

· 实验研究 ·

蛭螭提取物对实验性兔视网膜静脉阻塞 HGF、VEGF 表达的影响[※]

● 梁凯霞^{1,2} 蒋鹏飞^{1,2} 彭俊^{2,3} 彭清华^{1,2,3▲}

摘要 目的:评价蛭螭提取物对兔视网膜静脉阻塞的治疗作用及其机制。方法:将 40 只兔随机分为空白组、模型组、复方血栓通组、蛭螭提取物组各 10 只,除空白组外,其余 3 组均用光化学动力法建立视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)动物模型,于给药后 1wk、3wk 行 HE 染色、免疫组化观察 HGF、VEGF 表达。结果:各造模组 HGF 与 VEGF 表达与空白组相比均上调,蛭螭提取物组与复方血栓通组表达最弱,模型组表达最强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:蛭螭提取物可改善视网膜缺血缺氧的状态,抑制 RVO 模型中 HGF、VEGF 的表达。

关键词 视网膜静脉阻塞;视网膜新生血管;蛭螭提取物;HGF;VEGF

视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)发病率高,多发于 50~70 岁中老年人,发病率无明显性别差异,常单眼发病,以视网膜静脉怒张迂曲为特征,受累静脉区域有广泛的出血、渗出或水肿。新生血管(CNV)是 RVO 的常见并发症,治疗困难,严重影响视功能,约 15% 的患者并发新生血管性青光眼。

蛭螭具有破瘀、散结、止痛、解毒之功,《药性论》言其“汁滴目中,去翳障,主血,止痛”。因此,蛭螭常用于目疾的治疗。前期研究发现蛭螭提取物可促进 RVO 出血的吸收、抑制 CNV 的形成^[1-2],但具体作用机制尚不明确。为进一步探讨蛭螭抑制 CNV 的作用机制,本文观察了蛭螭提取物对 RVO 模型 HGF、

VEGF 表达的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 选取 40 只体重为 1.8~2.3kg 的健康实验性兔,不限雌雄(动物许可证号:湘医动字第 30-015 号)。

1.2 主要实验药品和试剂 蛭螭提取物(参考阳长明的方法^[3]制备);复方血栓通片;0.4% 倍诺喜滴眼液;兔抗 HGF 多克隆抗体、兔抗 VEGF 多克隆抗体(均由武汉博士德生物工程有限公司提供)。

1.3 主要实验仪器 裂隙灯显微镜(苏州六六视觉科技有限公司,型号:YZ5S);YZZOT 型显微镜(苏州医疗器械设备厂);PCR 仪(德国 Biometra);Mias-2000 图形分析系统(四川川大智胜软件股份有限公司);Leica 石蜡切片机(徕卡,型号 RM2235)。

2 实验方法

2.1 动物分组 采用随机数字表法将 40 只实验性兔随机分为空白组、模型组、复方血栓通组、蛭螭提取物组 4 个组,每组均为 10 只动物。

2.2 造模方法 模型组、复方血栓通组、蛭螭提取物组动物应用光化学动力法^[4]制作实验性 RVO 模型,具体操作为:双眼散瞳后,麻醉动物,将动物头固定于裂隙灯前,安置三面镜,以裂隙灯显微镜观察动物眼

※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咽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)

底,激光器指示光斑定位于视盘边缘的静脉后,自动物耳缘静脉缓慢推入 20% 荧光素钠注射液(0.3mL/kg),30s 内推完,注药后用激光照射双侧视网膜静脉,同时注意避开伴行的动脉,远端静脉有明显的扩张时即为造模成功。

2.3 动物给药方法 空白组、模型组以蒸馏水 5mL/kg 灌胃;复方血栓通组以复方血栓通 0.1g/kg 溶于蒸馏水中制成混悬剂,5mL/Kg 灌胃;蛭螭提取物组以蛭螭提取物 0.56g/100g 灌胃。每日 1 次,持续至动物取材。于造模后 1wk、3wk 每组各随机处死 5 只动物取材。

2.4 取材方法 将实验性兔耳缘静脉注射空气处死后,摘除两只眼球,在手术显微镜下去除眼前节及玻璃体等多余组织,剥离激光斑部位视网膜,酒精脱水,石蜡包埋,切片,烘干备用。

