

· 药理 ·

滋阴地黄丸对兔脉络膜组织中血管内皮生长因子、 整合素及组织因子表达的影响

王志刚, 胡春萍, 曹鹏, 杨杰, 郑全喜, 王伟*, 孙利
(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] **目的:**研究滋阴地黄丸对兔脉络膜组织中血管内皮生长因子(VEGF),整合素($\alpha V\beta 3$),组织因子(TF)表达的影响。**方法:**用激光凝建立脉络膜新生血管(CNV)动物模型,将动物分为4组,分别为空白对照组、模型对照组、滋阴地黄丸高、低剂量组($39, 9.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续ig 30 d后取右眼球进行免疫组织化学染色,测定脉络膜中VEGF, $\alpha V\beta 3$, TF的表达。**结果:**模型对照组兔眼脉络膜组织中VEGF, $\alpha V\beta 3$, TF均呈强阳性表达,滋阴地黄丸低、高剂量组中VEGF, $\alpha V\beta 3$, TF则呈弱阳性或阴性表达。与模型组比较,滋阴地黄丸低剂量组明显抑制兔脉络膜中VEGF的表达($P < 0.05$),显著地抑制了 $\alpha V\beta 3$ 和TF的表达($P < 0.01$),滋阴地黄丸高剂量组也显著地抑制了VEGF, $\alpha V\beta 3$ 和TF的表达($P < 0.01$)。**结论:**滋阴地黄丸通过抑制脉络膜中VEGF, $\alpha V\beta 3$, TF的表达而抑制了CNV的形成。

[关键词] 滋阴地黄丸; 脉络膜新生血管; 血管内皮生长因子; 整合素; 组织因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0160-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0934.020.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 9:34

Effects of Ziyin Dihuang Wan on the Expression of VEGF, $\alpha V\beta 3$ and TF in Rabbit Choroid Tissue

WANG Zhi-gang, HU Chun-ping, CAO Peng, YANG Jie, ZHENG Quan-xi, WANG Wei*, SUN Li
(Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Jiangsu Province Institute
of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Ziyin Dihuang Wan on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), integrin ($\alpha V\beta 3$) and tissue factor (TF) in rabbit choroids tissue. **Method:** Choroidal neovascularization (CNV) model was induced by laser, and then administrated with $9.75, 39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Ziyin Dihuang Wan for 30 days and then rabbit eyeballs were performed with immunohistochemical staining for determination of the expression of VEGF, $\alpha V\beta 3$ and TF in choroid. **Result:** Compared with the strongly positive expression of VEGF, $\alpha V\beta 3$ and TF in model group rabbit choroidal tissue, the expression of VEGF and $\alpha V\beta 3$ and TF was weakly positive in low, high dose Ziyin Dihuang Wan treatment groups. Ziyin Dihuang Wan at $9.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose inhibited the expression of VEGF, $\alpha V\beta 3$ and TF significantly ($P < 0.05$). Ziyin Dihuangwan at $39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose inhibited the expression of VEGF, $\alpha V\beta 3$ and TF significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** Ziyin Dihuang Wan inhibited CNV by inhibiting the expression of VEGF, $\alpha V\beta 3$ and TF in rabbit choroids tissue.

[Key words] Ziyin Dihuang Wan; CNV; VEGF; $\alpha V\beta 3$; TF

[收稿日期] 20120511(014)

[基金项目] 孟河医派方药传承及开发研究(BM2008152-KF04)

