

## · 实验研究 ·

针刺对 N - 甲基 - N - 亚硝脲诱导的视网膜变性大鼠  
感光细胞凋亡的抑制作用马瑞玲<sup>1</sup> 周国民<sup>2</sup> 张仁<sup>3</sup> 吴根诚<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察针刺对 N - 甲基 - N - 亚硝脲 (MNU) 诱导的视网膜变性大鼠感光细胞凋亡发生的影响。方法 选取 50 天龄的 SD 雌性大鼠, 将 N - 甲基 - N - 亚硝脲以 50 mg/kg 剂量一次性腹腔注射诱导其视网膜变性, 随机分为针刺组、模型组。观察大鼠视网膜的凋亡变化。结果 凋亡高峰第 2、3 天针刺组与模型组凋亡比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。第 5 天、第 7 天时各组凋亡指数比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。针刺可抑制因诱导引起的 caspase-3 升高。结论 针刺能够抑制 MNU 诱导的大鼠视网膜光感受器细胞的凋亡, 其抑制作用与凋亡发生的状态有一定关系。

**关键词** 针刺; 视网膜色素变性; 感光细胞; N - 甲基 - N - 亚硝脲

Restraining Effects of Acupuncture on Photoreceptor Cell Apoptosis in Rats with Retinitis Pigmentosa Induced by N-methyl-N-nitrosourea MA Rui-ling, ZHOU Guo-min, ZHANG Ren, et al Department of Integrative Medicine, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai (200032)

**ABSTRACT Objective** To observe the effect of acupuncture on photoreceptor cell apoptosis in rats with retinitis pigmentosa induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU). **Methods** Fifty-day-old female SD rats were established into model of retinitis pigmentosa by once intraperitoneal injection of 50 mg/kg MNU, and randomly grouped to the acupuncture group and the model group for observing the cell apoptosis in rats and compared with that in normal rats at the corresponding time points. **Results** Acupuncture showed no effect on cell apoptosis at its peak of occurring, apoptotic phenomena still could be seen on days 5 and 7, but it was significantly less in the acupuncture group than in the model group ( $P < 0.01$ ). Moreover, acupuncture showed a restraining effect on the up-regulation of caspase-3 activity. **Conclusion** Acupuncture can restrain the MNU induced apoptosis of photoreceptor cells, the effect is correlated, to a certain degree, with the status of the apoptosis occurrence.

**KEY WORDS** acupuncture; retinitis pigmentosa; photoreceptor cell; N-methyl-N-nitrosourea

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一组以进行性光感受器及色素上皮功能丧失为主的遗传性视网膜变性疾病, 虽然许多基因的突变与 RP 的形成和进程有关, 但最终途径都是感光细胞的凋亡<sup>[1]</sup>。因此保护光感受器细胞及阻止其继续凋亡就成为治疗的主要方向<sup>[2,3]</sup>。文献报道针刺能够延缓 RP 的进程, 提高患者的视力, 为了阐明针刺治疗 RP 的可能作用环节, 有必要开展实验研究<sup>[4,5]</sup>。

研究显示, 针刺能够减轻因 N-甲基-N-亚硝脲 (N-methyl-N-nitrosourea, MNU) 诱导的感光细胞形态学损

伤的程 度<sup>[6]</sup>, 但其改变的相关机制仍无从得知, 因此本研究对针刺是否能够抑制感光细胞的凋亡发生进行观察, 来探讨针刺对感光细胞形态学改变的机制。

## 材料与方 法

1 材料 MNU 由 Sigma 公司提供, 避光, -20 保存, 临用前用生理盐水稀释成 1% 的浓度。

2 动物分组与造模 采用 50 天龄 SD 雌性大鼠, 体重 (200 ± 20) g, 由中国科学院上海啮齿类实验动物中心提供。饲养在 12 h 昼夜间隔、室温在 (22 ± 2) 的动物房中, 正常饲养。造模按照文献 [13] 方法, 将 MNU 以 50 mg/kg 一次腹腔注射, 然后随机分为模型组和针刺组, 在分别应用流式细胞技术、原位末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling, TUNEL) 及 Western

