

# 中药散血明目片抑制兔视网膜静脉阻塞后视网膜 VEGF 和 bFGF 的表达

彭俊<sup>1</sup>, 彭清华<sup>2</sup>, 曾志成<sup>2</sup>

基金项目: 中国湖南省自然科学基金资助项目 (No. 02JJY2035); 中国湖南省科技厅科研基金资助项目 (No. 02SSY3096)

作者单位:<sup>1</sup> (421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学医学院; <sup>2</sup> (410007) 中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院眼科学重点学科

作者简介: 彭俊, 男, 医学学士, 住院医师, 研究方向: 眼底病和眼表疾病。

通讯作者: 彭清华, 男, 教授, 主任医师, 博士, 博士生导师, 1999 年获教育部全国高等院校青年教师奖, 2000 年获湖南省人民政府优秀博士学位论文奖, 2001 年获上海颜德馨中医药人才奖, 2005 年获湖南省青年科技奖, 2003 年度卫生部有突出贡献中青年专家, 第二届全国百名杰出青年中医, 2008 年入选湖南省 121 人才工程第一层次, 2002 年享受国务院政府特殊津贴, 兼中国中西医结合学会眼科专业委员会副主任委员、世界中医药学会联合会眼科分会常务理事、中华中医药学会眼科分会常务委员、湖南省中西医结合眼科专业委员会主任委员, 主要从事中西医结合防治眼底病、青光眼和眼表疾病的研究。pqhz\_520@163.com

收稿日期: 2009-09-29 修回日期: 2009-12-16

## Experimental study of sanxuemingmu tablet on protecting retina after retinal vein occlusion

Jun Peng<sup>1</sup>, Qing-Hua Peng<sup>2</sup>, Zhi-Cheng Zeng<sup>2</sup>

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Hunan Province, China (No. 02JJY2035); Project of Scientific Research Fund of Hunan Provincial Science and Technology Department of China (No. 02SSY3096)

<sup>1</sup>Medical School of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China; <sup>2</sup>Key Discipline of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

**Correspondence to:** Qing-Hua Peng. Key Discipline of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. pqhz\_520@163.com

Received: 2009-09-29 Accepted: 2009-12-16

### Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of sanxuemingmu tablet (SXMMT) that can activate blood, relieve meridians, eliminate dampness and dissipate stagnation on the treatment of retinal vein occlusion (RVO) and the action mechanism of preventing the new blood vessel.

• **METHODS:** Forty-eight rabbits (96 eyes) were randomly divided into 4 groups, with 12 (24 eyes) in each one. Group A was normal group, group B was modeling group, group C was xueshuantong group and D was

SXMMT group. RVO models were made by laser photocoagulation. Rabbits were killed in the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day after the operation. Then eyeballs were taken, dehydrated and embedded in paraffin to observe the expression of VEGF and bFGF in the retina by immunohistochemistry.

• **RESULTS:** The RVO models of group B, C, D were successfully established. Compared with B group, the content of VEGF and bFGF of group D were obviously reduced, and had significant difference.

• **CONCLUSION:** SXMMT could promote absorbing blood after RVO, improve retina hypoxic-ischemic conditions, depress the excessive expression of VEGF and bFGF in retina surface after RVO, treat RVO and control new vessel, and then protect the retina.

• **KEYWORDS:** sanxuemingmu tablet; activating blood, relieving meridians, eliminating dampness, dissipating stagnation; retinal vein occlusion; vascular endothelial growth factor; basic fibroblast growth factor

Peng J, Peng QH, Zeng ZC. Experimental study of sanxuemingmu tablet on protecting retina after retinal vein occlusion. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(1):55-57

### 摘要

**目的:** 探讨活血通脉利水明目作用的中药散血明目片防治视网膜静脉阻塞 (retinal vein occlusion, RVO) 并发新生血管的作用。

**方法:** 将家兔 48 只 96 眼随机分为 4 组, 每组 12 只 24 眼。A 健康空白组; B 模型组; C 血栓通组; D 散血明目片组。采用激光光凝法建立兔 RVO 模型, 分别于术后 3, 7, 14, 21d 用空气栓塞法处死动物, 即刻摘取眼球石蜡包埋切片。免疫组化法观察兔视网膜组织中血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的表达。

