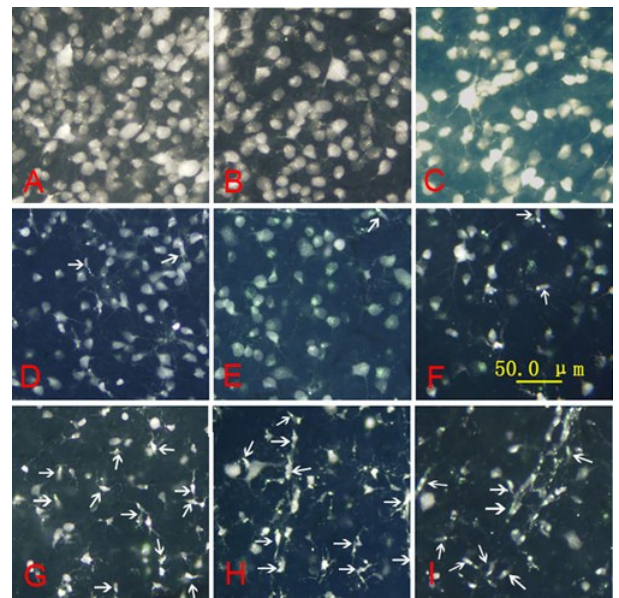


图 1 荧光金逆行标记大鼠视网膜神经节细胞
图像取自视网膜颞上象限,A、D、G. 取自距视盘边缘 1 mm;B、E、H. 取自距视盘边缘 2 mm;C、F、I. 取自距视盘边缘 3 mm;A~C. 正常大鼠;D~F. 视神经切断后 7 d;G~I. 视神经切断后 14 d;视网膜神经节细胞胞体卵圆,边界清楚;小胶质细胞胞体细长,形态不规则(白色↑示)

视神经切断后 7 d,模型组距视盘边缘 1、2 mm 处存活 RGCs 密度没有统计学差异($P>0.05$),但都明显高于距视盘边缘 3 mm 处 RGCs 密度($P<0.05$)。视神经切断后 14 d,模型组距视盘边缘 1、2、3 mm 处 RGCs 密度分别均无统计学差异($P>0.05$)。见表 1。

2.3 视神经损伤后不同部位 RGCs 存活率变化 视神经切断后 7、14 d,模型组距视盘边缘 3 mm 处 RGCs 存活率明显低于 1、2 mm 处 RGCs 存活率($P<0.05$),而 1 mm 与 2 mm 以及 2 mm 与 3 mm 处 RGCs 存活率均无统计学差异($P>0.05$)。见表 2。

2.4 依托咪酯对不同部位 RGCs 存活的作用 视神经切断后 7 d,与模型组相比,低剂量依托咪酯组距视盘边缘 1 mm 处存活 RGCs 密度明显增高($P<0.05$),而 2、3 mm 处存活 RGCs 密度无明显变化($P>0.05$)。中、高剂量依托咪酯组距视盘边缘 1、2、3 mm 处存活 RGCs 密度都显著高于模型组($P<0.05$)。与低剂量依托咪酯组相比,中剂量依托咪酯组 3 个部位存活 RGCs 密度都没有明显差异($P>0.05$),高剂量依托咪酯组 3 个部位存活 RGCs 密度都显著增高($P<0.05$)。与中剂量依托咪酯组相比,高剂量依托咪酯组距视盘边缘 1、2 mm 处存活 RGCs 密度明显升高($P<0.05$),3 mm 处存活 RGCs 密度无明显差异($P>0.05$)。视神经切断后 7 d,不同剂量依托咪酯组距视盘边缘 1、2、3 mm 处 RGCs 存活率与其存活 RGCs 密度具有同样的变化趋势。见表 1、2。

视神经切断后 14 d,低、中剂量依托咪酯对距视盘边缘 1、2、3 mm 处存活 RGCs 密度、RGCs 存活率均无明显影响($P>0.05$)。高剂量依托咪酯明显增加距视盘边缘 1 mm 处存活 RGCs 密度、RGCs 存活率($P<0.05$),而对距视盘边缘 2、3 mm 处存活 RGCs 密度、RGCs 存活率均无明显影响($P>0.05$)。见表 1、2。

