

青光安对抗青光术后滤过道瘢痕组织中弹性纤维、MMP-7、TIMP-1 的实验研究

李苑碧, 彭清华, 黄学思, 陈晓柳, 谭涵宇

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273807);教育部博士学科点基金(No. 20124323110006);湖南省自然科学基金重点资助项目(No. 11JJ2050);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目资助;湖南省教育厅科研基金重点资助项目(No. 06A052; 10A094);湖南省研究生创新基金重点资助项目(No. CX2013A013);湖南省卫生厅科研基金项目(No. 204084);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目;湖南省中医五官科学重点学科建设项目

作者单位:(410007)中国湖南省长沙市,湖南中医药大学第一附属医院中医眼科学重点学科

作者简介:李苑碧, 硕士, 住院医师, 研究方向:青光眼、眼底病。

通讯作者:彭清华, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向:青光眼、眼底病。pqh410007@126.com

收稿日期:2014-10-16 **修回日期:**2014-12-19

Effect of Qingguang'an on elastic fiber, MMP-7, TIMP-1 in scarring area of filtration canal after glaucoma surgery

Yuan-Bi Li, Qing-Hua Peng, Xue-Si Huang, Xiao-Liu Chen, Han-Yu Tan

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81273807); Ministry of Education Fund for the Doctoral Program (No. 20124323110006); Natural Science Foundation of Hunan Province, China (No. 11JJ2050); Hunan Province High-Level Health Professionals, "225" Project Training Foundation; Key Projects of Hunan Provincial Education Department Science Research Foundation (No. 06A052; 10A094); Key Projects of Graduate Innovation Fund in Hunan Province (No. CX2013A013); Hunan Provincial Health Department Research Fund Project (No. 204084); Ophthalmology Leading Academic Discipline Project of State Administration of Traditional Chinese Medicine; Hunan Provincial Key Discipline of TCM Features Science Projects

Key Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Correspondence to: Qing - Hua Peng. Key Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. pqh410007@126.com

Received:2014-10-16 Accepted:2014-12-19

Abstract

• **AIM:** To observe the effect of Qingguang'an on elastic fiber, MMP-7, TIMP-1 in scarring area of filtration canal after glaucoma surgery through the four Qingguang'an effective groups and Qingguang'an granules, to discuss and compare their mechanism of action on scarring area of filtration canal.

• **METHODS:** Four effective components of Qingguang'an were used in groups D, E, F, G and H after glaucoma surgery, compared with group A (blank), group B (model) and group C (MMC) to observe the effect of elastic fiber, MMP-7, TIMP-1 in scarring filtration canal.

• **RESULTS:** Compared with the preoperative basic IOP and 2d, 1, 2, 4wk postoperative IOP of groups C, E and H, the IOP of three group rose up slower than other groups, and kept the lowest data at 28d. There was significant difference compared with the rest of A, B, D, F, G groups ($P < 0.05$). The area and density of elastic fiber in surgery group were significantly different with that of black control group ($P < 0.05$), but there were no statistical differences between groups C and H, groups C and F, groups H and E ($P > 0.05$). The difference was statistically significant among other groups ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** The scarring area of filtration canal after glaucoma surgery is the major reason which lead to the failure of surgery. Qingguang'an effective group 2, Qingguang'an granules and MMC could reduced the scar tissue by restrained the elastic fiber, TIMP-1 and increased the MMP-7. By observing the experimental results that both Qingguang'an effective group 2 and Qingguang'an granules could restrained the scarring area of filtration canal, the effects were unbiased, Qingguang'an granules group is better than effective group 2.

• **KEYWORDS:** glaucoma; scarring area of filtration canal; elastic fiber; MMP-7; TIMP-1

Citation: Li YB, Peng QH, Huang XS, *et al.* Effect of Qingguang'an on elastic fiber, MMP-7, TIMP-1 in scarring area of filtration canal after glaucoma surgery. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(1):20-25

摘要

目的:通过观察4种青光安有效组份和青光安颗粒剂对抗

青光眼术后滤过道瘢痕组织中弹性纤维、MMP-7、TIMP-1 的影响,来探讨青光安的有效组份和青光安颗粒剂对抗滤过道瘢痕化的作用机制,并对比青光安有效组份与青光安颗粒剂对抗瘢痕化作用的优劣。

方法:将青光安 4 种有效组份与青光安颗粒剂中药混悬液作用于滤过手术后 D、E、F、G、H 组,通过与 A 组空白对照组、B 组模型组和 C 组丝裂霉素 C 组进行比较,观察青光安 4 种有效组份与青光安中药混悬液对青光眼术后滤过道瘢痕组织中弹性纤维、MMP-7、TIMP-1 的影响。

结果:C 组、E 组和 H 组术前基础眼压与术后第 2d;1,2,4wk 的眼压比较,现眼压较其他组回升缓慢,第 28d 时仍然是最小值,与其余 A、B、D、F、G 组比较差异具有统计学意义。弹性纤维面积密度比较:手术组与空白对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),C 组与 H 组、C 组与 E 组比较,差异无明显统计学意义 ($P > 0.05$),H 组与 E 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。其他各组间比较,差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