**结果:** 成功建立了 RVO 模型。D 组与 B 组比较, 视网膜组织中 VEGF 含量 (21d 时分别为  $0.442 \pm 0.034$  和  $0.583 \pm 0.056$ ) 和 bFGF 含量 (21d 时分别为  $0.419 \pm 0.040$  和  $0.514 \pm 0.056$ ) 明显减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与 C 组比较差异无统计学意义。

**结论:** 活血通脉利水明目之散血明目片能抑制视网膜面 VEGF 和 bFGF 的高表达。

**关键词:** 散血明目片; 活血通脉利水明目法; 视网膜静脉阻塞; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.01.016

彭俊, 彭清华, 曾志成. 中药散血明目片抑制兔视网膜静脉阻塞后视网膜 VEGF 和 bFGF 的表达. *国际眼科杂志* 2010;10(1):55-57

## 0 引言

视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)是眼科常见的一种缺血性视网膜病变,由视网膜缺血所导致的视网膜新生血管及其引发的一系列并发症(如玻璃体出血、视网膜脱离和新生血管性青光眼)常常可以导致患者视力丧失。寻找和研制有效的抑制眼内血管新生的药物是当前药理学和临床医学研究的热点。中药散血明目片有活血通脉利水明目之功效,已往研究证实其对玻璃体积血等眼底出血患者有较好的临床疗效<sup>[1]</sup>。我们用活血通脉利水明目之中药散血明目片对兔RVO模型进行灌胃,观察其对视网膜组织中新生血管相关因子VEGF和bFGF表达干预作用如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康有色家兔48只,体质量2.0~2.5kg,雌雄不限,裂隙灯显微镜、眼底镜检查眼前节及眼底均无异常,由湖南中医药大学动物实验中心提供。随机分为4组,每组12只兔24眼。分别为:A:健康空白组;B:模型组;C:血栓通组;D:散血明目片组。中药散血明目片由三七、酒大黄、蒲黄、猪苓、防己、地龙、白茅根、泽泻等活血通脉利水明目中药按现代制剂制备工艺制成,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。使用时研成粉末,温开水混合,浓度为120g/L的混悬液。血栓通胶囊主要成分为三七总甙,广东众生药业股份有限公司生产,使用时用生理盐水配制成浓度为240g/L的混悬液。托吡卡胺滴眼液:山东博士伦福瑞达制药有限公司生产。乌拉坦及多聚甲醛固定液:湖南中医药大学病理实验室提供。VEGF和bFGF免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒:购自武汉博士德生物工程有限公司。

**1.2 方法** 参照周正申等<sup>[2]</sup>采用激光光凝视网膜中央静脉造模法将B、C、D 3组兔术前12h禁食水,造模前每只家兔点5g/L托吡卡胺滴眼液充分散瞳,先做正常眼底彩色照相及荧光素眼底血管造影。自兔耳缘静脉静推250g/L乌拉坦4mL/kg麻醉,通过三面镜应用波长532nm的倍频Nd:YAG激光直接光凝视网膜静脉上、下主干。光凝能量选择650~800mW,平均光凝点数38点,曝光时间0.2s,光斑直径100 $\mu$ m。激光光凝封闭静脉时准确聚焦于静脉,避免损伤邻近的动脉。光凝封闭的静脉段长度约1DD,直至被封闭的静脉段变细发白,血流停滞,其远端迂曲扩张。光凝时由远端向近端照射,以免光凝处静脉内压力过高而破裂,影响操作。激光光凝封闭视网膜静脉后,即作眼底彩色照相及荧光素眼底血管造影(FFA),观察血管闭塞情况,若闭塞不完全则补充光凝封闭。一般情况下补充光凝一次就足够了,过度光凝封闭视网膜静脉上下主干,往往可造成过于强烈的组织反应,从而使视网膜坏死。24h后再复查FFA,证实视网膜静脉上、下主干完全阻塞。A、B组每日以生理盐水5mL/kg灌胃,C组每日以血栓通胶囊灌胃5mL/kg(约相当于5倍成人剂量)。D组每日以散血明目片混悬液5mL/kg(约相当于5倍成人剂量)灌胃,均为3wk。分别于术后3,7,14,21d以空气栓塞法随机处死动物,即刻摘除眼球,40g/L多聚甲醛固定24h,流水冲洗,去除角膜及晶状体,做垂直于视网膜血管的视网膜、脉络膜及巩膜全层取材。视网膜组织中VEGF、bFGF定量检测采用SABC法,苏木素复染,脱水,透明,封片,用Imaging Pro Plus4.5版本图象分析系统测出平均吸光度。

