

• 实验研究 •

蛭螭提取物对实验性兔视网膜静脉阻塞 不同时间窗 TIMP-2 表达的影响※

● 马骏旭^{1,2} 蒋鹏飞^{1,2} 彭俊^{2,3} 彭清华^{1,2,3▲}

摘 要 目的:评价蛭螭提取物对有色家兔视网膜静脉阻塞的不同时间窗治疗作用及其机制。方法:40 只兔随机分为 4 组,即空白组(A 组)、模型组(B 组)、复方血栓通组(C 组)、蛭螭提取物组(D 组),每组 10 只兔(20 只眼)。除空白组外,其余 3 组均用光化学动力法建立 RVO 动物模型,于给药后 1wk、3wk 行 FFA 检查、HE 染色、免疫组化 TIMP-2 染色,观察其结果。结果:(1)FFA 检查结果显示:造模后 1wk,B 组中央静脉荧光渗漏、出血,C、D 两组渗漏、出血较 B 组少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。造模后 3wk,B 组渗漏、出血的静脉周围出现无灌注区与新生血管;C 组渗漏、出血与 1wk 时相比明显减小,与 B 组相比有统计学差异($P < 0.05$);D 组渗漏、出血基本吸收,与 B 组相比有统计学差异($P < 0.05$),与 C 组相比无统计学差异($P > 0.05$)。 (2)视网膜切片光镜观察结果显示:D 组视网膜各层结构病理变化均轻于 B 组、C 组。 (3)TIMP-2 免疫组化结果示:造模后第 1wk:各造模组 TIMP-2 表达均高于 A 组,有统计学差异($P < 0.05$),B 组 TIMP-2 表达与 C、D 组相比,有统计学差异($P < 0.05$),而 C、D 组相比,无统计学差异($P > 0.05$)。造模后 3wk:各造模组视网膜组织中 TIMP-2 表达均有不同程度减弱,D 组的 TIMP-2 表达与 1wk 时相比有统计学差异($P < 0.05$);而 B 组、C 组的 TIMP-2 表达与 1wk 时相比无统计学差异($P > 0.05$);C、D 组 TIMP-2 表达均较 B 组强,有统计学差异($P < 0.05$),C、D 组相比,无统计学差异($P > 0.05$)。结论:蛭螭提取物能促进实验性视网膜静脉阻塞模型出血的吸收,改善视网膜缺血缺氧的状态,可以增强实验性视网膜静脉阻塞模型中 TIMP-2 的表达,从而可以抑制实验性新生血管的形成,其作用与复方血栓通相当。

关键词 视网膜静脉阻塞;视网膜新生血管;蛭螭提取物;TIMP-2

视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)是临床常见的视网膜血管病,目前尚无特效疗法,新生血管(RNV)是 RVO 的主要并发症。蛭螭首次记载于

《神农本草经》,可治疗目疾,有破血、行瘀、散结、明目之功。蛭螭提取物可促进 RVO 出血的吸收、抑制 RNV^[1-2],本文通过建立视网膜静脉阻塞的动物模型,进一步探讨了蛭螭对 RNV 的可能作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 选用 40 只健康有色家兔,不限雌雄,体重 1.8~2.3kg(合格证号:湘医动字第 30-015 号)。

1.2 主要实验药品和试剂 蛭螭提取物[制备方法参考阳长明的方法^[3],具体为:蛭螭 400g(湖南东润联合医药有限公司中药材部),清洗 10 遍以上,浸泡一晚,后洗至无臭味。加蒸馏水 5kg,加 37% HCl 至 PH 值为 2。高压蒸汽锅蒸 2 小时。纱布(4~5 层)过

※基金项目 国家自然科学基金面上资助项目(No. 30772824; No. 81574031);中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(No. 2017TP1018);长沙市科技计划项目(No. K1501014-31;No. kc1704005);中央财政支持地方高校建设项目;国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目;湖南省中医五官科学重点学科建设项目