结论:青光眼术后滤过道瘢痕化,是导致滤过性手术失败的重要原因;青光安有效组份 2、青光安混悬液和丝裂霉素 C 可通过增加 MMP-7 的表达和抑制弹性纤维、TIMP-1 的表达而减少瘢痕组织增生,具有明显的抗青光眼术后滤过道瘢痕化的作用;通过实验观察可初步说明青光安有效组份 2 与青光安混悬液都具有明显的抑制滤过道瘢痕化的作用,且二者效果持平,青光安中药组略优于青光安有效组份 2 组。

关键词:青光眼;滤过道瘢痕化;弹性纤维;MMP-7;TIMP-1

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.1.05

引用:李苑碧,彭清华,黄学思,等.青光安对抗青光眼术后滤过道瘢痕组织中弹性纤维、MMP-7、TIMP-1 的实验研究.国际眼科杂志 2015;15(1):20-25

0 引言

青光眼目前属于世界性致盲疾病的第 2 位^[1]。由我院自行研制开发的中药复方青光安颗粒剂,已成熟应用于临床 17a,主要药物由黄芪、生地、白术、车前子、茯苓、赤芍、地龙、红花等组成。黄芪补气利水,生地养血滋阴,车前子、茯苓利水,赤芍、地龙、红花活血化瘀,全方组成体现了活血化瘀,利水明目的功用^[2,3]。由于青光安是中药复方药物,其疗效的物质基础不明,因此本课题组在前期研究中通过将高通量筛选药物体系建立在青光安颗粒中药组份库进行有效组份的筛选,筛选出 4 种青光安颗粒剂的最有效组份,并且通过动物实验验证其中的第二种组份最有效。本实验将前期研究筛选出的 4 种青光安颗粒有效组份与青光安颗粒剂通过滤过手术动物模型进行抗 MMP-7/TIMP-1 的对比观察,通过观察抑制其活性的效果来得出哪一种青光安药物更能抑制瘢痕的增生,从而为青光安的新药研究开发提供有效的实验基础支持。

1 材料和方法

1.1 材料 选取健康成年新西兰长耳白兔 48 只,远交系,

SPF 级,雌雄不拘(由湖南中医药大学动物实验中心提供),体质量 1.5 ~ 2.0kg。试验前排除兔的全身性病变,双眼部检查均未见异常。将 48 只新西兰长耳白兔按随机数字法分成 A、B、C、D、E、F、G、H 共八组,每组 6 只。分别为:空白组、模型组、MMC 对照组、有效组份 1 组、有效组份 2 组、有效组份 3 组、有效组份 4 组、青光安颗粒剂中药混悬液组。除 A 组外各组实验动物均行小梁切除术+虹膜根部切除术,A 组不作任何处理;C 组术中联合使用丝裂霉素 C;各组在术后第 1d 开始给药。

1.2 方法

1.2.1 青光眼滤过手术动物模型的建立 造模前 1d 对每只兔进行术前眼部及全身健康情况的排查后,除空白组 6 只兔作正常对照外,其余所有兔参照文献[4]的方法并稍加改进双眼行常规小梁切除+虹膜根部切除术,术前配制浓度为 10% 的水合氯醛溶液,按 2mL/kg 耳缘静脉注射麻醉,压迫式眼压计测基础眼压并作记录。生理盐水清洗结膜囊,在手术显微镜下行双眼小梁切除术;上简易开睑器撑开眼睑,在 10:00 ~ 2:00 方位选取合适位置,自角膜缘剪开球结膜,做以穹隆部为基底的矩形球结膜瓣,分离结膜下组织,在 11:00 ~ 1:00 方位选取合适位置,做以角膜缘为基底、具有 1/2 巩膜厚、约 3mm×3mm 大小的巩膜瓣,提起巩膜瓣,分离至角膜缘内 0.5mm 左右,剪除巩膜瓣下的巩膜组织约 1mm×2mm 大小,可见房水流出,再剪除周边虹膜组织;复位巩膜瓣并对合,观察虹膜切口大小是否合适,10-0 缝线在巩膜瓣两角各固定 1 针,10-0 缝线紧密缝合结膜瓣。左眼同法操作。手术完成后均于非手术区球结膜下注射庆大霉素加地塞米松 0.5mL 一次,术后 1wk 每日滴妥布霉素地塞米松眼药水与左氧氟沙星眼药水 1 次抗感染治疗,3 次/d。

