

护网明目散对实验性糖尿病视网膜微血管内皮细胞影响的研究

肖家翔, 张磊

基金项目:中国贵州省科技厅科技基金资助项目(No. 黔科合丁字[2006]2066号)

作者单位:(550001)中国贵州省贵阳市,贵阳中医学院第一附属医院眼科

作者简介:肖家翔,主任医师,研究方向:眼底病中西医结合诊治研究。

通讯作者:肖家翔. kate-show@163. com

收稿日期:2011-06-13 修回日期:2011-07-21

Investigation of the effects of huwangmingmusan on the microvascular endothelial cells of experimental diabetic retinopathy

Jia-Xiang Xiao, Lei Zhang

Foundation item: Science and Technology Fund of Guizhou Science and Technology Department, China (No. [2006] 2066)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Correspondence to: Jia-Xiang Xiao. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. kate-show@163. com

Received: 2011-06-13 Accepted: 2011-07-21

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of huwangmingmusan on retinal endothelial cells of Wistar rats infected diabetic retinopathy with streptozotocin (STZ).

• **METHODS:** The Wistar rats were divided into three groups: model, Chinese medicine, and western medicine. And also, a healthy group was prepared for comparison. After successive administration for 45 days, the rats eyes were used to prepare retinal vascular digest preparations and stained with PAS routinely. The rats endothelial cells were observed.

• **RESULTS:** No proliferation and apoptosis of rat retinal vascular endothelial cells was in normal group. There were no significant differences between Chinese medicine group and the normal group in the number of endothelial cells and apoptosis ($P > 0.05$); but there were significant differences comparing with model group and western medicine group ($P < 0.01$, $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Huwangmingmusan can inhibit the proliferation and apoptosis of retinal capillary endothelial cells of Wistar rats infected diabetic retinopathy with STZ and have protective effect on the endothelial cells.

• **KEYWORDS:** huwangmingmusan; diabetic retinopathy; endothelial cells

Xiao JX, Zhang L. Investigation of the effects of huwangmingmusan on the microvascular endothelial cells of experimental diabetic retinopathy. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11(9): 1528-1530

摘要

目的:探讨护网明目散对链脉佐菌素(streptozocin, STZ)诱导的糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)大鼠视网膜内皮细胞的影响。

方法:以STZ诱导的DR大鼠分为模型组、中药组、西药组,另设一正常对照组,连续给药45d。实验结束后取大鼠眼球制备视网膜血管消化铺片,行常规PAS染色,观察各组大鼠内皮细胞情况。

结果:正常组大鼠未见视网膜血管内皮细胞增生及凋亡。中药组内皮细胞数及凋亡数与正常组比较均无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,均有明显统计学意义($P < 0.01$);与西药组比较,均有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:护网明目散能抑制实验性DR大鼠视网膜毛细血管内皮细胞增生及凋亡,对内皮细胞有保护作用。

关键词:护网明目散;糖尿病视网膜病变;内皮细胞

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 09. 010

肖家翔,张磊. 护网明目散对实验性糖尿病视网膜微血管内皮细胞影响的研究. 国际眼科杂志 2011; 11(9): 1528-1530

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetic mellitus, DM)最为常见和严重的并发症之一,是临床主要的致盲性眼病。临床上将DR分为单纯型与增殖型,DR一旦发展到增殖型,治疗将十分困难,DR早期的病理改变主要是视网膜微血管内皮细胞的增生及凋亡。因而早期及时治疗单纯型DR,减少DR造成的视功能损害,已日益引起眼科界的广泛关注。有鉴于此,我们采用具有养阴行血功效的护网明目散用于实验性DM,观察其对视网膜微血管内皮细胞的影响,为找到早期治疗DR的有效方药提供实验数据,并为开发出便于推广应用的剂型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 选取鼠龄为6wk的健康Wistar大鼠60只,体

质量为 200 ± 20 g, 适应性喂养 7d 后随机分为模型组、中药治疗组、西药治疗组、正常空白对照组, 每组 15 只。

1.2 方法

1.2.1 DM 动物模型的建立及分组

DM 组大鼠禁食 10h 后, 以链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 40mg/kg 一次性 ip 诱发大鼠 DM。STZ 临用前以 0.1mmol/L、pH4.5 柠檬酸缓冲液溶解, 配置成 20g/L 溶液。正常空白对照组 ip 等量生理盐水。DM 大鼠于 ip 前及 ip 后 72h 检测定性尿糖和血糖, 用微量血糖测量仪 (美国强生稳豪, 配套血糖试纸) 监测血糖, 用强生尿糖试纸测尿糖浓度, 血糖浓度达 16.5mol/L、尿糖达 3+ ~ 4+ 即为 DM 诱发成功。以后每周测 1 次尿糖, 每月测 1 次血糖, 同时观察大鼠一般状况。实验结束时, 去除中间死亡鼠和血糖恢复鼠, 每组以 10 只鼠眼作为实验统计对象。造模 3mo 后开始分组给药。中药治疗组采用护眼明目散 3.25g/(kg·d) (相当于临床 7 倍成人剂量), 蒸馏水稀释至 5mL, 一次性灌胃。西药治疗组应用导升明 120mg/(kg·d), 蒸馏水稀释至 5mL, 一次性灌胃。空白组及模型组给予生理盐水 5mL/d。各组用药 45d。