基金项目: 上海市博士后基金资助项目 (No. 05R214114)

作者单位: 1. 复旦大学上海医学院中西医结合系 (上海 200032);

2. 复旦大学上海医学院解剖与组胚系; 3. 上海中医药科技服务中心

通讯作者: 吴根诚, Tel: 021 - 54237526, E-mail: gwu@shmu.edu.cn

blot检测这 3个实验中,模型组和针刺组中各采样时间点均为 5只动物,另有 2只动物作为正常对照组。

3 穴位及治疗方法 模拟人的新明 1(大鼠垂直于耳下角后方褶皱处)和睛明穴(BL1)。造模后即可取双侧穴位进行治疗,使用 0.25 mm ×13 mm 华佗牌针灸针,新明 1 针尖向目外眦,予中等强度刺激,睛明穴施以轻微的手法,每天 1 次,留针 30 min, 10 min 行针 1 次,整个针刺过程由专人操作。其余 2 组除不进行针刺外,每天其他处理均同针刺组。

4 流式细胞技术动态检测细胞凋亡率 分别于第 2 天(d<sub>2</sub>)、第 3 天(d<sub>3</sub>)、第 5 天(d<sub>5</sub>)以及第 7 天(d<sub>7</sub>)针刺结束后 2 h,颈部脱臼,快速处死动物,取出眼球,用眼科剪沿角膜缘剪开,祛除角膜、晶状体、玻璃体,翻转视杯,用钝性镊子钝性分离视网膜,以每只大鼠的 2 个视网膜为 1 个样本,制备单细胞悬液,PI 染色,在 d<sub>7</sub> 时取正常组 2 只检测细胞凋亡率,样本处理方法同其他两组。

5 TUNEL 法检测细胞凋亡指数 d<sub>7</sub> 最后 1 次针刺后,脱臼处死动物,迅速取出眼球固定于新鲜配制的 4% 多聚甲醛溶液中过夜,沿视神经的中心纵向冰冻切片(厚度为 5 μm),使用 TUNEL 法,整个操作过程严格按照武汉 Boster 公司试剂盒说明书进行。感光细胞凋亡指数 = (凋亡细胞数 / 感光细胞总数) × 100%。

6 Western blot 检测 Caspase-3 的活性 在 d<sub>7</sub> 将动物处死,样本取法同流式细胞技术检测法,从取出的视网膜中提取蛋白,使用 Western blot 系统(美国 Bio-Rad 公司)进行实验。

7 统计学分析 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行方差齐性分析,组间用 Student-Newman-Keuls 进行显著性比较。使用 SPSS 11.5 软件进行统计。

### 结 果

1 各组不同时间点细胞凋亡率比较(表 1) 模型组、针刺组 d<sub>2</sub> 时凋亡率处于高峰期,两组比较,差异无统计学意义(P > 0.05),之后逐渐下降,d<sub>5</sub> 时针刺对凋亡显示出明显的抑制作用,并持续至 d<sub>7</sub> (P < 0.01)。

表 1 各组不同时间点细胞凋亡率比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>5</sub>	d <sub>7</sub>
正常	2	—	—	—	2.01 ± 0.2
模型	5	33.20 ± 3.4*	28.98 ± 4.8*	17.02 ± 5.2*	13.01 ± 2.9*
针刺	5	34.47 ± 5.8*	26.01 ± 3.1*	9.6 ± 3.9	7.30 ± 2.4

注:与正常组比较,\* P < 0.01;与模型组比较, P < 0.01; > 5% 表示有凋亡发生;