▲通讯作者 彭清华,男,二级教授。研究方向:中医药防治眼底病、青光眼、眼表疾病。E-mail: pqh410007@126.com

• 作者单位 1. 湖南中医药大学(湖南长沙 410208);2. 中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室(湖南长沙 410208);3. 湖南中医药大学第一附属医院(湖南长沙 410007)

滤,溶液中加 40% NaOH 至 PH 值为 6.5~6.8。冷却后隔水加热,浓缩至 1600mL (1mL 溶液 = 0.25g 生药)。装瓶,压盖,蒸汽高温灭菌,冷藏保存。];复方血栓通片(扬州中惠制药有限公司,批号:B14002362976);25% 乌拉坦(上海伊卡生物技术有限公司,批号:MFCD00007966);20% 荧光素钠(上海伊卡生物技术有限公司,批号:71018944);一抗为兔抗 TIMP-2 多克隆抗体(武汉默沙克生物科技有限公司,批号:kt50111);二抗为生物素标记的 IgG(武汉默沙克生物科技有限公司,批号:kt600010)。

1.3 主要实验仪器 显微图象分析系统(Mias-2000 型)、凝胶成像系统[美国,Bio-Rad(Gel Doc XR+)]、电子秤(上海天平仪器厂,JY0001)、微量移液器[德国,ependorf(1ml/200ul/10ul)]、PCR 仪(德国,Biometra)、水平电转槽(北京六一仪器厂,DYCP-40C)、垂直板电泳槽(北京六一仪器厂,DYCZ-24D)、台式高速冷冻离心机(Thermo)、超纯水仪(millipore 公司)、恒温摇床(金坛,THZ-82A)、紫外可见分光光度计(上海 spectrum 公司,SP-752)、水平摇床(北京六一仪器厂,WD-9405B)。

2 实验方法

2.1 动物分组 将 40 只有色家兔按随机数字表法分为空白组(A 组)、模型组(B 组)、复方血栓通组(C 组)、蛭蟾提取物组(D 组),每组 10 只动物(20 只眼)。

2.2 造模方法 应用光化学动力法^[4]制作实验性 RVO 模型,B、C、D 组双眼散瞳后,麻醉动物,用激光对兔双侧视网膜静脉进行照射,同时避开伴行的动脉,看到有明显的远端静脉扩张时停止。

2.3 动物给药方法 A、B 组予生理盐水 5mL·Kg⁻¹

灌胃;C 组予复方血栓通 0.1g·kg⁻¹溶于生理盐水中制成混悬剂,5mL·Kg⁻¹灌胃;D 组予蛭蟾提取物 1.5mL·kg⁻¹灌胃。各组均为每日 1 次,持续至造模后 3wk,于造模后 1wk、3wk 每组各随机处死 5 只动物。

2.4 取材方法 兔子处死后,摘除眼球,视网膜组织经酒精脱水、石蜡包埋后,做 4μm 厚的切片,烘干备用。

2.5 检测方法

2.5.1 荧光素眼底血管造影(FFA) 造模后 1wk、3wk 对兔行 FFA 检查,使用 Mias-2000 型显微图象分析系统测量无灌注区(non perfusion area, NPA)和视盘(optic disk, OD)的面积并求出比值($S = N/D$)^[5]。分为有无灌注区、无新生血管(甲类)和有无灌注区、有新生血管(乙类)。

2.5.2 光镜观察方法 将取材的切片染色,做免疫组化组织学检测 TIMP-2 表达,在光学显微镜下主要观察视网膜组织变化。

2.6 统计学方法 采用 SPSS21.0 软件进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

3 结果

3.1 FFA 检查结果 造模后 1wk, B 组中央静脉荧光渗漏、出血, C、D 两组渗漏、出血较 B 组少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。造模后 3wk, B 组渗漏、出血的静脉周围已经出现无灌注区与新生血管; C 组渗漏、出血与 1wk 时相比明显减小,与 B 组相比有统计学差异($P < 0.05$); D 组渗漏、出血基本吸收,与 B 组相比有统计学差异($P < 0.05$),与 C 组相比无统计学差异($P > 0.05$)。S = N/D 结果见表 1。