1.2.2 给药方法 空白组与模型组均于术后第 1d 开始予生理盐水灌胃,10mL/kg,每日 1 次,持续 4wk;MMC 采用术中给药的方式(参照目前 MMC 与滤过手术联合使用的常用方法),即在做巩膜瓣之前,用一块 3mm×4mm 含 MMC 的棉片(MMC 浓度 0.2mg/mL)放置在手术区巩膜上,放置时间为 3min,之后立即取出棉片,用 100mL 生理盐水清洗术区,以洗净 MMC 药液,然后继续行后续手术操作。有效组份 1~4 组在术后第 1d 开始给药,各组以相应的有效组份灌胃,例如有效组份 1 组,用青光安有效组份 1 按照成人体表面积法以及药物组份提取收集率,算得每只兔的用药剂量,将药物溶于 10mL 生理盐水中,每日 1 次,连续灌胃 4wk。青光安中药混悬液在术后第 1d 开始给药,按照人和动物间体表面积折算的等效剂量比值表,得出每只兔的给药量公式:兔的剂量 = 3.27×人的给药量(设人的给药量为 α),则公式为 3.27 α mg/kg,按 10mL/kg 给药。

1.2.3 眼压测量方法及弹性纤维增殖情况观察 眼压的测量方法参照文献[5]。弹性纤维增殖情况观察:于造模后 28d 滤过泡区域内 Tenon 囊组织病理切片 Masson 染色后,在光镜 400 倍视野下观察滤过泡内弹性纤维的情况。

1.2.4 滤过泡区域内 Tenon 囊下 MMP-7 和 TIMP-1 的表达情况 术后常规饲养条件下饲养及给药 4wk 后,耳缘

表1 手术组动物术后眼压测量结果

组别	术前第1次	术后第2d	术后1wk	术后2wk	术后4wk
A组	17.32±0.97	17.23±1.27	16.67±0.47	16.25±0.66	16.61±0.84
B组	16.51±0.85	9.42±0.45	13.84±1.05	16.03±1.03	16.39±0.80
C组	17.15±1.07	8.64±0.97	9.40±1.04	10.55±1.35	10.87±1.83
D组	16.52±1.40	8.59±0.94	11.47±0.87	13.51±1.30	15.81±1.67
E组	17.40±1.0	8.71±1.12	9.93±0.87	11.97±0.10	12.63±0.54
F组	17.76±1.15	8.84±1.31	11.25±0.10	14.59±1.17	14.89±1.92
G组	17.66±1.15	9.57±0.85	12.12±0.88	15.55±0.65	16.40±0.59
H组	18.26±1.12	9.17±0.64	11.48±0.88	14.31±0.73	14.98±0.61

表2 术后第4wk弹性纤维面积密度定量分析

组别	标本1	标本2	标本3	标本4	标本5	标本6	$\bar{x} \pm s$
A组	0.067	0.069	0.063	0.073	0.046	0.054	0.062±0.010
B组	0.424	0.482	0.509	0.351	0.478	0.481	0.454±0.058
C组	0.175	0.180	0.155	0.264	0.122	0.232	0.188±0.052
D组	0.318	0.291	0.337	0.223	0.381	0.357	0.318±0.056
E组	0.216	0.237	0.219	0.133	0.363	0.341	0.252±0.086
F组	0.385	0.416	0.422	0.304	0.375	0.395	0.383±0.426
G组	0.450	0.321	0.396	0.408	0.479	0.350	0.401±0.059
H组	0.234	0.229	0.264	0.212	0.112	0.205	0.209±0.052

静脉空气注射栓塞处死动物。用缝线标明眼球水平位及在颞上方标明滤过泡位置后,分离眼周组织,在不损坏滤过区组织结构的前提下,完整摘除眼球。摘取左眼球标本,生理盐水冲洗后,放入4%多聚甲醛固定2h后,用注射器从6:00方向角巩膜缘刺入眼球,向内注入少量4%多聚甲醛,再投入固定液中固定24h^[6]。眼球标本固定24h后,将标本从固定液中取出,用锋利剪刀剪下眼球上手术区10mm×10mm范围内的全层眼球壁及周边组织,制作石蜡切片。取其中一部分做免疫组化后,在滤过泡 Tenon 囊区域随机的选择5个高倍视野测定MMP-7和TIMP-1的平均光密度,计算平均值作为样本中MMP-7和TIMP-1的表达量,二者的阳性部位位于细胞浆内,体现为存在于细胞浆中的深棕色细胞颗粒。

统计学分析:所有实验数据采用SPSS 19.0系统软件处理。计量资料实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先进行正态性分布及方差齐性检验,若满足正态性和方差齐性,多组比较采用方差分析(LSD-t法及Dunnnett法)。不满足正态性和方差齐性时,则用非参多重比较。计数资料采用 χ^2 检验,方差不齐者进行秩和检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义,以 $P < 0.01$ 为检验非常显著性标准。

2 结果

2.1 青光眼术后各组的的眼压测量结果 各组动物术后眼压测量结果见表1。同一时间不同组之间眼压值的比较:C、E组控制眼压效果最好,F、H组其次,D、G组效果较差。同一组间不同时间段的眼压值比较:E组能使眼压下降并且在第2wk开始保持在一个低于术前的水平;F组、G组、H组与E组眼压分析情况大致相同,均在术后第2wk维持在了一个稳定的低于术前眼压的水平,但比较组间的眼压值仍然是E组稍好一些^[5]。