[第一作者] 王志刚, 副研究员, Tel:025-52362104, E-mail:wzjmsg@sina.com

[通讯作者] * 王伟, 主任医师, 研究员, 硕士生导师, Tel:025-52362104, E-mail:jsxw63@126.com

“视昏瞻渺”眼底病相当于西医学所说的中心性浆液性脉络膜视网膜病变(中浆)、中心性渗出性脉络膜视网膜病变(中渗)、渗出型年龄相关性黄斑变性等。本病的发病机制还未完全阐明,目前尚无有效的药物治疗方法,该病成了亟待解决的难题和热点。目前很多研究表明脉络膜新生血管(CNV)的形成是引起“视昏瞻渺”眼底病的重要原因,针对该病的发病机制采用合适的药物抑制CNV的形成对于该病的治疗和预防具有重要意义。目前“视昏瞻渺”眼底病尚无专门的动物模型,脉络膜新生血管(CNV)是渗出型年龄相关性黄斑变性的主要临床表现和致盲因素,本实验用激光光凝建立CNV动物模型,来观察费氏方剂-滋阴地黄丸对CNV动物模型细胞因子VEGF, $\alpha V\beta 3$, TF表达的变化,探索其对“视昏瞻渺”眼底病的作用机制,为临床最终攻克该病提供科学的理论依据和实验基础。

1 材料

1.1 动物 新西兰兔,雌雄各半,共24只,体重(2.0 ± 0.2) kg,购于金陵种兔场,合格证号SCXK(苏)2007-0004。

1.2 药物 滋阴地黄丸,由熟地黄30 g,生地黄50 g,柴胡30 g,黄芩15 g,当归15 g,天冬10 g,地骨皮10 g,五味子10 g,黄连10 g,人参5 g,枳壳5 g,甘草5 g组成,采用传统工艺制备方法制备,地骨皮、黄连加75%乙醇回流提取2次,每次加药材10倍量乙醇,过滤,滤液回收(60℃),放置备用;黄芩、五味子加75%乙醇回流提取2次,每次加药材10倍量乙醇,过滤,滤液回收(60℃),放置备用;其他药材加水提取2次,每次加药材10倍量乙醇,过滤,取滤液(60℃),高速离心,离心液继续浓缩。将上述药液合并,浓缩成所需浓度(含生药 $19.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),由江苏省中西医结合医院制剂室提供。

1.3 试剂 3.5%戊巴比妥钠(购自默克公司),0.5%美多丽P滴眼液,0.4%倍诺喜。

1.2.3 抗体 免疫组织化学用抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司,抗体货号分别为血管内皮生长因子(VEGF)bs-1313R,组织因子(TF)17435-1-AP,整合素($\alpha V\beta 3$)BS-1310R。

1.3 仪器 lumenis532型眼底激光机(美国科医人公司),显微镜(日本Olympus公司),Excelsion脱水机,Shandon包埋机,RM2235切片机,(均为美国Thermo公司)。TIPAS-88图像分析系统(武汉千屏影像公司)。

2 方法

2.1 动物模型制作^[1] 24只兔中随机选取6只作为正常组,剩余18只兔以0.5%美多丽P滴眼液双眼散瞳,0.4%倍诺喜行眼表麻醉后,在全视网膜镜下用眼底激光(波长532 nm)于视乳头下方作视网膜光凝。照射部位位于视乳头及髓线下方,以光凝后有气泡产生为击破Bruch膜的标志。激光参数:功率625~750 mW,时间0.1 s,光斑直径50 μm ,点数40点造模。

2.2 给药方法 将实验兔分4组,分别为正常对照组、模型对照组、滋阴地黄丸高剂量组、滋阴地黄丸低剂量组,每组6只。从造模第2 d开始给药,滋阴地黄丸高、低剂量组,含生药 $39, 9.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,给药容量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常组及模型组兔ig同容积的蒸馏水,持续30 d。

2.3 测定光凝组织中VEGF, $\alpha V\beta 3$, TF的表达 连续给药30 d后,处死兔,取兔右眼球置于固定于经二乙基焦碳酸酯处理的4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中4℃过夜,取后极部眼球壁(包括视盘及激光斑),经乙醇梯度脱水,透明,浸蜡后,石蜡包埋,连续切片,厚5 μm 。进行免疫组织化学染色检测脉络膜组织中VEGF, $\alpha V\beta 3$, TF的阳性表达。