表 1 各组不同时间窗 S = N/D 的平均值结果($\bar{x} \pm s$)

组别	甲类		乙类	
	1wk	3wk	1wk	3wk
A 组	0*	0*	0	0*
B 组	16.34 ± 3.51	19.42 ± 2.69	0	31.23 ± 4.04 [#]
C 组	11.88 ± 2.14*	4.18 ± 1.75**	0	0*
D 组	9.79 ± 1.87*	2.90 ± 1.50**	0	0*

注:与 B 组比较,* $P < 0.05$;与 1wk 时相比,[#] $P < 0.05$

3.2 HE 染色结果 A 组:视网膜各层结构清晰,细胞排列正常。B 组:造模后 1wk,视网膜组织水肿,细胞排列较乱,尚无新生血管索;造模后 3wk,出现大量的新生血管索。C 组:造模后 1wk,视网膜组织水肿,细胞排列紊乱;造模后 3wk,视网膜组织水肿减轻,无新生血管索。D 组:造模后 1wk,视网膜组织水肿,细胞排列大致清晰;造模后 3wk,视网膜组织水肿减轻,无新生血管索。见图 1。

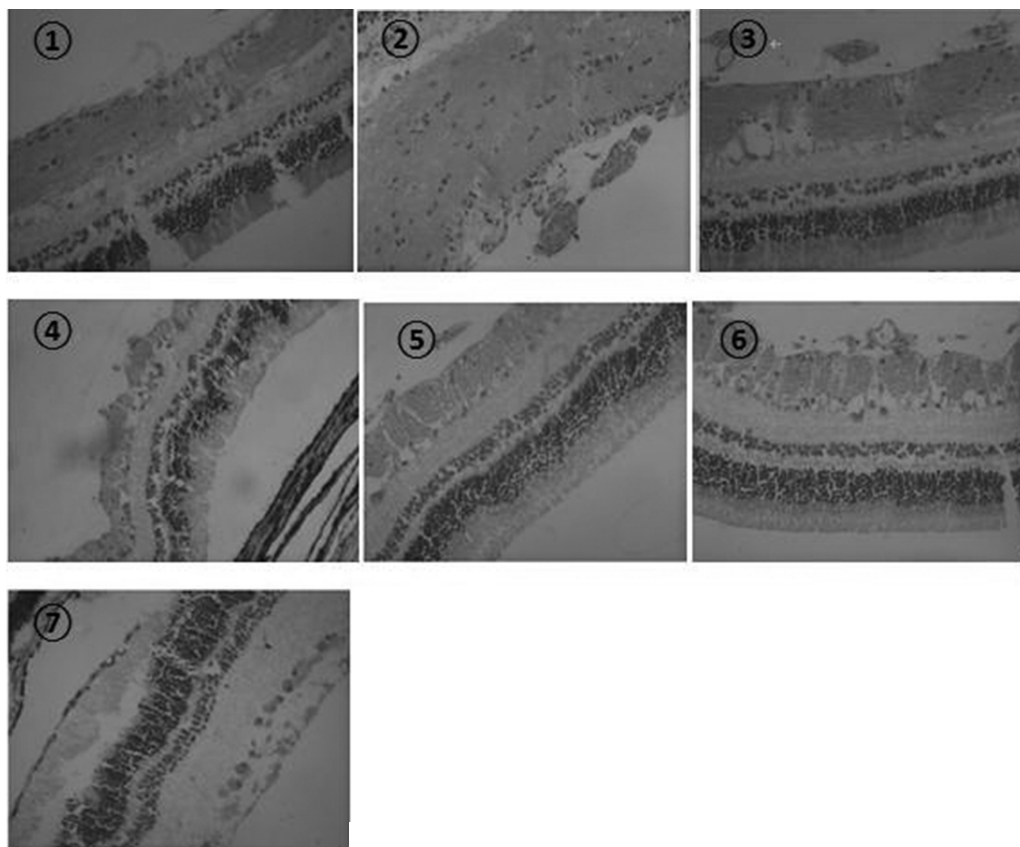


图 1 各组视网膜组织 HE 染色(×400)