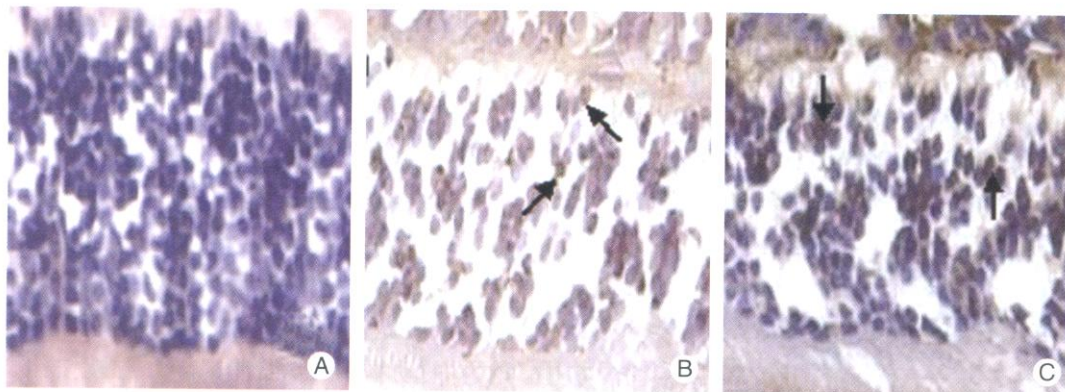
2 各组 d<sub>7</sub> 视网膜外核层凋亡指数比较(表 2, 图 1) 正常组大鼠视网膜仅有少数 TUNEL 阳性细胞(图 1A)。MNU 诱导后凋亡发生在视网膜的外核层(ONL),图中可见大量的 TUNEL 阳性细胞存在(图 1B),说明在 d<sub>7</sub> 感光细胞的凋亡仍在继续。而针刺能够部分阻断凋亡的发生(图 1C)。针刺组与模型组比较,凋亡指数明显减少(P < 0.01)。

表 2 各组 d<sub>7</sub> 视网膜外核层凋亡指数比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	凋亡指数
正常	2	1.7 ± 0.3
模型	5	15.7 ± 1.4*
针刺	5	8.3 ± 2.9*

注:与正常组比较,\* P < 0.01;与模型组比较, P < 0.01

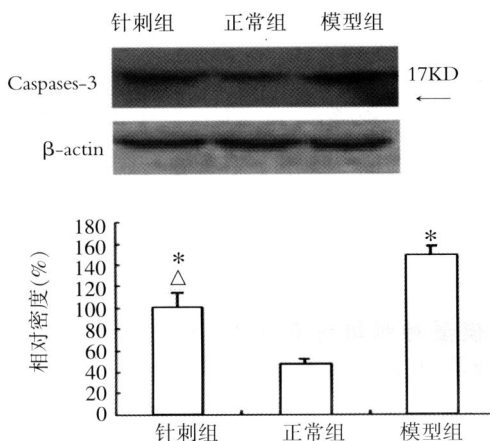
3 各组 Caspase-3 活性变化比较(图 2) Western blot 结果显示,MNU 诱导后 7 天视网膜的 Caspase-3 含量明显升高,但是在注射 MNU 后进行针刺可抑制 MNU



注:图中见核中为黄色颗粒者为凋亡细胞(箭头所示);A 为正常组,感光细胞排列整齐,偶见凋亡细胞;B 细胞为模型组,ONL 的感光细胞数减少,细胞排列紊乱,且多见凋亡细胞,凋亡细胞较模型组减少

图 1 各组细胞凋亡变化(PI 染色, ×400)

诱导引起的 Caspases-3的升高。



注: 与正常组比较, \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.01$

图 2 各组 Caspases-3 活性变化比较

讨 论

近年来临床报道认为针刺能够提高 RP 患者的视力,因此推断针刺的干预可以延缓 RP 的进程,从而提高患者的生活质量<sup>[4,5,7]</sup>。以新穴“新明 1”及经典穴位“睛明”为主的临床研究结果表明,针刺能够提高患者的视力和视网膜电图 a 波、b 波的波幅<sup>[4]</sup>,因此本研究所选用穴位有一定的临床依据。