2.5 测试检测 将取材的切片行苏木精-伊红染色,做免疫组化组织学检测 HGF 与 VEGF 表达,每张切片均选取免疫组化阳性染色最多的 4 个视野框,用 Mias-2000 图形分析系统测量视野框内 HGF 与 VEGF 的平均光密度,在光学显微镜下主要观察视网膜组织变化。

2.6 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行分析,数

据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 则认为差异有统计学意义。

3 结果

造模后 1wk:空白组视网膜各层结构清晰,排列正常,HGF 与 VEGF 少量表达于视网膜,与模型组、复方血栓通组、蛭螭提取物组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组视网膜组织水肿,细胞排列较乱,尚无新生血管索,HGF 与 VEGF 大量表达于视网膜,与复方血栓通组、蛭螭提取物组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);复方血栓通组、蛭螭提取物组视网膜组织水肿,细胞排列紊乱,HGF 与 VEGF 少量表达于视网膜,两组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后 3wk:空白组 HGF 与 VEGF 表达与造模后 1wk 时相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);模型组出现大量的新生血管索,但 HGF 与 VEGF 表达与造模后 1wk 时相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);复方血栓通组、蛭螭提取物组视网膜组织水肿减轻,无新生血管索,HGF 与 VEGF 表达均较造模后 1wk 下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、表 1。

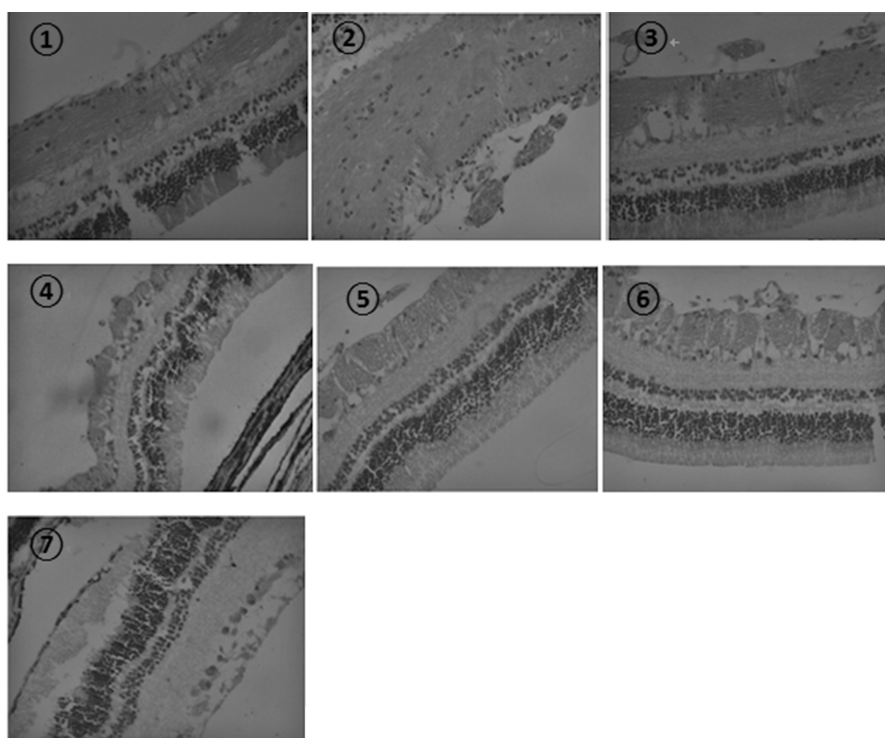


图 1 各组视网膜组织光镜图(HE, ×400)

注:①-⑦分别表示空白组、模型组给药后 1 周、模型组给药后 3 周、复方血栓通组给药后 1 周、复方血栓通组给药后 3 周、蛭螭提取物组给药后 1 周、蛭螭提取物组给药后 3 周视网膜 HE 染色。