3 讨 论

本研究发现,越靠近视盘,大鼠 RGCs 密度越高;然而,视神经损伤后,密度越高的部位,RGCs 存活率越低。VanderWall 等^[11]报道,不同亚型 RGCs 在急、慢性损伤和疾病模型中损伤反应也不一样。引起这种现象的最直接的原因可能是越靠近视盘的 RGCs 离损伤位置越近,造成的损伤也就越严重^[12]。另外,大鼠 RGCs 依据胞体大小可分为大胞体 I 型 RGCs,小胞体 II 型 RGCs 和中等胞体 III 型 RGCs,II 型 RGCs 占 67%,主要分布于视网膜中央区^[7]。有研究表明,家猫视神经损伤后不同直径的轴突变性速度不一样,轴突直径越小变性越快,从而导致小轴突 β 型 RGCs(相当于大鼠 II 型 RGCs)死亡速度明显比大轴突 α 型 RGCs 要快^[8]。大鼠 RGCs 可能也有类似反应,使 II 型 RGCs 死亡速度比 I 型 RGCs 和 III 型 RGCs 要快。另外,不同 RGCs 表达的钙离子相关受体也不一样,代谢需求也不一样,从而导致对损伤的敏感性也不一样^[13]。

表 1 依托咪酯对大鼠视神经损伤后不同部位存活 RGCs 密度的影响(个/mm²)

分组	距视盘边缘 1 mm		距视盘边缘 2 mm		距视盘边缘 3 mm	
	伤后 7 d	伤后 14 d	伤后 7 d	伤后 14 d	伤后 7 d	伤后 14 d
模型组	1150±85	246±75	1095±78	250±65	905±106	228±45
脂肪乳组	1205±83	242±87	1058±87	260±75	995±98	250±58
低剂量组	1410±139*	276±52	1197±97	262±40	1025±82	242±27
中剂量组	1485±69*	274±64	1318±94*	295±90	1108±62*	269±62
高剂量组	1793±13*#	345±48*	1497±103*#	322±53	1164±69*#	294±44

注:与模型组相应值比,* $P<0.05$;与低剂量组相应值比,# $P<0.05$;与中剂量组相应值比,& $P<0.05$;RGCs. 视网膜神经节细胞

表 2 依托咪酯对大鼠视神经损伤后不同部位 RGCs 存活率的影响

分组	距视盘边缘 1 mm		距视盘边缘 2 mm		距视盘边缘 3 mm	
	伤后 7 d	伤后 14 d	伤后 7 d	伤后 14 d	伤后 7 d	伤后 14 d
模型组	(45.45±3.25)%	(9.68±3.52)%	(50.65±5.36)%	(11.10±3.50)%	(56.48±6.25)%	(15.65±4.25)%
脂肪乳组	(47.15±2.98)%	(9.56±2.54)%	(51.25±3.68)%	(11.86±3.26)%	(56.24±6.32)%	(14.98±3.56)%
低剂量组	(55.23±5.45)%*	(10.82±2.03)%	(56.29±4.58)%	(12.31±1.87)%	(62.63±5.00)%	(14.77±1.66)%
中剂量组	(58.17±2.69)%*	(10.72±2.51)%	(61.98±4.44)%*	(13.88±4.22)%	(67.71±3.81)%*	(16.45±3.77)%
高剂量组	(70.23±5.17)%*#	(13.49±1.86)%*	(70.39±4.83)%*#	(15.16±2.50)%	(71.13±4.24)%*#	(17.95±2.68)%

注:与模型组相应值比,* $P<0.05$;与低剂量组相应值比,# $P<0.05$;与中剂量组相应值比,& $P<0.05$;RGCs. 视网膜神经节细胞

本研究还发现,大鼠视神经切断后给予依托咪酯治疗,不同剂量依托咪酯对不同部位 RGCs 保护作用也不一样;低剂量剂量依托咪酯主要提高视网膜中央区 RGCs 存活率,高剂量依托咪酯对整个视网膜 RGCs 均有保护作用。视神经切断后,整个视网膜的血-视网膜屏障基本不受影响^[10],因而,依托咪酯在视网膜不同部位的浓度应该也不会有显著差异。有研究表明,不同类型 RGCs 对神经营养因子的反应敏感性也不一样,家猫视神经切断后,给予 BDNF、CNTF 及 forskolin 治疗能显著提高 RGCs 存活率,但主要是提高β型 RGCs 存活率,这与 RGCs 胞膜受体差异密切相关^[8]。这说明不同类型 RGCs 不只对损伤反应不一样,对药物治疗的敏感性也有差异。