统计学分析:应用SPSS 14.0统计学软件进行分析,实验结果所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

表1 兔视网膜 VEGF 和 bFGF 阳性表达的吸光度 ( $\bar{x} \pm s, A$ )

分组	7d	14d	21d
VEGF A组	0.33 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
B组	0.61 $\pm$ 0.29	0.73 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.06
C组	0.50 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	0.46 $\pm$ 0.01
D组	0.49 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	0.44 $\pm$ 0.03
bFGF A组	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
B组	0.56 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.06
C组	0.43 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	0.43 $\pm$ 0.04
D组	0.43 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	0.42 $\pm$ 0.04

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A组,C组,D组;<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 7,21d。

## 2 结果

**2.1 视网膜组织 VEGF 的表达** 各组之间 VEGF 含量有显著性差异( $P < 0.01$ ,表1)。与A组比较,B、C、D组的VEGF含量明显升高( $P < 0.01$ )。造模后7,14,21d,C、D两组VEGF含量明显低于B组( $P < 0.01$ );C、D两组比较,差异无显著性。

**2.2 视网膜组织 bFGF 的表达** 各组之间 bFGF 含量有显著性差异( $P < 0.01$ ,表1)。与A组比较,B、C、D组的bFGF含量明显升高( $P < 0.01$ )。造模后7,14,21d,C、D两组bFGF含量明显低于B组( $P < 0.01$ );C、D两组比较,差异无显著性。

## 3 讨论

我们采用波长532nm的倍频Nd:YAG激光光凝封闭兔眼视网膜视盘两侧髓翼血管系之主干静脉造成缺血视网膜病变模型,经术后观察,该模型完全模拟了临床RVO的发展过程,先是出现了视网膜的水肿、出血,然后视网膜逐渐出现视网膜微血管瘤、视网膜新生血管和视网膜侧支循环。缺血视网膜及新生血管组织中有不同程度VEGF和bFGF表达,提示该模型是成功的,方法简便。视网膜静脉阻塞患者属中医“暴盲”范畴,我们认为该病是眼科典型的血瘀证候,本病存在着眼血液动力障碍、血液流变性异常、血小板聚集及全身微循环障碍等血瘀改变。而且本病的临床特征就是视网膜的分支或中央静脉阻塞后,使脉中血液运行受阻,溢于脉外,导致眼底出血。我们认为,在本病的整个治疗过程中不仅要活血通脉,而且要利水散结明目。正如唐容川在《血证论》所述,“血病而不离乎水”,“血积既久,其水乃成”;“水病而累及血,瘀血化水。”我们认为,RVO患者在临床上除有出血表现外,由于血管阻塞,脉中津液和出血一起外渗,往往伴有视网膜的水肿,渗出,不少患者还伴有黄斑囊样水肿,眼底荧光血管造影时即可见到黄斑区强荧光。因此,其病变过程中始终存在着水血夹杂的病机,在病变的中后期又表现为水血互结,因而必须水血同治。因水与血在生理上同源,在病理上互累,因而治疗上主张用活血通脉利水明目法以活其血,利其水,散其瘀,组方散血明目片。现代药理研究表明,散血明目片组方中大部分药物具有抑制血小板聚集和黏附、改善血液流变性、降低血管的通透性、改善血管的脆性、扩血管、加速止血、防止血栓形成的作用。前期的临床表明<sup>[3]</sup>:活血药与利水药配合使用,可加快出血的吸收,从而促进病变的早日恢复。患者经活血通脉利水明目法后,其血液流变学指标明显改善,这可以看出活血通脉利水明目法治疗视网膜静脉阻塞的初步疗效。同时活血利水之散血明目片能促进玻璃体积血的吸收,改善眼底的状况,改善全

