



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111317814 B

(45) 授权公告日 2020.12.18

(21) 申请号 202010327033.2

A61K 9/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.04.23

A61K 9/08 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 47/44 (2017.01)

申请公布号 CN 111317814 A

A61K 47/38 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.06.23

(73) 专利权人 中国中医科学院眼科医院

地址 100040 北京市石景山区鲁谷路33号

(72) 发明人 梁丽娜 张晶 许凯 刘淑芝

杜茂波

(74) 专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470

代理人 尉月丽

(51) Int. Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

(56) 对比文件

胡淑琴等.睫状神经营养因子在视网膜疾病中的应用研究进展.《海峡科学》.2016,(第2期),第44-47页.

Wu Chun-jie等.Promoting effect of borneol on the permeability of puerarin eye drops and timolol maleate eye drops through the cornea in vitro.《Pharmazie》.2006,第61卷(第9期),第783-788页.

审查员 李明智

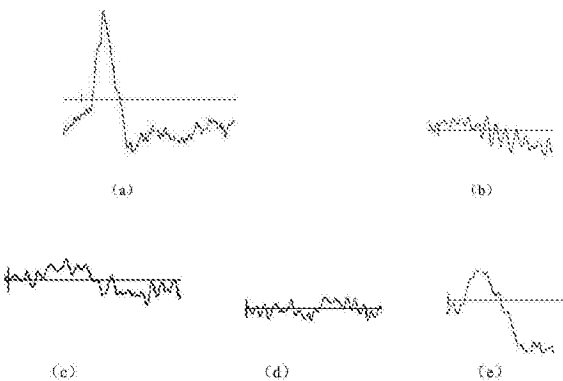
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

一种冰片联合神经营养因子组合物及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种冰片联合神经营养因子组合物及应用,属于眼科疾病治疗技术领域。该冰片联合神经营养因子组合物,包括冰片和神经营养因子,其中神经营养因子包括睫状神经营养因子、脑源性神经营养因子、神经生长因子、神经营养素家族和胶质细胞源性神营养因子中的一种或多种,同时本申请也研究了冰片联合神经营养因子组合物在视网膜变性损伤的应用,具体涉及冰片与各种神经营养因子在制备药物及药物组合物中的用途,可用于视网膜变性损伤类疾病的治疗,包括原发性视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性、视杆视锥细胞营养不良以及高眼压引起的视网膜神经节细胞损伤等的治疗。



1. 一种滴眼剂,其特征在于:由冰片、睫状神经营养因子、聚氧乙烯氢化蓖麻油40、聚乙二醇400、磷酸缓冲盐溶液和1%CMC-Na凝胶组成,其中,冰片的含量为所述滴眼剂重量的0.025%,睫状神经营养因子在所述滴眼剂中的浓度为2 μ g/mL。

2. 根据权利要求1所述的滴眼剂,其特征在于:所述的冰片包括天然冰片和/或人工合成冰片。

一种冰片联合神经营养因子组合物及应用

技术领域

[0001] 本发明属于眼科疾病治疗技术领域,涉及一种冰片联合神经营养因子组合物及应用,更具体地,涉及一种冰片联合神经营养因子组合物在视网膜变性损伤中的应用。

背景技术

[0002] 视网膜变性损伤是一组严重的致盲性眼病,其中最常见有年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)及视网膜色素变性(retinitis pigmentosa,RP)等,目前临床上对此类疾病尚缺乏行之有效的治疗手段。这类疾病的共同病理基础是视网膜神经元细胞不可逆性损伤,因此神经保护是防治视网膜变性损伤的关键。

[0003] 神经营养因子是一类对神经元的发育、存活和凋亡起重要作用的蛋白质,其成员包括睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor,CNTF),脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor),神经生长因子(nerve growth factor,NGF),神经营养素家族(neurotrophin)和胶质细胞源性神经营养因子(glia cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)。其中CNTF是神经营养因子家族中被研究最多的成员之一,CNTF对神经元、少突胶质细胞、肌细胞、骨细胞、脂肪细胞有营养性和调节活性。目前已在至少13种不同的动物模型中得到证实CNTF可以有效延缓RP进程。研究发现,在RP小鼠模型的玻璃体腔内注射CNTF能够有效延缓其光感受器细胞的凋亡,并且使其视锥、视杆细胞的功能得到显著的提高。另有研究表明,在视网膜变性鼠模型中由腺相关病毒介导的持续人睫状神经营养因子(human ciliary neurotrophic factor,hCNTF)分泌可以对其整个视网膜外层的视锥细胞发挥保护作用。一项随机、多中心、剂量一梯度变化的临床试验发现利用细胞包裹技术(encapsulated cell technology,ECT)在RP患者眼内持续提供CNTF可以显著延缓RP的病程进展甚至停止发展。不少研究证实CNTF对AMD亦有保护作用。CNTF治疗可以使AMD患者的视网膜厚度增加,可以保护患者的视力,有效延缓AMD的病程进展。但是,由于眼球解剖的特殊性,视网膜给药需要克服许多生物屏障,外源性神经营养因子很难到达视网膜,在上述研究中给药方式采取了玻璃体腔内注射、基因转染、玻璃体内药物细胞微囊移植技术,存在有手术操作难度较大,排斥反应、眼内感染、视网膜脱离等潜在风险,且预期治疗费用昂贵,使神经营养因子治疗眼后节尤其是视网膜疾病受到很大限制。比如CNTF相关专利(专利号:CN103800894B)仅用于眼前节疾病比如角膜损伤、神经性角膜炎的治疗,申请号为200510097985.5的专利研究的是CNTF的突变体在治疗肥胖症或与肥胖症相关的疾病及神经损伤相关疾病中的应用。