1.2.2 视网膜血管消化铺片的制作及观察

给药 45d 后每组取实验大鼠 10 只, 用过量戊巴比妥钠麻醉 ip 处死, 取左眼眼球, 固定于 4g/L 福尔马林溶液内 48h 以上, 行视网膜血管消化铺片。清水冲洗多次并浸泡 2h 以上, 于锯齿缘后 0.5mm 处剪开眼球壁, 去除眼前节及玻璃体, 以视乳头为中心, 等分成 4 部分, 剥离视网膜, 于 0.01mmol/L PBS 溶液中 4℃ 过夜, 于 30g/L 胰蛋白酶溶液内, 其缓冲液为 0.01mmol/L PBS (pH=7.4), 37℃, 孵育 2h 以消化神经成分, 停止消化后, 取出视网膜置蒸馏水中漂洗与振荡多次, 以使血管外细胞脱落; 反复吹打, 仅留一薄层透明的血管网, 平铺于洁净的载玻片上, 铺片室温自然干燥, 存放 4℃ 过夜, 切片盒常规 PAS 染色, 观察 DR 的形态学改变。视网膜血管消化铺片 PAS 染色步骤: (1) 视网膜血管消化铺片自来水浸泡 5min; (2) 10g/L 高碘酸溶液室温氧化 15min; (3) 蒸馏水浸洗 5min × 3 次; (4) Schiff 试剂染色 15min; (5) 流水清洗 5min; (6) Mayer 苏木素复染 3min; (7) 流水清洗 5min; (8) 梯度乙醇脱水风干; (9) 二甲苯 I, II 透明各 15min, 非水溶性的封片剂 (DPX) 封片。在光学显微镜下 (PAS × 200) 观察, 自视乳头往前, 随机取视野, 计数 100 个细胞, 分别记录内皮细胞数和周细胞数, 并计算二者的比值 (E/P)。用多功能真彩色病理图像分析仪对目标图像进行定量检测, 统计视网膜毛细血管内皮细胞凋亡积分。

统计学分析: 采用 SPSS 10.5 统计软件, 内皮细胞数和周细胞数的比值用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行处理, 两组间的比较用最小显著差 (LSD-t) 法; 内皮细胞凋亡积分计数资料采用非参数 K-W 秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 内皮细胞和周细胞数的比值

每组 10 只鼠眼内皮细胞和周细胞数的比值为: 正常组 1.9927 ± 0.27828 , 模型组 2.9391 ± 0.54416 , 中药组 2.2842 ± 0.46829 , 西药组 2.8793 ± 0.33916 。中药组与正常组比较无统计学意义 ($t = 0.33, P > 0.05$); 中药组与模型组比较, 有明显统计学意义 ($t = 3.25, P < 0.01$); 与西药组比较, 有统计学意义 ($t = 2.81, P < 0.05$)。

表 1 各组内皮细胞凋亡程度计数比较 (眼, $n = 10$)

组别	无	轻	中	重
正常组	10	0	0	0
模型组	1	2	5	2
中药组	6	2	1	1
西药组	3	1	4	2

2.2 内皮细胞凋亡情况

内皮细胞凋亡的判定标准: 内皮细胞变小, 核浓缩, 核破碎, 早期细胞膜相对完整, 晚期形成由细胞膜包绕的“凋亡小体”。在光学显微镜下 (PAS × 200) 自视乳头往前观察, 如每只鼠眼整个铺片上未见内皮细胞凋亡, 为“无”, 记分为“0”; 如有视野可见 1 个内皮细胞凋亡, 为轻度, 记分为“1”; 如有视野可见 2 个内皮细胞凋亡, 为中度, 记分为“2”; 如有视野可见 ≥ 3 个内皮细胞凋亡, 为重度, 记分为“3”。各组内皮细胞凋亡积分见表 1。各组 10 只鼠眼内皮细胞凋亡积分比较, 中药组与正常组比较无统计学意义 ($H = 0.45, P > 0.05$); 中药组与模型组比较, 有明显统计学意义 ($H = 2.91, P < 0.01$); 中药组与西药组比较, 有统计学意义 ($H = 2.13, P < 0.05$)。