2.2 滤过手术区域弹性纤维增殖情况 造模后28d滤过泡区域内 Tenon 囊组织病理切片 Masson 染色后,在光镜

400倍视野下观察滤过泡内弹性纤维的情况(图1),具体数值见表2。在术后第4wk,各手术组弹性纤维的面积密度都有不同程度的增加,实验数据满足正态性和方差齐性,用LSD-t法及Dunnnett法进行统计学分析,结果显示:手术组与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。C组与H组、C组与E组比较,差异无明显统计学意义($P > 0.05$),H组与E组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其他各组间比较结果均为,差距有显著统计学意义($P < 0.01$)。从实验结果可看出,术后使用几种中、西药物对术后滤过道弹性纤维的增殖均有一定的抑制作用,其中从均值来比较丝裂霉素C的作用最强,有效组份2和青光安的抑制作用也很显著。

2.3 滤过手术区域 MMP-7 和 TIMP-1 的表达情况 造模后28d滤过泡区域内 Tenon 囊组织病理切片进行免疫组织化学方法制作后,在光镜400倍视野下观察滤过泡内MMP-7/TIMP-1的情况(图2,3),具体数值见表3,4。在术后第4wk,各手术组MMP-7和TIMP-1的表达都有不同程度的增加和减少,实验数据满足正态性和方差齐性,用LSD-t法及Dunnnett法进行统计学分析,结果显示:手术组与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。观察滤过泡内MMP-7与TIMP-1的表达,如表3,4。在造模后第4wk,各组MMP-7表达较空白对照组滤过泡 Tenon 囊下组织都有不同程度的减少,多组数据采用方差分析的结果示:除C组和H组,C组和E组,H组与E组,B组与G组,F组与G组组间比较 $P > 0.05$,表达差异无明显统计学意义。其他组间两两比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在造模后第4wk,各组TIMP-1的表达较空白对照组滤过泡 Tenon 囊下组织都有不同程度的增加,多组数据采用方差分析的结果示:除C组和H组,C组和E组,H组与E组,B组与G组,F组与G组组间比较 $P > 0.05$,表达差异无明显统计学意义。其他组间两两比较,差异具有

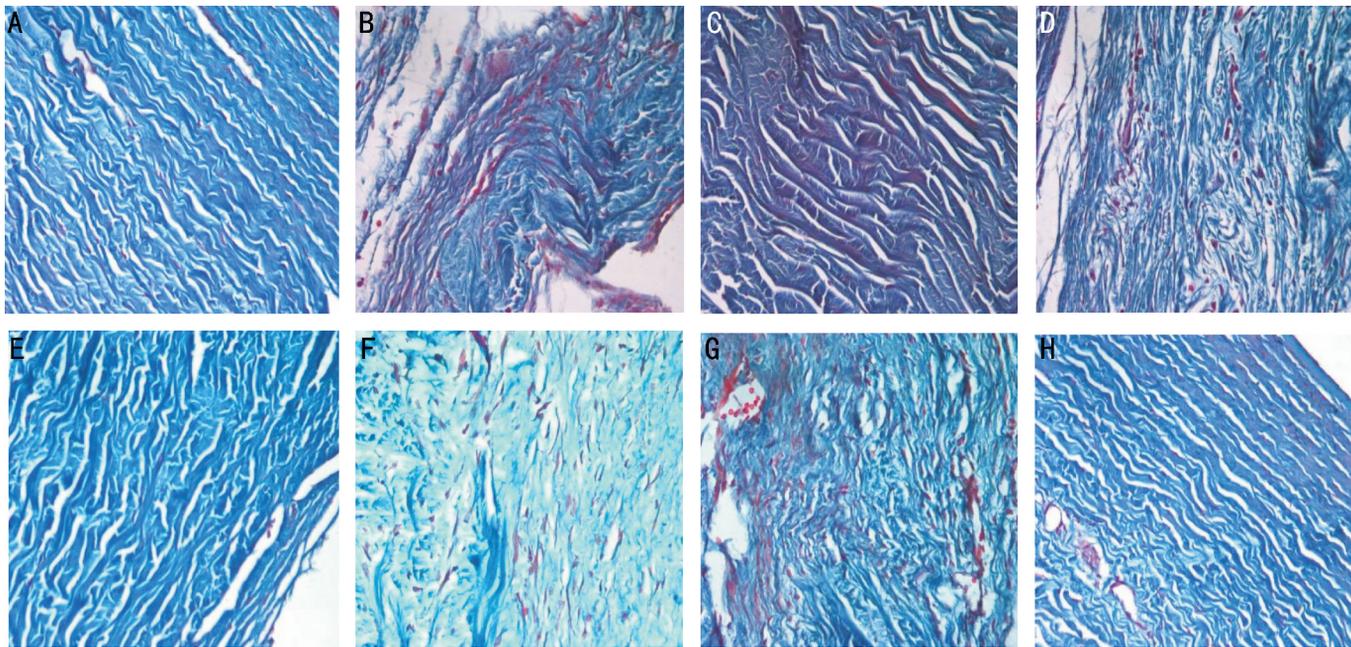


图1 Masson 染色观察弹性纤维 A: A组正常结膜组织中弹性纤维极少; B: B组组织见大量深色颗粒细胞, 形态规则排列极其不整齐, 组织紊乱; C: C组滤过道组织疏松, 未见明显弹性纤维分布; D: D组深色蓝染细胞及弹性纤维较多, 形态不规则, 颜色较深, 排列紊乱; E: E组组织区域见少量蓝染细胞, 组织走向基本整齐, 弹性纤维不多; F: F组组织见有大量浅红色棉絮状纤维组织, 弹性纤维分布多; G: G组组织排列紊乱, 走向不齐, 见大量深色颗粒分布, 并有空腔; H: H组组织纹理走向基本整齐, 深色颗粒细胞不多, 弹性纤维少量分布。