2.4 图像分析及处理 应用TIPAS-88图像分析系统,400倍视野下,每个时间点随机选取各组实验眼激光损伤区视网膜组织切片各5个视野,细胞质内出现棕黄色颗粒的染色细胞为阳性。阴性结果计0分,弱阳性计1分,阳性计2分,强阳性计3分。以计分表示各细胞因子的表达。

2.5 统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件,多组间比较采用方差分析和 t 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

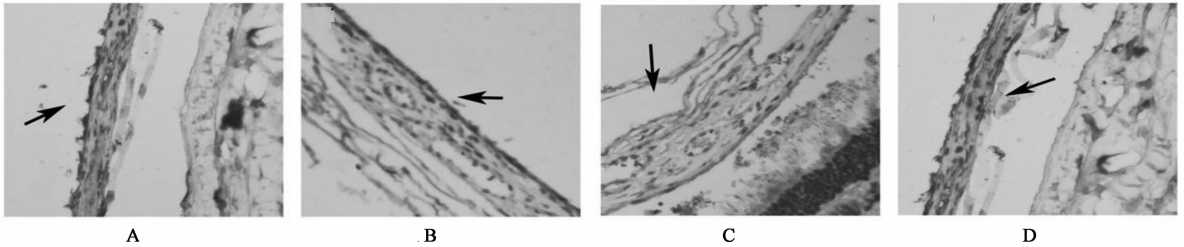
3.1 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中VEGF表达的影响 正常对照组脉络膜中棕黄色颗粒较少,绝大部分细胞为阴性着色(蓝色颗粒);模型对照组可见脉络膜中有很多棕黄色的着色颗粒,脉络膜内还可见很多新生血管管腔,管腔内壁附着致密的阳性着色颗粒;滋阴地黄丸低剂量组中也可看到脉络膜内有少量阳性棕黄色颗粒,新生血管管腔也很明显,但相对于模型对照组,阳性着色较少;滋阴地黄丸高剂量组染色结果接近正常组,脉络膜内极少有阳性着色,也不存在新生血管管腔。见图1,表1。

3.2 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 $\alpha V\beta 3$ 表达

的影响 正常对照组脉络膜中只有少量的阳性棕黄色颗粒,呈弱阳性染色;模型对照组可见脉络膜呈强阳性着色,脉络膜内可见很多新生血管管腔;滋阴地黄丸低、高剂量组中脉络膜中棕黄色着色颗粒也极少,染色结果呈弱阳性。见图 2,表 1。

3.3 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 TF 表达的

影响 正常对照组脉络膜中大多数为呈阴性着色;模型对照组可见脉络膜呈强阳性着色,脉络膜内可见很多新生血管管腔;滋阴地黄丸低剂量组及高剂量组中脉络膜中棕黄色着色颗粒也极少,染色结果呈弱阳性,且两个加药组脉络膜中均没发现新生血管管腔。见图 3,表 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 滋阴地黄丸 9.75 g·kg⁻¹组;D. 滋阴地黄丸 39 g·kg⁻¹组(图 2~3 同)

图 1 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 VEGF 表达的影响(免疫组化, ×400)

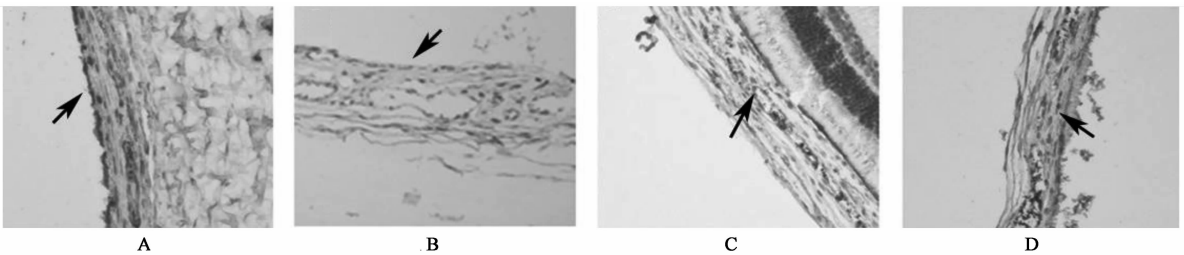


图 2 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 $\alpha V\beta 3$ 表达的影响(免疫组化, ×400)