3 讨论

DM 早期首先引起微血管的改变, 在眼底表现为视网膜微血管的扩张, 微血管扩张导致内皮细胞增生及凋亡, 破坏了毛细血管完整性, 血-视网膜屏障受到损害引起一系列病理变化, 继而导致管腔缩窄和血流改变, 促进 DR 后期发生视网膜缺血和新生血管形成, 一旦出现新生血管, 标志进入 DR^[1]。DR 主要病理改变是视网膜血管的损害, 而血管内血液的流变学与此种损害有关。DM 由于血管及血液因素导致毛细血管闭塞, 从而引起毛细血管扩张形成微动脉瘤, 最终发展为视网膜缺血缺氧。缺氧引起视网膜释放大量生长因子, 致使新生血管形成。血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 是最强有力的血管生成因子, 它们共同维持血管内皮细胞的存活和增殖。低氧会引起它们分泌增高, 在 DR 的早期即发挥重要作用。VEGF 是目前已知的最强的促进新生血管形成的细胞因子^[2]。它通过内皮细胞内信号传导途径, 促进血管内皮细胞增殖、迁移, 从而促进新生血管的生成。

中医学对 DR 的认识, 目前较一致的看法是由于 DM 日久, 阴虚精亏, 目失所养而致的变证。阴虚燥热, 久则耗气伤阴, 致气阴两虚与阴阳两虚, 血行失常所为。其早期为阴虚燥热、津亏液少, 不能载血循经畅行而致瘀, 表现为视网膜静脉迂曲, 出现微血管瘤、出血及渗出, 病机基础为阴虚血瘀。我们依据 DR 早期的中医病机理论, 采用具有养阴行血功效的护眼明目散治疗单纯型 DR。本方主药为石斛、白芍、决明子、茺蔚子、赤芍。方中石斛为滋养阴液之要药; 白芍养阴敛血, 对阴虚生热, 血燥液亏者有良好治疗效果; 决明子明目而有清热作用, 既能补阴, 又能清阴虚所生燥热; 茺蔚子养阴行血; 赤芍凉血化瘀。本方以滋阴清热为基, 养阴润燥、清热以护阴, 辅以柔和之行血药, 而不用传统燥烈之性的活血药, 在于防止伤阴化燥, 养阴行血, 以达到保护视网膜功能的作用。

本实验结果显示, 护眼明目散能有效抑制 STZ 性 DM 大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡, 在一定程度上延缓 STZ 性 DM 大鼠视网膜微血管病变的发生发展; STZ 性 DM 大鼠

视网膜血管可见内皮细胞明显增生,视网膜内皮细胞增生有抑制作用,减少促进新生血管生成的因素,对视网膜具有较强的保护作用。

参考文献

1 陈雨,朱晓华. 糖尿病视网膜病变发病机制的研究进展. 国际眼科

杂志 2006;6(2):433-435

2 Goto F, Goto K, Weindel K, *et al.* Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993;69(5):508-517

《中国学术期刊评价研究报告》 (2011-2012) 眼科期刊部分

由中国科学评价中心,武汉大学图书馆及中国科教评价网联袂研发的《中国学术期刊评价研究报告》——RCCSE 权威期刊,核心期刊排行榜与指南于2011年8月由科学出版社正式出版,这在国内外期刊评价史上具有新的里程碑意义。本次学术期刊评价采取“分类评价”与“多元指标”的评价原则,采用定量与定性分析相结合的评价方法,首次采用得分排序与划分等级相结合的方法,以增加评价结果表达的合理性和充分性。在分一级学科的学术期刊评价中,按照集中与离散分布规律,我们按各期刊的综合评价得分排序,依次分为6个等级:①A⁺为权威期刊,即排在最前面的5%的期刊;②A为核心期刊,占各学科期刊总数的15%,即排在5%~20%的期刊;③A⁻为扩展核心期刊,占各学科期刊总数的10%,即排在20%~30%的期刊;④B⁺为准核心期刊,占期刊总数的20%,即排在30%~50%的期刊;⑤B为一般期刊,占总数的30%,即排在50%~80%的期刊;⑥C为较差期刊,占总数的20%,即排在80%~100%的期刊。本次共有6400种中文学术期刊参与评价,在分学科评价中,权威期刊312种,核心期刊961种,扩展核心期刊657种,共计1930种核心区期刊。《中华眼科杂志》被评为A级期刊,《国眼科杂志》和《眼科新进展》被评为A⁻级期刊,其余眼科期刊分别为B⁺级、B级及C级期刊。

摘编自《中国学术期刊评价研究报告》(2011~2012)