[0004] 冰片(Borneol)是一味常用中药,味辛、苦,性凉,归心、脾、肺经,主内外障眼,治五痔,明目。近年来药理研究发现冰片有镇痛抗炎作用,并能抑制一些细菌生长,但是冰片的主要作用与其“通透”的药性有关。冰片可以增加生物膜屏障通透性,因而增加自身和大多数配伍药物的渗透量、渗透速率。研究发现冰片对亲水性及亲脂性化合物在角膜的渗透性均有促进作用,前者的作用更强,可以明显促进分子量小于4kDa的亲水性物质通过角膜,并且没有毒副作用;我们前期研究发现冰片可以增强六味地黄丸对碘酸钠诱导的视网膜变性

模型的保护作用。但目前冰片多和其它中药组方用于结膜炎、角膜炎的治疗,没有用于视网膜疾病治疗。因此,研究冰片联合神经营养因子在保护视网膜变性损伤的应用尤为重要。

发明内容

[0005] 针对上述背景技术提出的不足,本发明的目的是提供一种冰片联合神经营养因子组合物及应用,该组合物可用于视网膜变性损伤类疾病的治疗,包括原发性视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性、视杆视锥细胞营养不良、以及高眼压引起的视网膜神经节细胞损伤等的治疗。本发明的第二个目的是提供一种视网膜变性损伤类疾病的保护方式,即冰片联合神经营养因子的应用。本发明的第三个目的是提供一种冰片的新用途,即在治疗视网膜变性损伤中的应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种冰片联合神经营养因子组合物,包括以下原料:冰片和神经营养因子。

[0008] 进一步地,所述的冰片联合神经营养因子组合物,其中,冰片的含量为组合物重量的0.01-0.1%,神经营养因子的浓度为0.5-2 μ g/mL。

[0009] 进一步地,所述的冰片包括天然冰片和/或人工合成冰片。

[0010] 进一步地,所述的神经营养因子包括睫状神经营养因子、脑源性神经营养因子、神经生长因子、神经营养素家族和胶质细胞源性神经营养因子中的一种或多种。

[0011] 本发明提供了一种冰片联合神经营养因子的应用。

[0012] 进一步地,本发明提供了一种冰片的新用途,即在治疗视网膜变性损伤中的应用。

[0013] 进一步地,本发明还提供了一种冰片联合神经营养因子在治疗视网膜变性损伤中的应用。

[0014] 进一步地,本发明还提供了一种冰片联合神经营养因子在制备治疗视网膜变性损伤的制品中的应用。

[0015] 进一步地,所述的制品为包含药理有效浓度的冰片及神经营养因子的药物。

[0016] 进一步地,所述的制品为包含药理有效浓度的冰片联合神经营养因子的滴眼剂或注射液。

[0017] 进一步地,所述的滴眼剂中包括药理有效浓度的冰片的含量为滴眼剂的0.01-0.1%。

[0018] 进一步地,所述的滴眼剂中包括药理有效浓度的神经营养因子的浓度为0.5-2 μ g/mL。

[0019] 进一步地,所述的滴眼剂包括以下原料:冰片、聚氧乙烯氢化蓖麻油40 (RH40)、聚乙二醇400 (PEG400)、睫状神经营养因子 (CNTF)、磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、1% CMC-Na凝胶。

[0020] 进一步地,所述的滴眼剂包括以下含量的原料:冰片0.025g,聚氧乙烯氢化蓖麻油40 (RH40) 1.336g,聚乙二醇400 (PEG400) 0.334g,睫状神经营养因子 (CNTF) 200 μ g,磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 2g,1% CMC-Na凝胶96.105g。

[0021] 进一步地,所述的冰片的主要成分的分子结构为C₁₀H₁₈O。

[0022] 进一步地,所述的CNTF氨基酸序列:AFTEHSPLT PHRRDLCSRS IWLARKIRSD LTALTESYVK HQGLNKNINL DSADGMPVAS TDQWSELTEA ERLQENLQAY RTFHVLLARL LEDQQVHFTP TEGDFHQAIH TLLLQVAAFA YQIEELMILL EYKIPRNEAD GMPINVGDGG LFEKKLWGLK VLQELSQWTV

RSIHDLRFIS SHQTGIPARG SHYIANNKKM。

[0023] 本发明还提供了一种治疗视网膜变性损伤的制品,包括上述的冰片联合神经营养因子组合物。

[0024] 进一步地,所述的制品还包括聚氧乙烯氢化蓖麻油40、聚乙二醇400、磷酸缓冲盐溶液和1%CMC-Na凝胶中的一种或多种。

[0025] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0026] (1) 本发明首次将中药冰片与神经营养因子相结合组成药物配方,将传统的中医引经理论与现代靶向理论相结合,建立引经药为载体的眼部给药系统,发挥中药及西药各自优势,具体的将传统常用的眼病外用药冰片与具有明确神经保护作用的睫状神经营养因子(CNTF)相结合,制备保护视网膜神经细胞的滴眼剂,为防治视网膜变性类疾病提供新的药物选择。

