

## 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 VEGF, bFGF 和 PEDF 表达的影响

胡婷婷<sup>1</sup>, 曹鹏<sup>2</sup>, 王志刚<sup>2</sup>, 胡春萍<sup>2</sup>, 杨杰<sup>2</sup>, 蔡雪婷<sup>2</sup>, 王炜<sup>2\*</sup>

(1. 南京江北人民医院, 南京 210035; 2. 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眼脉络膜组织中血管内皮生长因子(VEGF), 色素上皮衍生因子(bFGF), 碱性成纤维细胞生长因子(PEDF)表达的影响。方法: 用激光光凝建立兔眼脉络膜新生血管(CNV)动物模型, 给予滋阴地黄丸 9.75, 39 g·kg<sup>-1</sup>, 连续 30 d 后取眼球进行免疫组织化学染色, 测定脉络膜中 VEGF, bFGF 及 PEDF 的表达。结果: 模型对照组兔眼脉络膜组织中 VEGF, bFGF 呈强阳性表达及 PEDF 的弱阳性表达, 滋阴地黄丸低、高剂量组中 VEGF, bFGF 的表达呈阳性或弱阳性, PEDF 则呈阳性或强阳性表达。滋阴地黄丸低、高剂量兔眼脉络膜 VEGF 的表达为(1.20 ± 0.45), (0.40 ± 0.55)分, 模型组为(2.60 ± 0.55)分, (P < 0.01); 低、高剂量组 bFGF 的表达为(1.40 ± 0.55), (0.40 ± 0.55)分, 模型组为(2.80 ± 0.45)分, (P < 0.01); 低、高剂量组 PEDF 为(1.60 ± 0.89), (2.80 ± 0.45)分, 模型组为(0.40 ± 0.55)分(P < 0.05, P < 0.01)。滋阴地黄丸显著地抑制 VEGF 和 bFGF 的表达, 诱导了 PEDF 的表达。结论: 滋阴地黄丸通过抑制脉络膜中 VEGF, bFGF 的表达, 诱导 PEDF 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; 碱性成纤维细胞生长因子; 色素上皮衍生因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0220-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1513.005.html>

**[网络出版时间]** 2012-05-15 15:13

## Effects of Ziyin Dihuang Wan on Expression of VEGF, bFGF and PEDF in Rabbit Choroid Tissue

**[收稿日期]** 20120228(208)

**[基金项目]** 江苏科技厅“科技基础实施建设计划”专项(BM2008152-KF04)

**[第一作者]** 胡婷婷, 住院医师, 学士, 从事心血管临床, Tel:025-57067000, E-mail:94482635@qq.com

**[通讯作者]** \* 王炜, 主任医师, 研究员, 从事临床基础研究, Tel:025-85608666, E-mail:njhep66@126.com

疗作用的缓、控释制剂, 具有毒副作用低, 血药浓度维持稳定持久, 给药次数少, 可以随时终止给药等优点<sup>[8]</sup>。本研究从活血化瘀角度, 对冠心巴布膏的药效学进行了评价, 结果说明冠心巴布膏作为治疗冠心病的经皮给药制剂是可行的。

### [参考文献]

- [1] 华晓东, 任变文. 经皮给药系统的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 282.
- [2] 王彦礼, 刘淑芝, 王岚, 等. 黄连巴布膏中盐酸巴马汀和小檗碱的药动学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 129.
- [3] 王岚, 刘淑芝, 王彦礼, 等. 黄连巴布膏抗消化性溃疡

的药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 194.

- [4] 中国药典. 一部[S]. 2005: 653.
- [5] 吴志诚, 刘淑芝, 李曼玲, 等. 精制冠心膏水提液的大孔树脂纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 11.
- [6] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 564, 531.
- [7] 寿旦, 孙静芸. 化瘀巴布膏体外透皮吸收研究[J]. 中草药, 2003, 34(3): 220.
- [8] 吕丹, 裴元英. 透皮吸收促进剂应用及研究的新进展[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(4): 181.

[责任编辑 何伟]

HU Ting-ting<sup>1</sup>, CAO Peng<sup>2</sup>, WANG Zhi-gang<sup>2</sup>, HU Chun-ping<sup>2</sup>, YANG Jie<sup>2</sup>, CAI Xue-ting<sup>2</sup>, WANG Wei<sup>2\*</sup>  
(1. Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Jiangsu Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. People's Hospital of Nanjing Jiangbei District, Nanjing 210035, China)

**[ Abstract ] Objective:** To study the effects of Ziyin Dihuang Wan (ZDW) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (bFGF) and pigment epithelium derived factor (PEDF) in rabbit choroids tissue. **Method:** Choroidal Neovascularization (CNV) model was induced by laser, and then administrated with 9.75, 39 g·kg<sup>-1</sup> ZDW for 30 days and then rabbit eyeballs were performed immunohistochemical staining in determination of the expression of VEGF, bFGF and PEDF in choroid. **Result:** Comparing with the strongly positive expression of VEGF, bFGF and weak expression of PEDF in model group rabbit choroidal tissue, the expression of VEGF and bFGF were positive or weakly positive, PEDF expression was positive or strongly positive in low, high dose ZDW treatment groups. Comparing with model control group, ZDW at 9.75 g·kg<sup>-1</sup> dose inhibited the expression of VEGF, bFGF significantly ( $P < 0.01$ ) and induced the PEDF significantly ( $P < 0.05$ ). ZDW at 39 g·kg<sup>-1</sup> dose inhibited the expression of VEGF, bFGF and induced the expression of PEDF significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** ZDW inhibited CNV by inhibiting the expression of VEGF and bFGF and inducing the expression of PEDF in rabbit choroids tissue.