身的血液流变性,降低血液黏滞性和聚集性,降低血小板的活化功能,减轻血管内皮细胞的受损等,从而全面改善患者的血瘀状况,加速积血的清除,提高玻璃体积血患者的视功能<sup>[4,5]</sup>,并能明显降低兔视网膜静脉阻塞 RVO 模型 ET-1 表达<sup>[6]</sup>,降低 MDA 含量,提高 SOD 含量<sup>[7]</sup>。

RVO 是眼科常见的一种缺血性视网膜病变,由视网膜缺血所导致的视网膜新生血管及其引发的一系列并发症(如玻璃体出血、视网膜脱离和新生血管性青光眼),常常可以导致患者视力丧失<sup>[8]</sup>。新生血管的异常增殖关键在于血管生成刺激因子和血管生成抑制因子表达的失衡,在局部血管生长因子的刺激下,血管内皮细胞被激活、迁徙及增生,最后形成新生血管。新生血管的形成是一种极其复杂的生物学过程。大量研究表明,视网膜在受到缺血、缺氧损伤后能释放出大量的细胞因子如 VEGF, bFGF, TGF- $\alpha$ , EGF, PDGF 等,这些生长因子作用于血管内皮细胞,能促进血管内皮细胞基底膜的降解,血管内皮细胞的有丝分裂、趋化、迁徙、增生,内皮细胞与周细胞的相互作用和血管管腔形成<sup>[9]</sup>。越来越多的研究表明,以上因子中,与缺氧相关,刺激视网膜血管增生的最关键因子是 VEGF。VEGF 是一种特异的促进血管内皮细胞分裂的有丝分裂原,是目前所发现的功能最强的促新生血管生成因子。VEGF 的表达与眼内新生血管化存在时空对应关系,检测视网膜的 VEGF 可以探讨视网膜血管新生的情况。bFGF 是一种具有广泛生物活性的肽类物质,它主要分布于细胞质,它的靶细胞有血管内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、神经元、成骨细胞等。bFGF 是强有力的促血管生成剂,内皮细胞和结缔组织细胞为其特异性靶细胞,通过与靶细胞表面特异性的 bFGFR 结合发挥作用<sup>[10]</sup>。它可直接刺激内皮细胞的增生,促进内皮细胞产生蛋白酶,调节内皮细胞表面整合素表达并促进内皮细胞迁移<sup>[11]</sup>。体内外实验均证实,VEGF 和 bFGF 有促进血管生长的作用<sup>[12]</sup>。有作者报道 bFGF 与 VEGF 有明显的时间和浓度关系<sup>[13]</sup>。缺血诱导 bFGF 分泌并作用于缺血的血管壁促进 VEGF 表达,同时又直接促进血管内皮细胞的增殖,起到与 VEGF 协同作用。VEGF 和 bFGF 对细胞的移行、分化、增殖等具有重要影响,参与机体的许多生理、病理过程。