[0027] (2) 本发明实施例中使用滴眼剂方式给药,促进有效药物成分在视网膜的分布,配方中含有一定浓度的冰片,冰片具有促渗作用,本发明中冰片联合CNTF滴眼剂点眼后,视网膜中CNTF含量较单纯CNTF滴眼剂组明显增加。

[0028] (3) 本发明中的药物具有良好的用药顺应性:首先,本专利以滴眼剂的剂型方式给药治疗眼底病变,与玻璃体腔注射、静脉给药、玻璃体内药物细胞微囊移植等方法相比安全性及便利程度明显增加,在临床应用中患者接受度高;另外,本制剂选择合适的增溶剂和凝胶基质,既促进冰片充分溶解,又维持了溶液整体的渗透压和pH值,使其更加接近生理状态下的眼内环境。冰片属于醇溶性晶体,难溶于水,对粘膜组织具有一定刺激性。本研究选择RH40-PEG400(8:2)混合溶液替代乙醇作为冰片的增溶剂,促进冰片充分溶解的同时,避免了乙醇对眼部组织刺激性和潜在损伤。同时选择离子型纤维素胶CMC-Na作为滴眼剂凝胶基质,该物质作为缓解干眼症的药物在临床已广泛应用,CMC-Na凝胶基质使用可以增加药物在眼球表面的停留时间,降低滴眼剂对角膜的刺激感,使患者用药的顺应性进一步提升。

[0029] (4) 本发明的药物对视网膜变性损伤具有很好的保护作用,将冰片与CNTF组联用发挥协同优势,视网膜变性的主要病理特点是视网膜细胞凋亡,而炎症反应是导致细胞凋亡的重要机制之一。冰片在古医典中记载具有清热明目功效,现代药理研究发现冰片具有很好的抗炎作用,除此之外,冰片促进了CNTF在视网膜中的分布,而许多研究已证实CNTF对视网膜神经细胞具有保护作用。我们的研究发现,从组织形态学、功能学角度冰片CNTF滴眼剂均显示了很好的保护作用,用药后视网膜组织形态接近正常组,视网膜细胞凋亡明显减轻,视网膜电图检查也显示出对动物模型的视功能有明显改善。单纯冰片滴眼剂组及单纯CNTF滴眼剂组作用较弱。

附图说明

[0030] 图1给药14天后各组明视ERG波形图,其中(a)正常组、(b)生理盐水组(模型组)、(c)CNTF滴眼剂组、(d)冰片滴眼剂组、(e)冰片CNTF滴眼剂组。

[0031] 图2给药14天后各组闪烁光ERG波形图,其中(a)正常组、(b)生理盐水组(模型组)、(c)CNTF滴眼剂组、(d)冰片滴眼剂组、(e)冰片CNTF滴眼剂组。

[0032] 图3给药14天后各组暗视ERG波形图,其中(a)正常组、(b)生理盐水组(模型组)、(c)CNTF滴眼剂组、(d)冰片滴眼剂组、(e)冰片CNTF滴眼剂组。

[0033] 图4给药14天后各组最大反应ERG波形图,其中(a)正常组、(b)生理盐水组(模型组)、(c)CNTF滴眼剂组、(d)冰片滴眼剂组、(e)冰片CNTF滴眼剂组。

[0034] 图5给药14天后各组OPs波形图,其中(a)正常组、(b)生理盐水组(模型组)、(c)CNTF滴眼剂组、(d)冰片滴眼剂组、(e)冰片CNTF滴眼剂组。

[0035] 图6各组视网膜HE染色(x400)。①正常组,②7天模型组,③14天模型组,④7天冰片滴眼剂组,⑤7天CNTF滴眼剂组,⑥7天冰片CNTF滴眼剂组,⑦14天冰片滴眼剂组,⑧14天CNTF滴眼剂组,⑨14天冰片CNTF滴眼剂组。

[0036] 图7各组视网膜TUNEL检测结果(x200)。①正常组,②7天模型组,③7天冰片滴眼剂组,④7天CNTF滴眼剂组,⑤7天冰片CNTF滴眼剂组,⑥14天模型组,⑦14天冰片滴眼剂组,⑧14天CNTF滴眼剂组,⑨14天冰片CNTF滴眼剂组。

具体实施方式

[0037] 为了更好地理解本发明,下面结合具体实施例对本发明作进一步的描述,其中实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,不构成对本发明保护范围的限制。另外本发明中使用的原料均为普通市售产品,因此不需要对其来源做具体限定。

[0038] 实施例1冰片CNTF滴眼剂制备

[0039] (1)凝胶基质滴眼液样品制备:称取羧甲基纤维素钠(CMC-Na)1.0g,加注射用水50g,搅拌使其分散均匀,室温放置过夜,加入剩余的注射用水49g,搅拌5-10min,静置即得1%CMC-Na凝胶基质备用。

