

# 蛹虫草提取物联合地塞米松抑制大鼠角膜新生血管

程文武<sup>1</sup>, 江萍<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(443000)中国湖北省宜昌市,三峡大学第一临床医学院;<sup>2</sup>(443000)中国湖北省宜昌市中心人民医院眼视光学专科  
作者简介:程文武,男,在读硕士研究生,研究方向:眼表疾病。  
通讯作者:江萍,女,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼表疾病. jiangpingboss@ yahoo. cn  
收稿日期:2010-01-14 修回日期:2010-02-26

## Cordyceps militaris extract combining with dexamethasone inhibition on rat corneal neovascularization

Wen-Wu Cheng<sup>1</sup>, Ping Jiang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical College of Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology and Optometry, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443000, Hubei Province, China

**Correspondence to:** Ping Jiang. Department of Ophthalmology and Optometry, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443000, Hubei Province, China. jiangpingboss@ yahoo. cn  
Received: 2010-01-14 Accepted: 2010-02-26

### Abstract

• **AIM:** To observe the inhibition effect on rat corneal neovascularization (CNV) by drug combination of the cordyceps militaris extract (CME) and dexamethasone (Dex).

• **METHODS:** CNV model was induced by alkaline burn of the cornea with 1mol/L NaOH. Forty-eight rats were divided into three groups randomly after modeling, A was model group, B was CME treatment group, and C was combination treatment group. All groups received medication by subconjunctival injection every other day after alkaline burn, group A received saline, group B received 10mg CME, group C also received 10mg CME, and received 0.25g/L Dex eyedrops three times each day, each injection volume was set at 0.1mL. On the 4, 8, 14 days, CNV was observed, and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its mRNA in the cornea were detected.

• **RESULTS:** After modeling, rat CNV of the combination group was significantly reduced than the model control group and CME treatment group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** CME combining with Dex can inhibit alkaline burn-induced CNV growth more effectively.

• **KEYWORDS:** cordyceps militaris extract; dexamethasone; corneal neovascularization; vascular endothelial growth factor

Cheng WW, Jiang P. Cordyceps militaris extract combining with dexamethasone inhibition on rat corneal neovascularization. *Int J*

*Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):427-429

### 摘要

**目的:**观察蛹虫草提取物(cordyceps militaris extract, CME)联合地塞米松(dexamethasone, Dex)对大鼠角膜新生血管的抑制作用。

**方法:**对48只大鼠采用碱烧伤法制作大鼠角膜新生血管模型,后随机分为3组:A组为模型对照组,B组为CME治疗组,C组为CME联合Dex治疗组。造模后每组均隔日注射给药,A组给予生理盐水结膜下注射,B组给予CME 10mg球结膜下注射,C组给予CME 10mg球结膜下注射,另外给予0.25g/L Dex滴眼液点眼,3次/d。于术后4,8,14d测量角膜新生血管的生长面积,并测量角膜组织中VEGF及其mRNA的表达情况。

**结果:**造模后联合用药组的大鼠角膜新生血管生长面积较模型对照组及CME治疗组明显减少,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:**CME联合Dex更能明显抑制碱烧伤所致大鼠角膜新生血管的生长。

**关键词:**蛹虫草提取物;地塞米松;角膜新生血管;血管内皮生长因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.007

程文武,江萍. 蛹虫草提取物联合地塞米松抑制大鼠角膜新生血管. 国际眼科杂志 2010;10(3):427-429

### 0 引言

角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)是常见的致盲性眼病之一,也是角膜移植术后发生排斥反应的高危因素。局部应用糖皮质激素是目前临床上的主要治疗手段,但其易诱发角膜穿孔、青光眼、白内障等严重并发症,因而寻找安全有效的治疗CNV的药物一直是眼表研究的热点。蛹虫草主要用于抗肿瘤和增强免疫等治疗,近来国外有报道其有抗新生血管生成的作用,但尚未见有抗眼部新生血管的报道。我们的前期研究已证实,蛹虫草提取物(cordyceps militaris extract, CME)对大鼠CNV具有抑制作用,其高剂量与0.5g/L地塞米松(dexamethasone, Dex)的抑制作用相当。我们将CME与Dex联合用药,观察对大鼠CNV的抑制作用。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 蛹虫草子实体,购自广东冬草堂虫草有限公司;0.25g/L Dex滴眼液,购自湖北潜江制药有限公司。清洁级健康雌性Sprague Dawley(SD)大鼠48只(华中科技大学同济医学院动物实验中心提供),体质量220~250g。CME的制备采用水热回流提取法<sup>[1]</sup>:取蛹虫草子实体粉末50g,加10倍量的蒸馏水(500mL)于80℃热回流提取3次,每次90min。合并滤液,减压浓缩,真空干燥器内干燥至粉末,4℃保存备用。0.25g/L Dex滴眼液,采用潜江制药有限公司生产的滴眼液原液。