**[ Key words ]** Ziyin Dihuang Wan; CNV; VEGF; bFGF; PEDF

“视昏瞻渺”眼底病相当于西医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。从防患于未然的角度,研究该病的发病机制对其预防和治疗均具有极其重要的临床意义。目前,“视瞻昏渺”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,观察费氏方剂-滋阴地黄丸对 CNV 动物模型血管内皮生长因子(VEGF),色素上皮衍生因子(bFGF),碱性成纤维细胞生长因子(PEDF)表达的变化,探索其对“视瞻昏渺”眼底病的作用机制,为临床治疗该病提供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±0.2)kg,购于金陵种兔场,合格证号 SCXK(苏)2007-0004。

**1.2 药品及试剂** 滋阴地黄丸,含生药 19.5 g·mL<sup>-1</sup>,由江苏省中西医结合医院制剂室提供;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。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 VEGF bs-1313R, PEDF bs-0518R, bFGF bs-0217R。

**1.3 仪器** Lumenis532 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,美国 Thermo 公司。

## 2 方法

**2.1 动物模型制作<sup>[1]</sup>** 随机选取 6 只兔作为正常组,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,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。

**2.2 给药方法** 将实验兔分为正常对照组、模型对照组、滋阴地黄丸高、低(分别含生药 39, 9.75 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组,每组 6 只。从造模第 2 天开始 ig,给药容量为 10 mL·kg<sup>-1</sup>,正常组及模型组 ig 同容积蒸馏水,持续 30 d。

**2.3 免疫组织化学染色测定兔眼脉络膜光凝组织中 VEGF,bFGF,PEDF 表达** 连续给药 30 d 后,处死兔,取兔左眼球置于 10% 中性甲醛中,将固定好的眼球去除多余组织,留取激光斑部位眼球壁组织,正常对照组留取相应部位组织,常规石蜡包埋、切片,用 SP 进行免疫组织化学染色,光学显微镜下观察脉络膜组织学变化。采用 TIPAS-88 图像分析系统测定 VEGF,bFGF 及 PEDF 阳性表达:400 倍视野下,每个时间点随机选取各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。

**2.4 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  $q$  检验,以  $P < 0.05$  为差异显著。

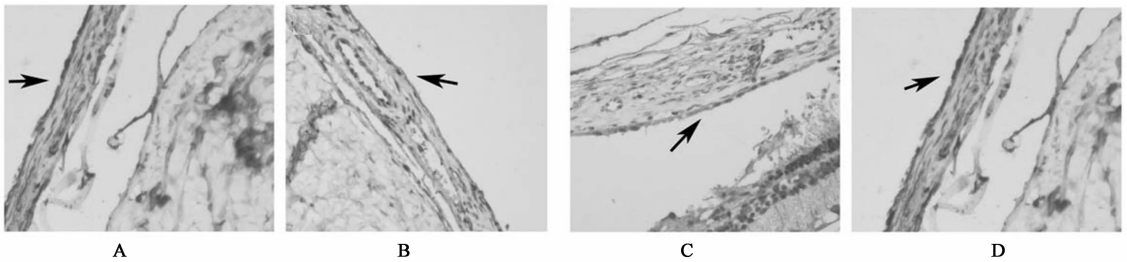
### 3 结果

**3.1 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 bFGF 表达的影响** 正常对照组脉络膜中只有极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腔。见图 2,表 1。

**3.3 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 PEDF 表达的影响** 正常对照组脉络膜棕黄色颗粒很少,染色结果弱阳性;模型对照组脉络膜棕黄色的着色颗粒也很少染色结果呈弱阳性;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,染色结果呈阳性;滋阴地黄丸高剂量组中脉络膜内有大量的棕黄色颗粒,呈强阳性着色。见图 3,表 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 滋阴地黄丸  $9.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; D. 滋阴地黄丸  $39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (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,  $\times 400$ )

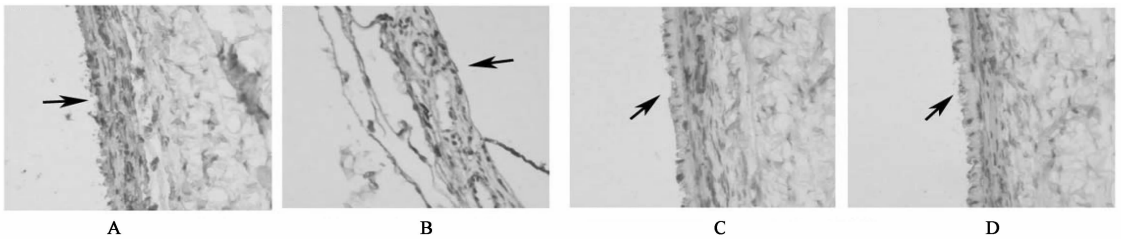


图 2 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 bFGF 表达的影响(免疫组化,  $\times 400$ )