表 1 各组 HGF 与 VEGF 阳性表达的平均光密度值($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	1wk		3wk	
	HGF	VEGF	HGF	VEGF
空白组	0.2112 ± 0.0136	0.1726 ± 0.0109	0.2075 ± 0.0149	0.1679 ± 0.0096
模型组	0.6537 ± 0.02623 [△]	0.4250 ± 0.0200 [△]	0.6212 ± 0.0768 [△]	0.5087 ± 0.0136 [△]
复方血栓通组	0.4162 ± 0.0160 ^{△◇}	0.3472 ± 0.1040 ^{△◇}	0.3075 ± 0.0149 ^{△◇▲}	0.2762 ± 0.0169 ^{△◇▲}
蛭螭提取物组	0.4075 ± 0.1640 ^{△◇}	0.3188 ± 0.0173 ^{△◇}	0.3062 ± 0.1697 ^{△◇▲}	0.2562 ± 0.0075 ^{△◇▲}

注:与空白组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较:[◇] $P < 0.05$;与 1wk 时比较:[▲] $P < 0.05$ 。

4 讨论

视网膜静脉阻塞发生后,血液回流障碍,视网膜代偿性形成新生血管^[5-7],新生血管管壁仅有一层细胞构成,极易发生出血^[8-9],引起视力下降,持续的出血会对视网膜造成毒性损伤^[10-11]。现代药理研究认为蛭螭能够治疗 RVO 所致的视网膜病理损伤^[1-2]。

视网膜静脉阻塞属祖国医学“络瘀暴盲”范畴,《银海精微·肾经主病》认为本病病机为“属相火上浮,水不能制。”《银海指南·血病论》曰:“目得血而能视,血者气之所化也。故血盛则形强,人生所赖,惟斯而已。润经络,泽脏腑,养筋骨,充满一身,而目受其荫,固宜通疏,而不宜淤滞者也。”本病的发生与血液瘀滞密切相关,而蛭螭有活血化瘀之功,切中本病病机。

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)最先从肝脏部分切除的鼠血清中分离出来,而后从鼠的血小板、肝脏及人的血清中分离出来,所以命名为肝细胞生长因子^[13]。在眼部,HGF 可由多种细胞产生,刺激眼内多种细胞组织的生长和移行。多项研究^[13-15]均说明 HGF 确实能介导视网膜新生血管形成。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)可促进血管内皮细胞分裂,促进新生血管生成^[16]。

本研究结果显示:模型组 HGF、VEGF 表达较空白组明显上调,复方血栓通组与蛭螭提取物组较模型组均有不同程度降低,但复方血栓通组与蛭螭提取物组相比,无统计学差异($P > 0.05$),两组的 CNV 产生均少于模型组,提示复方血栓通组、蛭螭提取物组是通过下调 HGF、VEGF 以抑制 CNV 的发生。本研究也存在不足之处,如未将蛭螭按剂量分为不同组别,蛭螭对 HGF 与 VEGF 的抑制作用是否与剂量有关仍不得而知。如能进行深入研究,则有望为临床寻找疗效更佳、价格更低廉的药物,创造更大的社会效益与经济

效益。

参考文献

- [1] 邱晓星,彭清华,陈梅,等. 蛭螭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. 蛭螭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. 蛭螭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] Wolf-Schnurrbusch U E K. Retinal Vein Occlusion[M]. Spectral Domain Optical Coherence Tomography in Macular Diseases. Springer, New Delhi,2017:147-150.
- [6] Goldenberg D, Loewenstein A. Retinal Vein Occlusion[M]. Medical Retina. Karger Publishers,2017:32-41.
- [7] Jonas J B, Monés J, Glacet-Bernard A, et al. Retinal vein occlusions[M]. Macular Edema. Karger Publishers,2017,58:139-167.
- [8] 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):26-37.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Nakabayashi M, Morishita R, Nakagami H, et al. HGF/NK4 inhibited VEGF-induced angiogenesis in vitro cultured end the lailcell and invivo rabbit model. Diabetologia[J]. BMC Cell Biol,2003,46(1):115-123.
- [13] Behar-cohen F, Touchard E, Polak M B. Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of an ocular disease in a subject; U. S. Patent 9,586,045[P]. 2017-3-7.