[0040] (2)称取聚氧乙烯氢化蓖麻油40(RH40)1.336g,聚乙二醇400(PEG400)0.334g,搅拌10min混合均匀备用;

[0041] (3)称取冰片0.025g加入到步骤(2)中,搅拌使其完全溶解;

[0042] (4)称取CNTF 200 μ g用2mL磷酸缓冲盐(PBS)溶解,备用;

[0043] 将(3)、(4)加入到10g 1%CMC-Na凝胶中,搅拌10min使其分散均匀,然后再少量多次的加入1%CMC-Na 86.105g,搅拌使其分散均匀,调节pH值为6.0-8.0,即得冰片浓度为0.025%,CNTF浓度为2 μ g/mL滴眼液样品。

[0044] 将滴眼液样品置于孔径0.22 μ m滤膜过滤器中,无菌状态下分装入5mL滴眼剂专用储存瓶中,密封。

[0045] 实施例2不同浓度冰片对CNTF视网膜分布的影响

[0046] 将实验动物新西兰兔随机分为6组,生理盐水组、冰片滴眼剂组、CNTF滴眼剂组、不同浓度冰片CNTF滴眼剂组(冰片浓度0.025%、0.05%、0.1%),分别予以50 μ L相应的滴眼剂点眼,于给药前(0h)和给药后15分钟、30分钟、1小时、2小时后,每组随机选取5只家兔处死取视网膜,采用酶联免疫吸附法(ELISA)方法检测视网膜组织中CNTF含量,每个样本设三个复孔,取平均值。结果显示,给药15分钟,冰片组及空白组视网膜CNTF的含量测定结果是 2.8 ± 0.0 pg/mL、 4.3 ± 0.0 pg/mL,考虑是背景颜色所致。0.025%冰片CNTF、0.05%冰片CNTF、0.1%冰片CNTF及单纯CNTF组家兔视网膜内人源型CNTF浓度不同,其中0.025%冰片CNTF组最高,其次为0.1%冰片CNTF,0.05%冰片CNTF,及单纯CNTF组,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。给药30分钟时,各组视网膜内CNTF含量明显下降,各组之间相比趋势与给药15分钟时相同,表现为0.025%冰片CNTF组 $> 0.1\%$ 冰片CNTF $> 0.05\%$ 冰片CNTF $>$ 单纯CNTF组,

0.025%冰片CNTF组含量明显高于其他各组 ($P<0.05$)。给药1小时, 各组视网膜CNTF浓度继续下降, 0.025%冰片CNTF组含量仍为最高, 与其他组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。给药两个小时, 除单纯CNTF组含量略有增加, 其它三组含量加给药1小时下降, 各组浓度由高至低顺序依次为0.025%冰片CNTF组>单纯CNTF组>0.05%冰片CNTF>0.1%冰片CNTF, 但各组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。表-1不同时间点各组视网膜内CNTF含量

组别	15min	30min	1h	2h
冰片	2.8±0.0	2.8±0.0	2.8±0.0	2.8±0.0
CNTF	35.3±0.3	11.4±0.5	8.8±0.5	9.9±0.0
0.1%冰片 CNTF	39.9±0.6	16.5±0.3	10.4±0.4	9.6±0.63
[0047] 0.05%冰片 CNTF	35.9±0.6	14.4±0.4	6.4±0.4	9.8±0.12
0.025%冰片 CNTF	43.1±0.7 ^a	18.8±0.6 ^a	15.3±0.3 ^a	10.6±0.67 ^b
空白组	4.3±0.0	4.3±0.0	4.3±0.0	4.3±0.0
F	5.052	3.844	3.695	0.787
P	0.005	0.015	0.018	0.52

[0048] 注: 与其他各组相比, ^a $P<0.05$; 与CNTF组, 0.1%冰片CNTF, 0.05%冰片CNTF, CNTF组相比, ^b $P>0.05$ 。