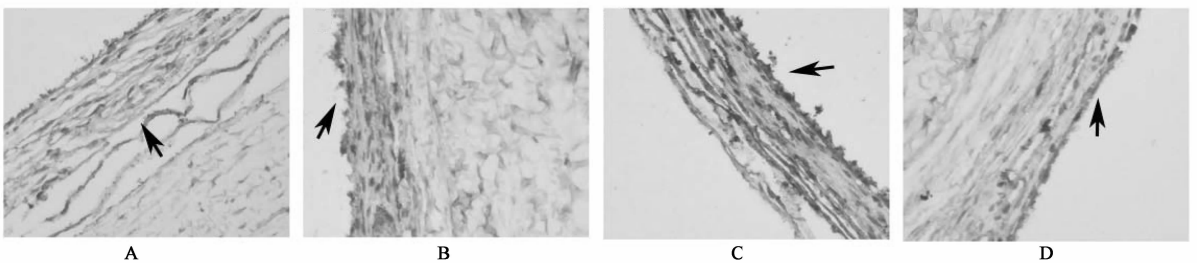


图 3 滋阴地黄丸对兔眼脉络膜组织中 PEDF 表达的影响(免疫组化,  $\times 400$ )

从表 1 可见,滋阴地黄丸低、高剂量组 VEGF,

bFGF 的表达水平均显著低于模型对照组 ( $P <$

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

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	VEGF	bFGF	PEDF
模型对照	-	2.60 ± 0.55	2.80 ± 0.45	0.40 ± 0.55
正常对照	-	0.60 ± 0.55 <sup>2)</sup>	0.20 ± 0.45 <sup>2)</sup>	0.40 ± 0.55
滋阴地黄丸	9.75	1.20 ± 0.45 <sup>2)</sup>	1.40 ± 0.55 <sup>2)</sup>	1.60 ± 0.89 <sup>1)</sup>
	39.00	0.40 ± 0.55 <sup>2)</sup>	0.40 ± 0.55 <sup>2)</sup>	2.80 ± 0.45 <sup>2)</sup>

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

0.01); 滋阴地黄丸低、高剂量组 PEDF 的表达水平显著高于模型对照组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

#### 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“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”。<sup>[2]</sup>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:血弱气虚,不能养心,心火旺盛,肝木自实,瞳子散大,视物不清。方中熟地黄、当归养血滋阴,生地黄、地骨凉血清蒸,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<sup>[2]</sup>。

研究表明,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<sup>[3]</sup>,抑制 VEGF 可以明显降低新生血管的形成<sup>[4]</sup>,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 2 个剂量组 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。

Soubrane 及 Kumura 等分别用小种猪及兔的 CNV 模型研究了 bFGF 在 CNV 形成中的作用,结果表明,视网膜下间隙 bFGF 持续增高可促进 CNV 的形成<sup>[5]</sup>。本研究中发现模型对照组中 bFGF 高表达

及大量 CNV,滋阴地黄丸极显著地抑制了脉络膜中的 bFGF 的表达,并抑制了 CNV 的形成。表明滋阴地黄丸下调脉络膜中 bFGF 的表达也是抑制了激光诱导 CNV 的形成的机制之一。

有实验报道 PEDF 可通过诱导内皮细胞凋亡,并抑制内皮细胞向各种血管生成因子(如 VEGF, FGF)移行,同时能有效防止和逆转 VEGF 引起的血管渗漏<sup>[6-8]</sup>。本研究发现,在正常对照组脉络膜 PEDF 呈阴性表达,模型组中 PEDF 表达水平也较低,而滋阴地黄丸组脉络膜 PEDF 表达却显著上调,表明 PEDF 在滋阴地黄丸介导的抑制 CNV 形成中也起着重要作用。

本研究结果提示,滋阴地黄丸通过抑制 VEGF, bFGF 的表达,上调 PEDF 的表达而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] 朱国华. 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] Kwak N, Okamoto N, Wood J M, et al. VEGF is a major stimulator in model of choroidal neovascularization [J]. Invest Ophthalmol Vls Sic 2000, 41(10):3158.
- [5] Piotrowicz R S, Maher P A, Levin E G, et al. Dual activities of 22-24 kDa basic fibroblast growth factor: inhibition of migration and stimulation of proliferation [J]. Ceu Physiol, 1999, 178(2):114.
- [6] Volpert O V, Zatchuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by antiangiogenic thrombospondin-I and pigment epithelium-derived factor [J]. Nat Med, 2002, 8(4):349.
- [7] 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.
- [8] Liu I I, Ren J G, Cooper W L, et al. Identification of the antiva sopermeability effect of pigment epithelium-derived factor and its active site [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(17):6605.

[责任编辑 何伟]