为了探讨散血明目片抑制视网膜血管新生的机制,我们进行了视网膜切片免疫组织化学染色以观察散血明目片是否能影响 VEGF 和 bFGF 的表达。目前普遍认为视网膜内 VEGF 过度表达是引起视网膜内及视网膜下新生血管形成的重要因素。在眼部正常情况下视网膜色素上皮细胞、血管内皮细胞和周细胞可产生少量 VEGF。基础水平的 VEGF 有利于微血管的稳定性。当视网膜缺氧时,可使上述细胞的 VEGF mRNA 表达增加及其蛋白水平升高,VEGF 以旁分泌和自分泌的方式特异性地作用于血管内皮细胞 VEGF 受体(KDR 和 FLT),一方面促使微血管内皮细胞增生形成新生血管<sup>[14]</sup>;另一方面使微血管内皮细胞通透性增强,大分子物质如纤维蛋白原等进入细胞外基质中形成纤维蛋白凝胶,允许和支持新生血管和基质细胞的内向生长<sup>[15]</sup>。本实验中发现实验组中的视网膜内核层、血管内皮细胞、周细胞及视网膜新生血管可见较强的

VEGF 及 bFGF 染色,但色素上皮层未见明显染色。表明 VEGF 及 bFGF 在 CRVO 视网膜新生血管的发生中具有重要的参与机制。以往文献报道认为 VEGF 的表达与眼内新生血管化存在时空对应关系<sup>[16]</sup>,VEGF 的 mRNA 和蛋白水平的表达在新生血管发生前升高,在新生血管退行后下降,而且通常新生血管发生的部位临近于 VEGF 的高表达区。因而,VEGF 表达的强弱可以反映视网膜缺血、新生血管化的程度。本实验结果显示,散血明目片治疗组的视网膜组织中 VEGF 和 bFGF 的表达较模型组弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示散血明目片可抑制 VEGF 和 bFGF 的高表达,从而抑制缺氧诱导的视网膜新生血管的形成。因而散血明目片在视网膜新生血管形成性疾病的预防及治疗中可能具有潜在的应用价值。

#### 参考文献

- 1 彭清华,李建超,张琳,等. 散血明目片治疗玻璃体积血的临床及实验研究. 中国医药学报 2004;19(增刊):61-64
- 2 周正申,王玲,王康孙. 视网膜静脉阻塞的动物模型. 中国实用眼科杂志 2003;21(6):447-451
- 3 彭清华. 活血利水法为主治疗视网膜静脉阻塞的临床研究. 中国中医眼科杂志 1994;4(4):206-209
- 4 张琳,彭清华,李建超. 散血明目片治疗玻璃体积血的实验研究. 中国中医眼科杂志 2002;12(2):63-66
- 5 李建超,彭清华,张琳,等. 散血明目片抑制积血所致 PVR 的实验研究. 中国中医基础医学杂志 2002;8(11):36-39
- 6 彭清华,彭俊,张波涛,等. 散血明目片对兔视网膜静脉阻塞模型 ET-1 表达干预的影响. 国际眼科杂志 2009;9(11):2075-2077
- 7 韩琦,彭俊,彭清华. 活血利水法对兔视网膜静脉阻塞后视网膜抗氧化能力影响的研究. 国际眼科杂志 2009;9(12):2300-2302
- 8 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309
- 9 Agani F, Semenza GL. Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia inducible factor 1 activity. *Mol Pharmacol* 1998;54:749-754
- 10 张君红. 三种血管生长因子及受体与消化系统肿瘤关系的研究进展. 医学文选 2005;24(3):416-417
- 11 Sepp NT, Li LJ, Lee KH. Basic fibroblast growth factor increases expression of the integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1994;103(1):295
- 12 Ferrara N, Houck KA, Jakman LB. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endo Rev* 1992;13:18-32
- 13 Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA. bFGF upregulation the expression of VEGF in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 1995;92(1):4-7
- 14 Gerber HP, Condorelli F, Park J. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997;272(38):23659-23667
- 15 Nomura M, Yamagishi S, Harada S. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 1995;270:28316-28324
- 16 Murata M, Kador PF, Sato S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) enhances the expression of receptors and activates mitogen-activated protein (MAP) kinase of dog retinal capillary endothelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000;16(4):383-391