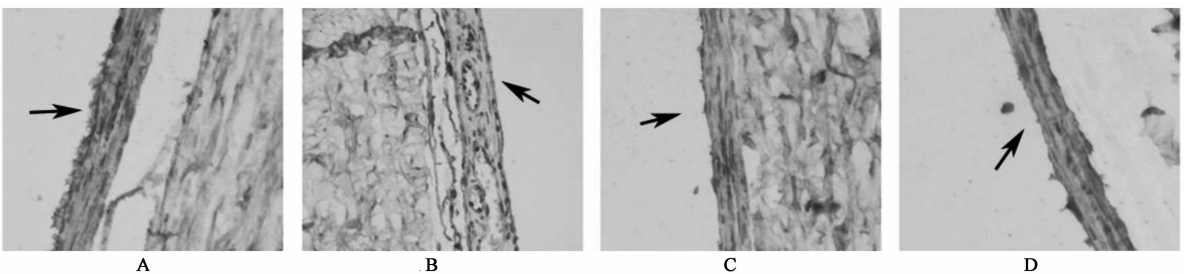


图 3 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 TF 表达的影响(免疫组化, ×400)

表 1 滋阴地黄丸对模型兔眼脉络膜组织 VEGF, $\alpha V\beta 3$, TF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	VEGF/分	$\alpha V\beta 3$ /分	TF/分
模型对照	-	2.00 ± 0.55	2.20 ± 0.45	2.80 ± 0.45
正常对照	-	0.40 ± 0.55 ²⁾	0.20 ± 0.45 ²⁾	0.20 ± 0.45 ²⁾
滋阴地黄丸	9.75	1.20 ± 0.55 ¹⁾	0.80 ± 0.45 ²⁾	0.40 ± 0.55 ²⁾
	39	0.40 ± 0.55 ²⁾	0.40 ± 0.55 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

高剂量滋阴地黄丸高剂量组 VEGF 的表达水平均显著低于模型对照组 ($P < 0.01$),低剂量滋阴地黄丸显著抑制了 VEGF 的表达 ($P < 0.05$)。滋阴地黄丸低、高 2 个剂量的 $\alpha V\beta 3$ 表达水平均极显著地低于模型对照组 ($P < 0.01$)。滋阴地黄丸低、高剂量组中 TF 的表达水均平显著低于模型对照组 ($P < 0.01$)。

4 讨论

视瞻昏渺是因气血失调,精气不能上荣于目所致。古人认为本病主要是由神劳、血少、元虚、精亏等所致,故治疗强调补虚培本。而费氏医学思想,以

从表 1 可见,与模型对照组相比,正常对照组及

“醇正”、“缓和”为特色。孟河费氏认为本病开窍于目。目暗(视力下降)多由肝血不足、肾精亏虚所致。马氏认为:“眼不肿不痛非风也,无翳、无膜、无胬肉并非火也,其视不明,夜间尤甚乃肾水有亏、肝血不足也”。^[2]故采用《滋阴地黄丸(明目之剂)》来治疗本病。《滋阴地黄丸》组成:熟地黄 1 两、生地黄 1 两 5 钱、柴胡 8 钱、黄芩(酒炒)、当归(酒洗)各 5 钱、天冬、地骨皮、五味子各 3 钱、黄连(酒炒)3 钱、人参 2 钱、甘草(炙) 枳壳(麸炒)各 2 钱。主治:治血弱气虚,不能养心,心火旺盛,肝木自实,瞳子散大,视物不清。处方中:熟地黄、当归养血滋阴,生地黄、地骨皮凉血清蒸,黄芩泻肺火,黄连泻肝火,天冬清肺而滋肾,柴胡散肝而升阳,五味子收耗而敛散,人参、甘草以益气补中,枳壳以利气行滞也^[2]。