[0049] 实施例3冰片CNTF滴眼剂对视网膜变性大鼠视网膜功能的影响

[0050] 采用40mg/kg碘酸钠尾静脉注射诱导视网膜变性大鼠模型, 将造模后的大鼠随机分为生理盐水组、冰片滴眼剂组、CNTF滴眼剂组、冰片CNTF滴眼剂组, 正常SD大鼠常规饲养作为对照, 每天点药4次, 每次10μL, 给药14天后予以视网膜电流图 (electroretinogram, ERG) 检测视网膜功能。大鼠暗适应后全身麻醉联合局部麻醉、散瞳, 使用动物保温装置, 采用大鼠专用环形角膜电极, 标准闪光刺激诱发视网膜综合电位, 通频带为: 0.1-1~300-1000Hz单次刺激。按视网膜电图五项测量, 记录数值。包括暗视ERG, 最大混合反应, 振荡电位 (OPs), 明视条件ERG, 闪烁光ERG。结果发现: 图1中给药14天后 (b) 生理盐水组 (模型组)、(c) CNTF滴眼剂组、(d) 冰片滴眼剂组、(e) 冰片CNTF滴眼剂组及 (a) 正常组明视ERG的b波波幅分别是 9.81 ± 2.61 , 9.23 ± 2.69 , 7.66 ± 2.36 , 17.97 ± 6.29 , 60.36 ± 14.79 , 各组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$), 其中, (e) 冰片CNTF滴眼剂组明显高于 (b) 生理盐水组、(d) 冰片滴眼剂组、(c) CNTF滴眼剂组 ($P<0.05$); 图2中给药14天后 (b) 生理盐水组 (模型组)、(c) CNTF滴眼剂组、(d) 冰片滴眼剂组、(e) 冰片CNTF滴眼剂组及 (a) 正常组闪烁光ERG波幅各组分别为 10.50 ± 1.97 , 10.70 ± 2.16 , 10.36 ± 4.46 , 20.15 ± 5.05 , 54.65 ± 9.79 , 其中, (e) 冰片CNTF滴眼剂组明显高于 (b) 生理盐水组、(d) 冰片滴眼剂组、(c) CNTF滴眼剂组 ($P<0.05$); 图3中给药14天后 (b) 生理盐水组 (模型组)、(c) CNTF滴眼剂组、(d) 冰片滴眼剂组、(e) 冰片CNTF滴眼剂组及 (a) 正常组各组暗视ERG的b波波幅分别为 16.74 ± 7.16 , 15.78 ± 6.46 , 18.61 ± 12.11 , 44.63 ± 9.78 , 337.18 ± 70.90 , (e) 冰片CNTF滴眼剂组明显高于 (b) 生理盐水组、(d) 冰片滴眼剂组、(c) CNTF滴眼剂组 ($P<0.05$); 图4中给药14天后 (b) 生理盐水组 (模型组)、(c)

CNTF滴眼剂组、(d)冰片滴眼剂组、(e)冰片CNTF滴眼剂组及(a)正常组各组最大反应a波波幅 10.61 ± 4.52 , 24.31 ± 8.46 , 13.37 ± 7.00 , 46.47 ± 5.65 , 148.06 ± 34.70 , (e)冰片CNTF滴眼剂组明显高于(b)生理盐水组、(d)冰片滴眼剂组、(c)CNTF滴眼剂组 ($P < 0.05$); 图5中给药14天后(b)生理盐水组(模型组)、(c)CNTF滴眼剂组、(d)冰片滴眼剂组、(e)冰片CNTF滴眼剂组及(a)正常组振荡电位(OPs)各组波幅分别为 10.00 ± 1.62 , 25.61 ± 3.05 , 11.20 ± 1.53 , 57.41 ± 18.65 , 134.66 ± 43.75 , (e)冰片CNTF滴眼剂组明显高于(b)生理盐水组、(d)冰片滴眼剂组、(c)CNTF滴眼剂组 ($P < 0.05$)。

[0051] 实施例4冰片CNTF滴眼剂对视网膜变性大鼠组织病理改变的影响

[0052] 采用40mg/kg碘酸钠尾静脉注射诱导视网膜变性大鼠模型, 将造模后的大鼠随机分为生理盐水组、冰片滴眼剂组、CNTF滴眼剂组、冰片CNTF滴眼剂组, 正常SD大鼠常规饲养作为对照, 每天点药4次, 每次10 μ L, 给药7天及14天时, 10%水合氯醛过量麻醉处死动物, 快速取出眼球置于4%多聚甲醛固定液中15-20min后, 从角膜缘剪开眼球、小心去除眼前节和部分玻璃体, 余下“眼杯”再次固定2h左右, 依次梯度酒精脱水、二甲苯透明后浸蜡包埋。连续4 μ m切片, HE染色后光学显微镜观察视网膜病理改变。结果发现: 图6中①正常组大鼠视网膜各层组织结构清晰, 细胞排列整齐, 其余各组大鼠视网膜呈现除不同程度排列紊乱, 波浪状改变, 部分区域视网膜色素上皮细胞及感光细胞较少, 与其他组相比, 图6中⑥冰片CNTF滴眼剂组及图6中⑨冰片CNTF滴眼剂组病变表现最轻, 各层结构基本清晰, 波浪状改变不明显, 细胞层数与正常组接近。

[0053] 实施例5冰片CNTF滴眼剂对视网膜变性大鼠视网膜细胞凋亡的保护作用

[0054] 过量麻醉处死大鼠快速摘取眼球, 于4%多聚甲醛液中4 $^{\circ}$ C固定, OCT包埋后液氮冷冻。冰冻切片机CM1850 (德国Leica公司) 在-23 $^{\circ}$ C下行垂直视网膜的8 μ m冰冻切片, 按照TUNEL试剂盒说明操作, 完成后进行DAPI染色, 抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜下观察, 比较各组视网膜感光细胞及视网膜色素上皮细胞凋亡率。结果发现: 图7中①正常组大鼠视网膜未见凋亡现象, 干预7天时, ②模型组、③冰片滴眼剂组、④CNTF滴眼剂组、⑤冰片CNTF滴眼剂组表现不同程度的细胞凋亡, 凋亡细胞分布在视网膜色素上皮层及内核层, 各组凋亡率分别为 $68.83 \pm 2.56\%$, $45.83 \pm 2.87\%$, $59.16 \pm 3.95\%$, $27.63 \pm 3.27\%$, 其中⑤冰片CNTF滴眼剂组凋亡率明显低于其他各组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 14天时, 各组凋亡率较7天时减少, 分别为 $46.80 \pm 2.67\%$, $29.23 \pm 1.69\%$, $38.46 \pm 2.16\%$, $19.67 \pm 2.31\%$, 其中⑨冰片CNTF滴眼剂组凋亡率仍然明显低于其他各组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