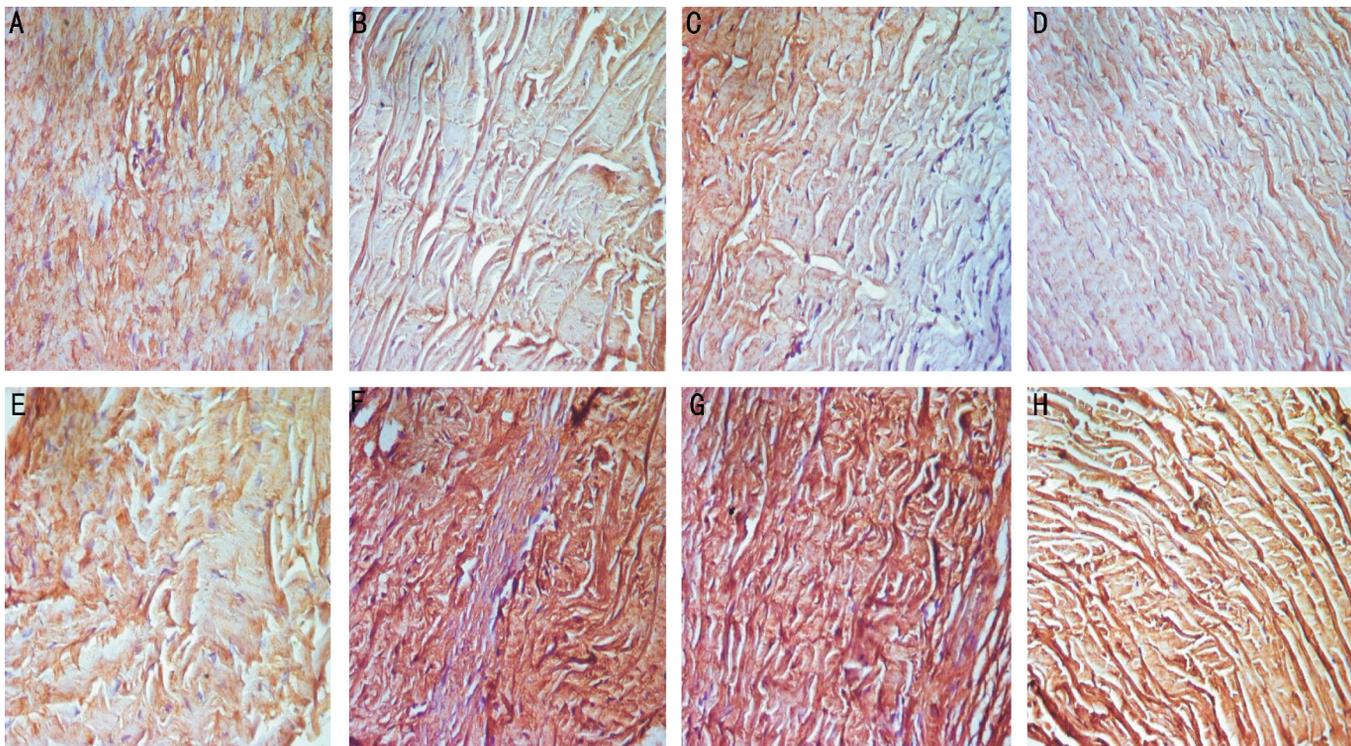


图2 免疫组化观察 MMP-7 的表达 A: A组 Tenon 囊下组织结构纹理清晰, 见许多深色细胞颗粒; B: B组组织结构紊乱, 少量蓝染的深色细胞颗粒浸润, 纤维排列紊乱; C: C组细胞颗粒比正常组稍少, 但组织纤维排列稀疏; D: D组组织结构致密稍紊乱, 有少量的蓝染细胞分布; E: E组组织结构稀疏, 走向整齐, 有中等量蓝染细胞; F: F组组织结构致密, 走向紊乱, 有空腔, 中等量的蓝染细胞; G: G组组织结构十分致密, 纤维多且走向紊乱, 其间分布少量蓝染细胞; H: H组组织结构疏松, 走向基本整齐, 纤维不多, 蓝染细胞多见。

统计学意义 ($P < 0.05$)。从实验结果可以得出结论, 青光眼滤过手术在术中使用丝裂霉素 C 可以使术后滤过道瘢痕组织中的 MMP-7 分泌增多, 而 TIMP-1 分泌合成相对减少, 而术后口服青光安有效组份和青光安混悬液可以在不同程度上促进 MMP-7 的分泌合成, 抑制 TIMP-1 的分泌合成, 有效组份 2 和青光安效果大致持平, 从均值上分