MNU 是一种烷化剂,能特异地损伤感光细胞,引起其凋亡,与 RP 的病理改变相似,常被用作研究视网膜变性及疗效评价的诱导剂<sup>[2]</sup>。文献报道在 MNU 诱导后外核层感光细胞的损伤具有一定的时间依赖性, d<sub>2</sub> 时凋亡达到最高峰, d<sub>7</sub> 时外核层的细胞已明显减少<sup>[1]</sup>。

流式细胞技术检测显示针刺在凋亡发生的高峰期没有明显的抑制凋亡作用,但在凋亡高峰期之后,针刺的抑制作用逐渐显著,虽然在 d<sub>7</sub> 时凋亡仍然发生,但是针刺的抑制作用仍然较明显。为了对其凋亡率进行进一步的定位分析,本研究使用了 TUNEL 法,与流式细胞技术检测在 d<sub>7</sub> 时的结果一致,发生在 ONL 的凋亡现象仍较严重,模型组动物在 d<sub>7</sub> 时凋亡指数为 (15.7 ± 1.4)%,而在注射诱导剂的同时使用针刺进行干预治疗,其凋亡指数为 (8.3 ± 2.9)%,两组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),提示针刺有抗感光细胞凋亡的保护性作用。

细胞凋亡的发生是一个复杂的反应过程,文献<sup>[8]</sup>显示实验性的视网膜损伤后, Caspase-3 能够表达在凋亡的视网膜感光细胞上。因此本研究选择 Caspase-3 活性的变化作为另一个抗凋亡的指标。本

研究使用 Western blot 观察 d<sub>7</sub> 时 Caspase-3 的活性,与正常大鼠的视网膜比较,模型组中该物质的活性增加,而针刺可以抑制视网膜的 Caspase-3 活性的上调。据目前所查到的文献,该模型条件下,尚未有 Caspase-3 的活性变化的报道。因此本研究结果也丰富了 MNU 诱导的模型发生凋亡的实验观察指标。

本研究结果提示针刺能够保护因 MNU 诱导的视网膜感光细胞的损伤,其机制可能是通过抑制感光细胞凋亡的发生,进而实现保护光感受器的功能、延缓视网膜变性的进程。这一机制仍有待于进一步的深入研究。尽管针刺对 MNU 引起视网膜损伤的改善作用并不完全,但可以作为一种临床保护视网膜功能和延缓视网膜病变的治疗方法。

参 考 文 献

- [1] van Soest S, Westervekl A, de Jong PT, et al Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view [J]. *Surv Ophthalmol*, 1999, 43 (4): 321- 334.
- [2] Yoshizawa K, Nambu H, Yang J, et al Mechanisms of photoreceptor cell apoptosis induced by N-methyl-N-nitrosourea in Sprague-Dawley rats [J]. *Lab Invest*, 1999, 79 (11): 1359- 1367.
- [3] Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, et al Nicotinamide prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in Sprague-Dawley rats and C57BL mice [J]. *Exp Eye Res*, 2002, 74 (3): 383- 392.
- [4] 刘坚,张仁. 电针治疗原发性视网膜色素变性 65 例 [J]. *中国针灸*, 2000, 20 (10): 595- 596.
- [5] 倪云,丁淑华. 针刺治疗视网膜色素变性的疗效观察 [J]. *长春中医学院学报*, 2000, 16 (3): 5- 6.
- [6] 马瑞玲,万瑾,余振钰,等. 针刺对 N-甲基-N-亚硝酸诱导的大鼠视网膜变性的影响 [J]. *针刺研究*, 2006, 31 (5): 276- 279.
- [7] 朱柏君,王援朝,戴惠婷,等. 针刺对视网膜变性患者微循环的影响 [J]. *中国针灸*, 1997, 17 (1): 11- 13.
- [8] Lam TT, Abler AS, Tso MO. Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40 (5): 967- 975.
- [9] Katai N, Yoshimura N. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40 (11): 2697- 2705.

(收稿: 2007 - 06 - 18 修回: 2008 - 10 - 23)