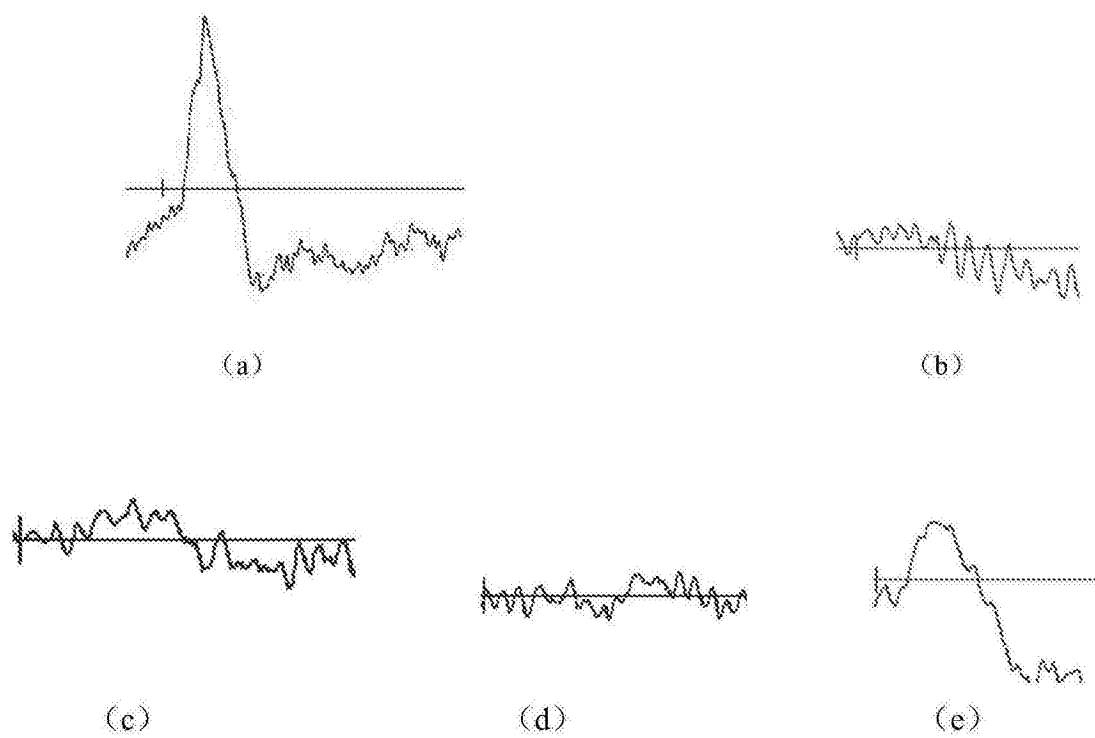


图1

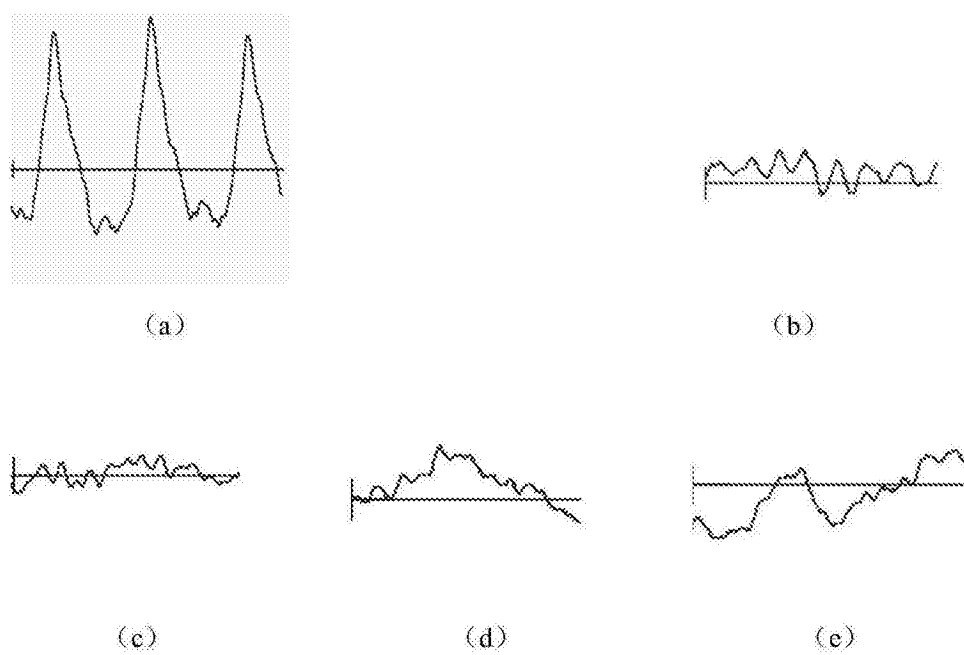


图2