析, MMC 的作用较青光安混悬液及青光安有效组份好。

3 讨论

青光眼是致盲率较高的眼科疾病, 其致盲率占致盲总数的 5.1% ~ 21% [7]。所以手术治疗仍然是青光眼疾病的主要方法。但在术后伤口的愈合过程中, 却有导致滤过口及巩膜表层、结膜下组织瘢痕化的危险, 最终致手术失败。

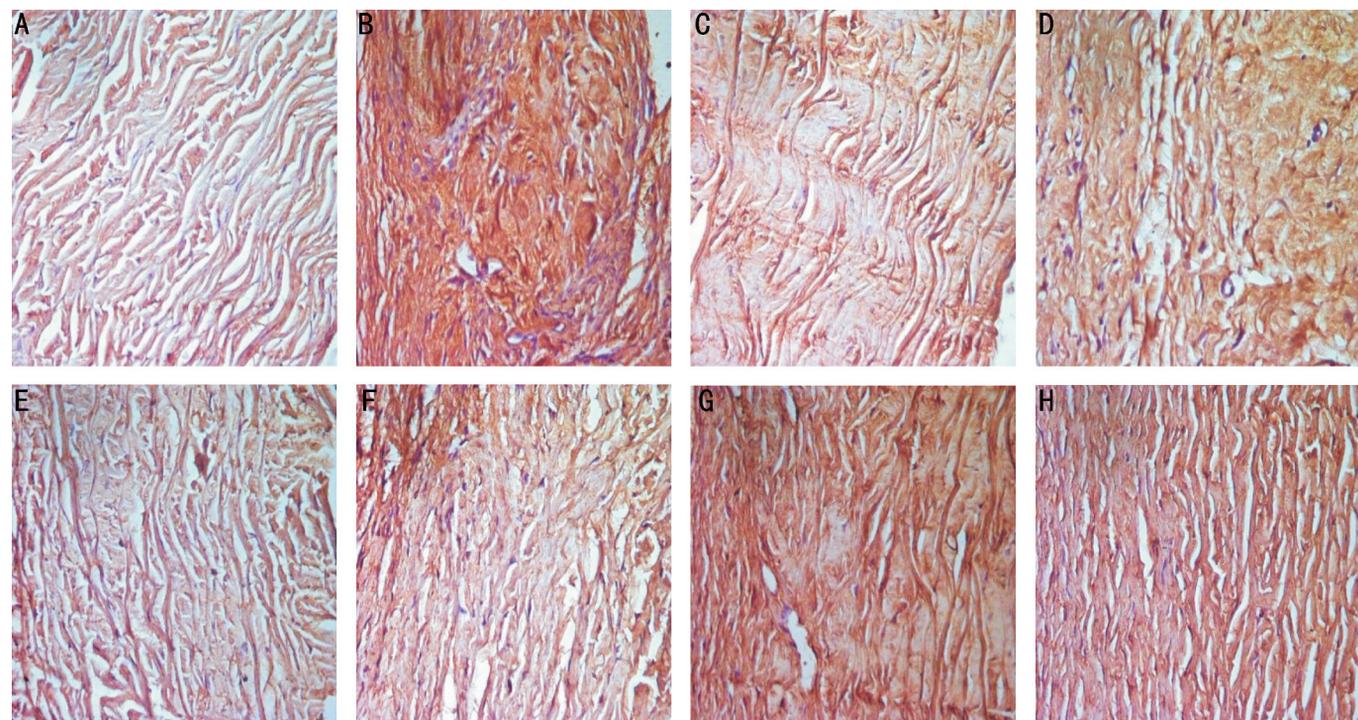


图3 免疫组化观察TIMP-1的表达 A:A组滤过泡区域内组织排列整齐,未见量较多的深色颗粒; B:B组滤过道组织内见大量深色蓝染颗粒,组织排列紊乱,走向不齐; C:C组滤过道组织较疏松,见少量深色颗粒,组织排列基本整齐; D:D组TIMP-1深色颗粒密度中等,胶原纤维稀疏,呈淡红色。未见炎症反应及新生血管; E:E组手术区结膜下为相对疏松结缔组织区域,深色蓝染颗粒分布其中; F:F组滤过泡及滤过道位置被大量增生的成纤维细胞和胶原纤维所填满,并可见大量深色颗粒,纤维致密; G:G组滤过泡内增生瘢痕组织形态与B组相似,可见大量的深色蓝染颗粒细胞,及致密粗大的胶原纤维,增生致密,有空泡形成; H:H组滤过泡瘢痕组织中深色蓝染颗粒细胞数量不多,组织分布走向整齐。