(下转第 65 页)

经脉、祛邪散表、助阳化气之功。同时,易丸剂为汤剂,取其“丸者,缓也;汤者,荡也”之理。二诊时患者关节疼痛缓解,故去辛温解表止痛之羌独活,以防散表太过,伤及精血;加白术、薏苡仁以加强健脾利湿;加川芎一味,《神农本草经》言其:“主寒痹,筋脉缓急……”,其味辛性阳,能活血行气,为“血中之气药”,以防大队补阴药阴凝粘滞。三四诊时,患者诸症大减,惟稍劳累后肌肉胀痛、乏力甚,故加重黄芪、党参、附子用量;加补骨脂、桑寄生以增强补益肝肾之功;并加用青风藤,其味苦辛、性平,功善祛风通络,《本草汇言》言其:“散风寒湿痹之药也,能舒筋活血,正骨利髓,故风病软弱无力,并劲强偏废之证,久服常复,大建其功。”

雷公藤为卫矛科雷公藤属植物,具有清热解毒、祛风除湿、舒筋活血、消肿止痛之功,长期被用

来治疗风湿病。黄藤浸膏片为洪湖市中医医院雷公藤带皮全根院内制剂,临床作为植物类改善病情抗风湿药(DMARDs)使用已逾40年历史。现代研究显示雷公藤具有抗炎、抗免疫、抗肿瘤等多种功效^[5]。雷公藤用于治疗类风湿关节炎等自身免疫性疾病疗效明显^[6]。然临床用于治疗特发性炎性肌病却少见报道。此案采用病证结合,辨证遵仲景“但见一证便是,不必悉具”之旨,牢牢抓住脾肾两虚之关键,以右归丸为主方,重在补肾,资先天以助后天,即徐镛在《医学举要》所云:“……补右肾之元阳,即以培脾胃之生气也”,将补益脾肾贯穿始终;辨病大胆使用雷公藤,取得较好疗效,这可能与其强大的抗炎、抑制免疫及类激素样作用有关,但雷公藤存在消化道不适、血液系统及肝肾损害、生殖毒性等不良反应,

临床需密切监测其副作用,并进一步进行远期疗效观察和相关机制研究。

参考文献

- [1] 张巍. 特发性炎性肌病诊断发展历程[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2016, 16(10): 651-655.
- [2] 袁云. 特发性炎性肌病进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2016, 6(10): 647-650.
- [3] 张奉春, 栗占国. 内科学: 风湿免疫科分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 70-71.
- [4] 戴娜, 何兰, 胡晶, 等. “脾主肌肉”的理论探讨及其临床意义[J]. 中医杂志, 2018, 59(2): 95-99.
- [5] 胡攀勇, 李振麟, 濮社班, 等. 雷公藤研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2013, 2(2): 1-3.
- [6] Zhou Y Z, Zhao L D, Chen H, et al. Comparison of the impact of Tripterygium wilfordii Hook F and Methotrexate treatment on radiological progression in active rheumatoid arthritis: 2-year follow up of a randomized, non-blinded, controlled study. [J]. Arthritis Research & Therapy, 2018, 20(1): 70.

(收稿日期: 2019-02-12)

(本文编辑: 蒋艺芬)

(上接第 68 页)

[14] Golocheikine A, Tiriveedhi V, Angaswamy N, et al. Cooperative signaling for angiogenesis and neovascularization by VEGF and HGF following islet transplantation[J]. Transplantation, 2010, 90(7): 725-731.

[15] Gómez-Mauricio G, Moscoso I, Martín-Cancho M F, et al. Combined administration of mesenchymal stem cells overexpressing IGF-1 and HGF

enhances neovascularization but moderately improves cardiac regeneration in a porcine model[J]. Stem cell research & therapy, 2016, 7(1): 94.

[16] ZHU Y, SUN L, ZHANG H, et al. Effects of isorhamnetin on protein expression of VEGF, MMP-2 and Endostatin in Lewis lung cancer mouse [J]. Int J Clin Exp Med, 2017, 10(8): 11488-11495.

(收稿日期: 2019-03-07)

(本文编辑: 蒋艺芬)

欢迎订阅《中医药通报》杂志

邮发代号: 34-95