图1 大鼠碱烧伤后14d CNV生长情况 A:模型对照组;B:CME治疗组;C:CME + Dex治疗组。

**1.2 方法** 采用100g/L水合氯醛3mL/kg腹腔注射麻醉,所有实验大鼠均选择右眼,裂隙灯下检查眼前节无病变。10g/L地卡因眼液表面麻醉,将统一规格直径3.0mm的单层圆形滤纸浸入浓度为1mol/L氢氧化钠溶液20s,吸干滤纸上残余溶液后将其准确贴附于右眼角膜中央表面40s,取下滤纸后立即用生理盐水冲洗2min。烧伤术后即观察大鼠右眼角膜,烧灼区域呈灰白色混浊,依据评分标准<sup>[2]</sup>确认中度碱烧伤模型建立。术后术眼点红霉素眼膏预防感染。抽签法随机将大鼠分成A,B,C 3组(A组:模型对照组;B组:CME治疗组;C组:CME + Dex治疗组),每组15只。A组给予生理盐水0.1mL球结膜下注射。B组给予CME 10mg经无菌注射用水稀释为0.1mL后行球结膜下注射。C组给予CME 10mg球结膜下注射,另给予0.25g/L Dex滴眼液点眼,3次/d。每组均自术日起隔日球结膜下注射,给药至处死取材为止。于术后第4,8,14d采用过量麻醉法处死大鼠,每次6只,迅速摘除眼球,在显微镜下剪下带1mm宽巩膜的角膜组织,平分为二,均置于-80℃低温冰箱备用,一份用于real time PCR检测VEGF基因水平的表达,另一份用于ELISA检测VEGF蛋白水平的表达。

**1.2.1 CNV的定量分析** 角膜烧伤后各时间点行裂隙灯显微镜检查,测量新生血管长入角膜的长度及累及角膜圆周的钟点数,计算其面积。新生血管面积计算依据Robert公式<sup>[3]</sup>: $S = C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-l)^2]$ ,其中C代表新生血管累及角膜圆周的钟点数,1代表新生血管的长度(在显微镜下用游标卡尺测量,测量生长较长、弯曲度小、并与角膜缘切线垂直的新生血管),r代表角膜半径。

**1.2.2 角膜VEGFmRNA表达的检测** 角膜总RNA提取参照Trizol说明书(大连宝生物公司),对保存在-80℃冰箱中的角膜组织总RNA进行提取与纯化,然后逆转录为cDNA。Real time PCR按照试剂盒(大连宝生物公司)说明书进行操作,采用25μL反应体系,以β-actin为内参照。PCR反应条件:95℃预变性30s,95℃5s,60℃30s,循环40次。每例样本均设3个平行复孔,取均值。VEGF和β-actin引物由大连宝生物工程有限公司合成。VEGF上游引物:5'-GTCCTCACTTGGATCCCCGACA-3',下游引物:5'-CCTGCCAGCAAACAGACTTC-3',扩增片断为99bp;β-actin上游引物:5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3',下游引物:5'-GACTCATCGTACTCCTGCTGCTG-3',扩增片断为150bp。

**1.2.3 角膜VEGF表达的检测** 经电子天平称量,所有标本每个定量为0.005g。将标本放入研钵,加0.01mol/L PBS缓冲液100μL研磨匀浆,使之呈现混悬液状,装入EP管,4℃5000r/min离心10min,收集上清液,-80℃冷冻保存,夹心法ELISA检测。

表1 大鼠CNV面积和VEGF表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

指标	分组	4d	8d	14d
CNV(mm <sup>2</sup> )	A组	12.0 ± 2.1	22.1 ± 4.2	25.2 ± 2.2
	B组	4.5 ± 2.4 <sup>a</sup>	6.6 ± 3.0 <sup>a</sup>	11.2 ± 1.6 <sup>a</sup>
	C组	1.4 ± 0.3 <sup>a,c</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>a,c</sup>	6.3 ± 0.3 <sup>a,c</sup>
VEGFmRNA (×10 <sup>-3</sup> )	A组	1022.0 ± 56.0	1026.0 ± 21.0	1055.0 ± 54.0
	B组	521.0 ± 67.0 <sup>a</sup>	452.0 ± 36.0 <sup>a</sup>	303.0 ± 45.0 <sup>a</sup>
	C组	323.0 ± 21.0 <sup>a,c</sup>	301.0 ± 19.0 <sup>a,c</sup>	287.0 ± 12.0 <sup>a,c</sup>
VEGF(ng/L)	A组	148.0 ± 39.0	177.0 ± 37.0	147.0 ± 13.0
	B组	80.0 ± 14.0 <sup>a</sup>	107.0 ± 28.0 <sup>a</sup>	71.0 ± 11.0 <sup>a</sup>
	C组	49.0 ± 4.0 <sup>a,c</sup>	76.0 ± 6.0 <sup>a,c</sup>	54.0 ± 3.0 <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs A组; <sup>c</sup>P < 0.05 vs B组。