表3 术后第4wk滤过手术区域内MMP-7平均光密度结果

组别	标本1	标本2	标本3	标本4	标本5	标本6	$\bar{x} \pm s$
A组	0.53	0.53	0.54	0.43	0.46	0.51	0.50±0.043
B组	0.06	0.13	0.08	0.11	0.12	0.09	0.098±0.035
C组	0.50	0.44	0.39	0.29	0.42	0.43	0.412±0.070
D组	0.25	0.35	0.28	0.36	0.27	0.21	0.287±0.058
E组	0.35	0.39	0.43	0.31	0.31	0.39	0.363±0.048
F组	0.22	0.27	0.25	0.19	0.21	0.18	0.220±0.035
G组	0.19	0.29	0.26	0.15	0.13	0.11	0.188±0.073
H组	0.39	0.36	0.48	0.46	0.35	0.33	0.395±0.062

表4 术后第4wk滤过手术区域内TIMP-1平均光密度结果

组别	标本1	标本2	标本3	标本4	标本5	标本6	$\bar{x} \pm s$
A组	0.15	0.14	0.16	0.15	0.25	0.11	0.160±0.047
B组	0.52	0.48	0.42	0.58	0.59	0.48	0.512±0.065
C组	0.25	0.28	0.18	0.30	0.20	0.21	0.237±0.048
D组	0.27	0.32	0.38	0.36	0.46	0.33	0.353±0.064
E组	0.38	0.20	0.19	0.32	0.31	0.26	0.277±0.074
F组	0.40	0.47	0.48	0.43	0.34	0.46	0.430±0.053
G组	0.35	0.53	0.47	0.46	0.44	0.40	0.442±0.062
H组	0.28	0.19	0.16	0.34	0.29	0.32	0.263±0.072

实验研究提示在滤过手术后滤过道的愈合过程将会经历手术后创伤反应,各种炎性细胞浸润及纤维素性渗出阶段,中期成纤维细胞增殖、移行,晚期胶原大量形成肉芽组织成形。

细胞外基质(ECM)是一类由胶原、蛋白聚糖及糖蛋白等大分子蛋白组成的动态网状结构。它由基膜(BMs)和间隙结缔组织(ICT)两个类别构成。基膜的主要成分

由IV、VII型胶原和层粘连蛋白(LN)构成;间隙结缔组织则由大量胶原, FN及弹性蛋白及一些蛋白聚糖构成^[8]。MMPs是降解ECM的最重要的酶系。近年来,研究发现调控ECM的主要物质为基质金属蛋白酶(MMPs)和其天然的抑制剂——组织基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)。究其原因,是MMPs直接以酶原的形式分泌到细胞外基质中的,并且在正常的生理条件下发挥其降解功用,它的表

达和活性均受到各个环节的严格调控,且在 ECM 重组的部分易于诱导表达,且 MMPs 中的某些酶类是至今为止所发现的唯一能分解纤维类胶原的酶类。

青光安颗粒剂是我院眼科已具有相当研究基础的中药复方。主要的药物由黄芪、生地、车前子、茯苓、赤芍、地龙、红花等组成^[9]。在对青光安颗粒剂的相关临床及动物试验研究中发现:参加研究的患者随机分为对照组和青光安颗粒剂组,常规行小梁切除术或虹膜周边切除术后,青光安颗粒剂组患者在规定时间服用青光安颗粒剂后视力、视野均较服用常规能量剂与维生素类药物由显著提高,且在对患者的远期疗效观察中其视力视野都基本维持在一个稳定的范围内,没有出现严重的恶化;在对青光安颗粒剂的兔急性高眼压状态下动物实验中发现青光安颗粒剂能有效提高视网膜 SOD 活性,降低 MDA、NO 与谷氨酸含量,起到保护视网膜功能的作用;在对兔慢性高眼压状态下对兔眼内组织的观测中发现青光安颗粒剂能有效保护慢性高眼压下虹膜、睫状体及视神经轴、筛板的功用,减少 TUNEL 细胞;在青光安颗粒剂对高眼压兔眼滤过手术后研究发现青光安颗粒剂组能减少术后兔眼结膜下的成纤维细胞及胶原纤维的数量,较少瘢痕的形成。说明青光安颗粒剂能有效保护青光眼术后患者的眼部各项功能,提高视力和视野,维持眼部的良性循环状态。在青光安长期的临床使用过程中,逐渐发现它能对青光眼术后患者滤过道的功能维持以及眼压的控制等方面起到较好的调节,收到了良好的临床疗效,因此为了进一步研究青光安提高青光眼术后眼部功能的物质基础和作用机制,前期研究已经将抗滤过道瘢痕化的高通量药物筛选体系应用于青光安,从青光安颗粒剂中分离出了 50 余种组份,建立了青光安中药组份库,随后选用 24 孔培养板进行 Tenon 囊成纤维细胞培养,使用倒置荧光显微镜并流式细胞仪检测方法,观测各个组份对体外培养的成纤维细胞中 TGF- β 1 表达的影响,进行反复筛选后,最后筛选出了结果最优的 4 种青光安有效组份,证明了该 4 种组份能有效的抑制离体培育的成纤维细胞的增殖,并可以减少细胞内蛋白的合成分泌。且将其进行动物实验,经过成功建立滤过手术动物模型,将 4 种组份应用于术后动物模型上,并通过与空白组、手术模型组、MMC 药物组对比,得出结果:青光安有效组份 2 和 MMC 均可经过抑制成纤维细胞增殖和 I 型胶原蛋白表达而减少瘢痕组织增生,有明显的抗青光眼术后滤过道瘢痕化的作用,且实验动物口服 1mo 无全身毒性反应和眼部损害反应,口服 1mo 短期内无急、慢性毒性反应,口服作用安全。青光安属于中药复方药物,目前在对中药复方的现代化研究领域出现了很多新兴技术,极大的提高了中药复方药物的研究进程,但仍然存在很多问题和困难。例如:(1)中药复方中的有效成分是多成分组共同发挥作用,并不是一个两个单一的成分发挥作用;(2)中药复方的有效成分除了一部分是其本身含有对治疗相应病症有效的成分外,其他部分很有可能是复方在煎煮过程中药物成分之间相互作用产生的新的有效成分或药物进入人体后在体内经代谢产生,难以用简单的药物分析方法加以分析^[10]。中药复方的化学成分通常有数十种、数百种甚至上千种,而中药原药材的产地,加工,剂量和配伍的变化都会使复方在质和量上发生很多变化,难以精确的分析