本文结果显示,不同剂量依托咪酯对大鼠视神经损伤后 RGCs 保护作用持续时间也不一样,低剂量依托咪酯只能维持 7 d,而高剂量依托咪酯伤后 14 d 对视盘边缘的 RGCs 仍有保护作用,但对视网膜边缘 RGCs 没有显著保护作用。这可能与视神经损伤后谷氨酸大量释放具有一定的时程有关。据文献报道,大鼠视神经损伤后 3~7 d,玻璃体内谷氨酸明显升高,随后慢慢降低,到 14 d 基本恢复正常^[14]。而依托咪酯对神经元谷氨酸兴奋性毒损伤具有显著保护作用^[2,3]。另外,视神经切断后 14 d 时 RGCs 的损伤过于严重,依托咪酯难以发挥保护作用。但是其具体机制还有待进一步研究。

总之,大鼠 RGCs 在视网膜中分布是不均匀的,视神经损伤后,不同部位 RGCs 产生差异性损伤反应,对依托咪酯治疗敏感性也不一样;距视盘越近,对损伤反应越重,对依托咪酯治疗反应越敏感;依托咪酯剂量越高,对 RGCs 保护作用范围越广,作用持续时间越长。

【参考文献】

[1] You Y, Gupta VK, Li JC, *et al.* Optic neuropathies: characteristic features and mechanisms of retinal ganglion cell loss [J]. *Rev Neurosci*, 2013, 24(3): 301–321.

[2] Patel PM, Goskowitz RL, Drummond JC, *et al.* Etomidate reduces ischemia-induced glutamate release in the hippocampus in rats subjected to incomplete forebrain ischemia [J]. *Anesth Analg*, 1995, 80(5): 933–939.

[3] Lee JH, Kim DH, Hong HN, *et al.* Protective effect of etomidate on kainic acid-induced neurotoxicity in rat hippocampus [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 286: 179–182.

[4] Ates O, Yucel N, Cayli SR, *et al.* Neuroprotective effect of etomidate in the central nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Neurochem Res*, 2006, 31: 777–783.

[5] Cayli SR, Ates O, Karadag N, *et al.* Neuroprotective effect of etomidate on functional recovery in experimental spinal cord injury [J]. *Int J Devl Neurosci*, 2006, 24: 233–239.

[6] Yu Q, Zhou Q, Huang H, *et al.* Protective effect of etomidate on spinal cord ischemia-reperfusion injury induced by aortic occlusion in rabbits [J]. *Ann Vasc Surg*, 2010, 24(2): 225–232.

[7] Sun W, Li N, He S. Large-scale morphological survey of rat retinal ganglion cells [J]. *Vis Neurosci*, 2002, 19: 483–493.

[8] Watanabe M, Fukuda Y. Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2002, 21: 529–553.

[9] Baptiste DC, Powell KJ, Jollimore CAB, *et al.* Effects of minocycline and tetracycline on retinal ganglion cell survival after axotomy [J]. *Neuroscience*, 2005, 134: 575–582.

[10] Hou B, You SW, Wu MM, *et al.* Neuroprotective effect of inosine on axotomized retinal ganglion cells in adult rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45: 662–667.

[11] VanderWall KB, Lu B, Alfaro JS, *et al.* Differential susceptibility of retinal ganglion cell subtypes in acute and chronic models of injury and disease [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17359.

[12] Yu DY, Cringle SJ, Balaratnasingam C, *et al.* Retinal ganglion cells: Energetics, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 36: 217–246.

[13] Wang AY, Lee PY, Bui BV, *et al.* Potential mechanisms of retinal ganglion cell type-specific vulnerability in glaucoma [J]. *Clin Exp Optom*, 2020, 103(5): 562–571.

[14] Yoles E, Schwartz M. Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve [J]. *Arch Ophthalmol*, 1998, 116: 906–910.

(2020-12-20 收稿, 2021-03-10 修回)