统计学分析:实验数据应用SPSS 13.0统计软件包进行处理,总体均数间比较采用单因素方差分析,各组均数间两两比较采用q检验,以P < 0.05为有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 CNV生长面积** 模型对照组于角膜烧伤后3d开始长入新生血管,CME组与联合用药组于烧伤后4d开始长入新生血管,均于8d左右生长速度达高峰,其后生长变缓,到两周时部分CNV开始消退(图1)。在烧伤后4,8,14d CME治疗组与联合治疗组CNV面积均小于模型对照组,差异具有统计学意义(P < 0.05),联合治疗组与CME治疗组比较,差异亦具有统计学意义(P < 0.05)。统计结果显示,联合治疗组更能明显抑制CNV的生长(表1)。

**2.2 角膜VEGFmRNA的表达** 烧伤后B,C组mRNA的表达明显低于模型对照组,差异具有统计学意义(P < 0.05),B,C组之间差异亦具有统计学意义(P < 0.05,表1)。

**2.3 角膜VEGF的表达** 在各时间点联合用药组较模型对照组及CME组均低表达,差异均具有统计学意义(P < 0.05,表1),这与VEGFmRNA表达水平具有一致性。

**3 讨论**

CNV属于难治性角膜疾病之一,常常导致患者视力下降,严重者可致失明。蛹虫草是一种名贵的中药材,其应用于临床有悠久的历史。近年来的研究显示,蛹虫草具有抗癌、调节免疫、抗衰老等药理作用<sup>[4-6]</sup>。最近国外的研究显示,CME能够抑制新生血管的发生,它能抑制人脐静脉内皮细胞的增殖<sup>[7]</sup>和鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成<sup>[8]</sup>。我们前期的研究显示,CME能够有效抑制碱烧伤所致的大鼠CNV的生长,高剂量抑制作用与0.5g/L的Dex相当。我们仍然采用碱烧伤法制作大鼠CNV模型,联合运用CME及Dex,观察联合用药对CNV生长的抑制作用及其副作用的大小。实验结果显示,联合用药比CME单独用药更能有效抑制大鼠CNV的生长,且副作用不明显。这就提示,如能将蛹虫草开发成有效的抑制新生血管的药

物,在治疗上辅以低浓度的糖皮质激素,可以明显提高治疗效果且有效降低副作用,从而为 CNV 的药物治疗提供新的思路。

#### 参考文献

- 1 王英娟,李多伟,王义潮,等. 蛹虫草中虫草素、虫草多糖综合提取工艺研究. 西北植物学报 2005;25(9):1863-1867
- 2 Bergers G, Javaherian K, Lo KM, et al. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 1999; 284(5415):808-812
- 3 Kato T, Kure T, Chang JH, et al. Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. *FEBS Lett* 2001;508(2):187-190
- 4 Thomadaki H, Tsiapalis CM, Scorilas A. The effect of the polyadenylation inhibitor cordycepin on human Molt-4 and Daudi

leukaemia and lymphoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61(4):703-711

5 Zhou X, Luo L, Dressel W, et al. Cordycepin is an immunoregulatory active ingredient of Cordyceps sinensis. *Am J Chin Med* 2008;36(5):967-980

6 Wang YH, Ye J, Li CL, et al. An experimental study on anti-aging action of Cordyceps extract. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2004;29(8):773-736

7 Yoo HS, Shin JW, Cho JH, et al. Effects of Cordyceps militaris extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(5):657-665

8 Won SY, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of Cordyceps militaris. *J Ethnopharmacol* 2005;96(3):555-561

## 解放军 309 医院眼科主治医师王静波等在 Lancet 发表评论

本刊讯 解放军 309 医院眼科主治医师、西京医院毕业博士王静波等,在第三个国际罕见病日(2010-02-28)来临前 1d,在 Lancet《柳叶刀》(IF, 28.4)发表了题为“中国的罕见病及立法”述评(Rare diseases and legislation in China. *Lancet*, 2010 Feb. 27; 375(9716):708-709)。这是近 15a 来我国大陆眼科学者首次在世界四大医学期刊之一的《柳叶刀》上发表文章。目前已知与眼部相关的罕见病主要有:成骨不全症、肝豆状核变性、白化病、视网膜母细胞瘤、多发性硬化症、重症肌无力等。该文对世界了解我国罕见病状况、呼吁人们关注罕见病并积极救助罕见病患者及弱势群体有积极作用。

本刊编辑部