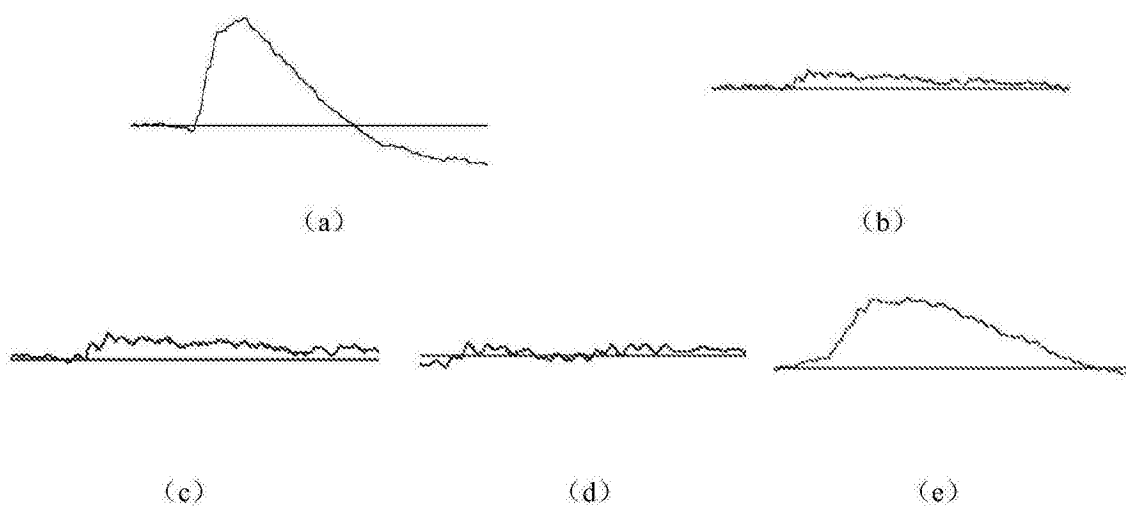


图3

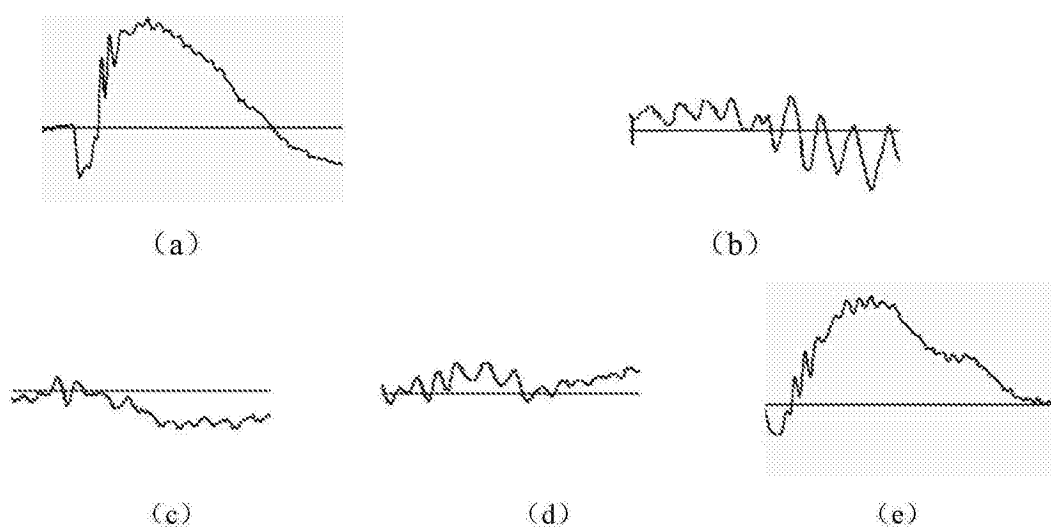


图4

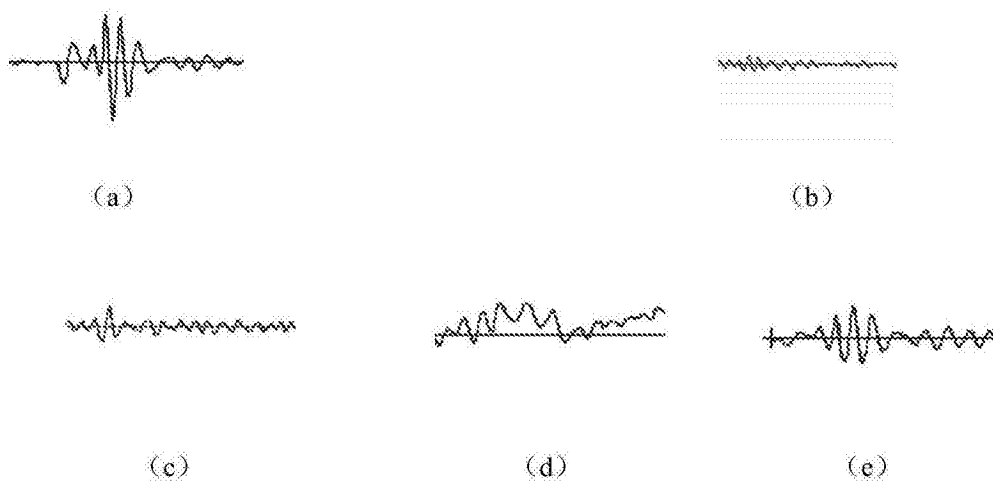