注:①-⑦分别表示 A 组正常视网膜、B 组造模后 1wk、B 组造模后 3wk、C 组造模后 1wk、C 组造模后 3wk、D 组造模后 1wk、D 组造模后 3wk 的视网膜 HE 染色结果。

3.3 TIMP-2 染色结果 造模后第 1wk:各造模组 TIMP-2 表达均高于 A 组,有统计学差异($P < 0.05$),B 组 TIMP-2 表达与 C、D 组相比,有统计学差异($P < 0.05$),而 C、D 组相比,无统计学差异($P > 0.05$)。造模后 3wk:各造模组视网膜组织中 TIMP-2 表达均有不同程度减弱,D 组的 TIMP-2 表达与 1wk

时相比有统计学差异($P < 0.05$);而 B 组、C 组的 TIMP-2 表达与 1wk 时相比无统计学差异($P > 0.05$);C、D 组 TIMP-2 表达均较 B 组强,有统计学差异($P < 0.05$),C、D 组相比,无统计学差异($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 TIMP-2 阳性表达的平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1wk	3wk
A 组	10	0.0963 ± 0.02387	0.0950 ± 0.02449
B 组	10	0.1563 ± 0.03021 [◇]	0.1488 ± 0.03227 [◇]
C 组	10	0.2088 ± 0.05842 ^{◇▲}	0.1863 ± 0.03378 ^{◇▲}
D 组	10	0.2437 ± 0.05153 ^{◇▲}	0.1925 ± 0.04132 ^{◇▲★}

注:与 A 组比较,[◇] $P < 0.05$;与 B 组比较,[▲] $P < 0.05$;与 1wk 时比较,[★] $P < 0.05$

4 讨论

视网膜静脉阻塞(RVO)是仅次于糖尿病视网膜病变的第二大致盲性视网膜血管病^[6-8],发病率较高,但目前尚不明其发生机制^[9-12]。

蛭蟥是金龟子的幼虫,《神农本草经》曰:“主恶血瘀痹气,破折血在胁下坚满痛,月闭,目中淫肤,青翳白膜。”《本草纲目》言其性微温,味咸,有破血、行瘀、散结、通乳、解毒、消疮、明目的功能。现代药理研究发现蛭蟥对视网膜静脉阻塞所致的视网膜缺血缺氧状态有改善作用^[1-2],能够治疗视网膜静脉阻塞所致的视网膜病理损伤。

金属蛋白酶(MMPs)家族包括多个结构相似、能够消化基质和基膜的酶^[13-17],在视网膜静脉阻塞后并发现视网膜新生血管的过程中,此家族蛋白可诱导新生血管的靶基因 MicroRNA-188-5p^[18]在新生血管的基底膜大量表达,迁移至内皮形成新生血管。而金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)家族是一组能抑制MMPs活性的多功能因子,通过对MMPs的抑制,在正常视网膜组织改建和各种病理过程中发挥重要作用。TIMP-2是21kD的非糖基化蛋白,含有192个氨基酸残基,对MMPs家族介导的新生血管形成有特别的抑制作用。李贞等^[19]研究表明:TIMPs可抑制视网膜病的血管新生,机制可能是抑制了TIMP-2对VEGF的抑制作用。希望通过对TIMPs的研究,可以为视网膜新生血管及纤维增殖的治疗寻找一条新的途径。

本实验通过对FFA检查结果的分析发现,蛭蟥提取物组实验兔RNV生成情况明显低于模型组。HE染色光镜观察结果显示,蛭蟥提取物组视网膜组织损伤程度减轻,出血、渗出、水肿等病理改变均较模型组明显减轻,而与复方血栓通组相比无明显差别,说明蛭蟥提取物能促进实验性RVO模型出血的吸收,改善视网膜缺血缺氧的状态,可以增强实验性RVO模型中TIMP-2的表达,从而可以抑制实验性RNV的形成,与复方血栓通有相当的作用。

参考文献

- [1] 邱晓星,彭清华,陈梅,等. 蛭蟥提取物对兔脉络膜新生血管中Ang1和PEDF表达的影响[J]. 国际眼科杂志,2012,12(11):2053-2058.
- [2] 张波涛,彭清华,叶群如,等. 蛭蟥提取物对兔视网膜静脉阻塞模型视网膜组织ET-1表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2012,32(9):8-11.
- [3] 阳长明,侯世祥,罗英杰,等. 蛭蟥滴眼液中氨基酸成分的测定[J].