发挥药效的是哪些化学成分。中药现代化研究是我们面临的重大的具有我国医疗领域独特的课题,在中药现代化的研究领域里,中药复方又是作为其中十分重要和突出的研究重点,因为中药复方,特别是一些经过几千年实践和验证的疗效复方,对其使用中药现代技术方法进行提取和精制后,对我国中医药产业走向世界具有十分重要的推动作用。但经过多项研究和实验,包括采用目前比较先进的新兴技术制成的中药复方药物往往达不到中药汤剂的效果,而且提纯度越高效果越不理想。这就需要我们不断的进行对比和实验,推进中药复方现代化的研究。本实验将筛选出的 4 种有效组份与青光安颗粒剂进行滤过手术动物实验,通过观察在瘢痕形成中起重要作用的 ECM、MMP-7/TIMP-1 酶系组合的情况,来比较两种不同的青光安药物的抗瘢痕作用优劣。方法同前期实验中的实验方法,将 4 种有效组份与青光安颗粒剂应用在滤过手术动物模型上,通过与空白组、模型组与 MMC 组进行比较,青光安有效组份 2 组、青光安中药混悬液组和丝裂霉素 C 组均能在造模后第 4wk 时使眼压维持在低于术前眼压的水平;术后第 4wk 取眼球标本做 Masson 染色观察弹性纤维,结果显示该 3 组弹性纤维面积密度含量均比其他组要低,与其他各组间比较结果均为 $P < 0.01$,差距有显著统计学意义。证明该 3 组能够有效增加 MMP-7 的表达和抑 TIMP-1 的表达,控制滤过道的瘢痕化。两种青光安制剂都能有效抑制滤过手术后滤过道的瘢痕化进程,二者效果基本持平,青光安中药组略优于有效组份 2 组。由此我们认为青光安有效组份 2 和青光安中药抗青光眼术后滤过道瘢痕化的作用机制可能是由于 I 型胶原等细胞外基质的密度降低,其交联黏附力度不够,反过来又抑制了成纤维细胞的增殖。以上几个原因循环交互,最终使得滤过道瘢痕组织增生较少,保持了滤过道的通畅。

通过实验观察可初步说明青光安有效组份 2 与青光安混悬液都具有明显的抑制滤过道瘢痕化的作用,且二者效果持平,青光安中药组略优于青光安有效组份 2 组。

参考文献

- Allingham RR, Damji KF, Freedman S, et al. 青光眼教科书. 北京:人民卫生出版社 2009;45-50
- Greenlee EC, Kwon YH. Graft failure: Glaucoma escalation after penetrating keratoplasty. *Int Ophthalmol* 2008;28(3):221-225
- 李美玉. 青光眼学. 北京:人民卫生出版社 2004;588-589
- 陈璧. 增生性瘢痕机制研究进展. *中华创伤杂志* 2001;17(6):325-326
- 刘艳,彭清华. 青光安有效组份对兔眼滤过术后滤过道瘢痕组织成纤维细胞和 I 型胶原蛋白的影响. *国际眼科杂志* 2013;13(5):845-849
- 付霞,刘金华,梁秀就. 大鼠眼球标本石蜡切片的改良制作方法. *眼科新进展* 2007;6:417-419
- Cordeiro MF, Bhattacharya SS, Schultz GS, et al. TGF- β 1, - β 2 & - β 3 *in vitro*: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation & migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):756-763
- 孙兴怀. 青光眼手术治疗的进展及其选择. *继续医学教育* 2006;20(21):40-48
- 彭清华,东长霞,李建超. 青光安颗粒剂对急性高眼压实验模型兔视网膜组织酶活性影响的实验研究. *中医药学刊* 2004;22(12):2179-2180
- 贾晓斌,陈彦,李霞. 中药复方物质基础研究新思路和方法. *中华中医药杂志* 2008;23(5):420-425