脉络膜 CNV 的形成是“视瞻昏渺”眼底病的主要临床表现和致盲因素,随着对 CNV 形成机制认识的深入,抑制 CNV 形成已成为研究的重点,研究主要集中在各个水平上抑制促血管形成因子的作用,尤其是抑制血管内皮生长因 VEGF 的表达,VEGF 是目前研究所发现的功能最强的血管形成促进因子,它可以增加微血管的通透性刺激内皮细胞分裂、增加组织因子和某些蛋白酶的产生^[3-4],抑制 VEGF 可以明显降低新生血管的形成^[5]。本实验结果发现模型对照组脉络膜中 VEGF 的强阳性表达促进了 CNV 的发生,而滋阴地黄丸两个剂量组中 VEGF 的表达显著低于模型组,并且脉络膜组织中的 CNV 形成也不明显。由此表明滋阴地黄丸通过抑制脉络膜组织中 VEGF 的表达是抑制激光诱导的 CNV 形成的一个原因。

$\alpha V\beta 3$ 及 TF 在 CNV 中大量表达,而在正常的视网膜及脉络膜血管很少甚至不表达,通过抑制 $\alpha V\beta 3$ 及组织因子的表达来抑制新生血管的生成逐步成为目前抗 CNV 研究的热点^[5-9]。本研究结果发现滋阴地黄丸抑制了兔眼脉络膜组织中 TF 及 $\alpha V\beta 3$ 水平,表明滋阴地黄丸通过抑制 TF 及 $\alpha V\beta 3$ 的水平也是抑制激光诱导的 CNV 形成的机制。

本研究结果提示,滋阴地黄丸通过抑制 VEGF, TF 及 $\alpha V\beta 3$ 的表达抑制了激光诱导的兔 CNV 的形成,本研究结果为临床使用滋阴地黄丸治疗“视瞻昏渺”眼底病提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] Dobi E T, Puliafito C A, Destro M. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat[J]. Arch Ophthalmol, 1989, 107(2): 264.
- [2] 朱雄华等孟和四家医集[M]. 南京:东南大学出版社, 2006:1.
- [3] Espinosa Heidmann D G, Suner I, Hernandez E P, et al. Age as an independent risk factor for severity of experimental choroidal neovascularization [J]. Invest Ophthalmol Vis Sic, 2002, 43(5):1567.
- [4] Oh H, Takagi H, Takagi C, et al. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes [J] Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999:40(9):1891.
- [5] Kwak N, Okamoto N, Wood J M, et al. VEGF is a major stimulator in model of choro lldal neovascularlzationl [J]. Invest Ophthalmol Vls Scj, 2000, 41(10):3158.
- [6] 唐仁泓, 龙剑锋, 陈百华. 整合素 $\alpha V\beta 3$ 、组织因子及血管内皮细胞内皮细胞在实验性脉络膜新生血管中的表达[J]. 中南大学学报, 2009, 34(8):762.
- [7] Volpert O V, Zatchuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endotheltum for destruction by antt-angtogene thrombospondin-I and pigment epithelium-derived factor [J]. Nat Med, 2002, 8(4):349.
- [8] 刘静, 关明. 色素上皮细胞衍生因子在眼科中的作用 [J]. 国际眼科杂志, 2004, 4(3): 397.
- [9] Liu I I, Ren J G, Cooper W L, et al. Identification of the anttvasopermeabtlty effect of pigment epithelium-derived factor and its active site [J] Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(17):6605.

[责任编辑 聂淑琴]