图5

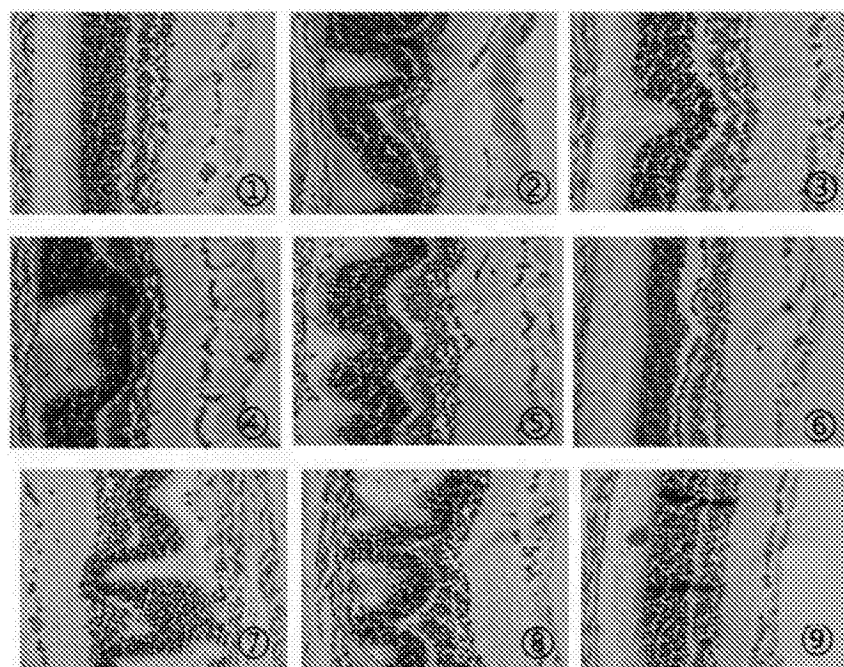


图6

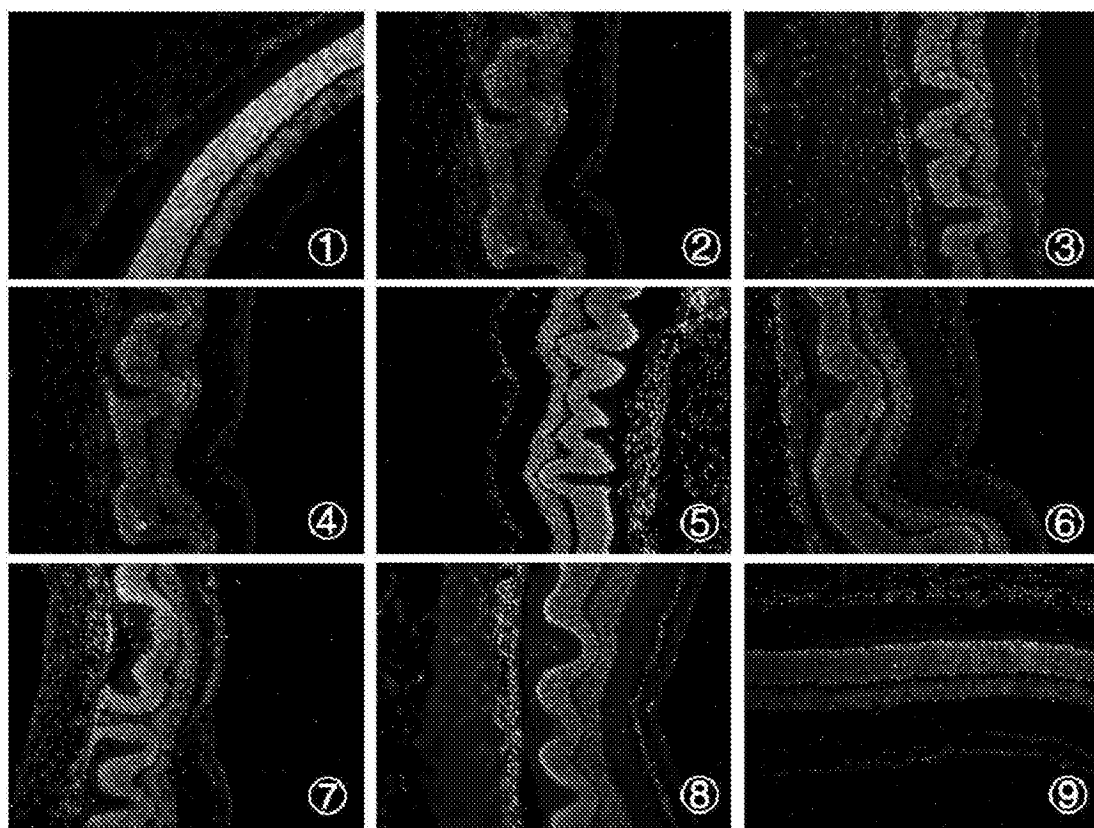


图7