湖南中医杂志,2001,32(1):57-59.

- [4] 陈立军,王雨生. “二步法”激光诱导脉络膜视网膜静脉吻合术治疗兔视网膜中央静脉阻塞的视觉电生理变化[J]. 眼科新进展,2006,26(4):253.
- [5] 唐坤,李素芬. 视网膜分支静脉阻塞无灌注区范围、视野阈值与新生血管关系的研究[D]. 国际眼科杂志,2009,9(6):15-16.
- [6] Wolf-Schnurrbusch U E K. Retinal Vein Occlusion[M]//Spectral Domain Optical Coherence Tomography in Macular Diseases. Springer, New Delhi, 2017:147-150.
- [7] Goldenberg D, Loewenstein A. Retinal Vein Occlusion[M]//Medical Retina. Karger Publishers, 2017,9:32-41.
- [8] Jonas J B, Monés J, Glacet-Bernard A, et al. Retinal vein occlusions[M]//Macular Edema. Karger Publishers, 2017,58:139-167.
- [9] Starr M R, Norby S M, Scott J P, et al. Acute retinal vein occlusion and cystic fibrosis[J]. International journal of retina and vitreous, 2018,4(1):26.
- [10] Prajapati V A, Vasavada D, Patel S M, et al. A study of evaluation of various risk factors of retinal vein occlusion[J]. International Journal of Research in Medical Sciences, 2017,2(3):1054-1057.
- [11] Bucciarelli P, Passamonti S M, Gianniello F, et al. Thrombophilic and cardiovascular risk factors for retinal vein occlusion[J]. European journal of internal medicine, 2017,44:44-48.
- [12] Winegarner A, Wakabayashi T, Hara-Ueno C, et al. Retinal microvasculature and visual acuity after intravitreal aflibercept in eyes with central retinal vein occlusion: an optical coherence tomography angiography study[J]. Retina, 2018,38(10):2067-2072.
- [13] Suna N I, Liu J. Expressions of MMPs, TIMPs and TLR in the fetal membrane tissues of patients with PROM[J]. Hebei Medical Journal, 2018.
- [14] Carpio L R, Bradley E W, Westendorf J J. Histone deacetylase 3 suppresses Erk phosphorylation and matrix metalloproteinase (Mmp)-13 activity in chondrocytes[J]. Connective tissue research, 2017,58(1):27-36.
- [15] Manicone A M, Gharib S A, Gong K Q, et al. Matrix Metalloproteinase-28 is a key contributor to emphysema pathogenesis[J]. The American journal of pathology, 2017,187(6):1288-1300.
- [16] Lebre M C, Vieira P L, Tang M W, et al. Synovial IL-21/TNF-producing CD4+ T cells induce joint destruction in rheumatoid arthritis by inducing matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synovocytes[J]. Journal of leukocyte biology, 2017,101(3):775-783.
- [17] Naveed S, Clements D, Jackson D J, et al. Matrix metalloproteinase-1 activation contributes to airway smooth muscle growth and asthma severity[J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2017,195(8):1000-1009.
- [18] Hou H, Gao F, Liang H, et al. MicroRNA-188-5p regulates contribution of bone marrow-derived cells to choroidal neovascularization development by targeting MMP-2/13[J]. Experimental eye research, 2018.
- [19] 李贞,倪卫杰. GM6001抑制视网膜新生血管形成VEGF和MMP2的表达[J]. 国际眼科杂志,2008,8(2):268-271.

(收稿日期:2018-11-24)

(本文编辑:金冠羽)