

# 驻景方对病理性近视脉络膜新生血管 VEGF 表达的影响

田楠楠<sup>1</sup>, 亢泽峰<sup>2</sup>, 张庆<sup>1</sup>, 江伟<sup>2</sup>, 李凌<sup>3</sup>, 王永贵<sup>4</sup>

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81072843)

作者单位:<sup>1</sup>(810001) 中国青海省西宁市, 青海大学医学院;  
<sup>2</sup>(100040) 中国北京市, 中国中医科学院眼科医院;<sup>3</sup>(810001)  
中国青海省西宁市, 青海省人民医院;<sup>4</sup>(037002) 中国山西省大同市, 解放军第 322 医院

作者简介: 田楠楠, 女, 硕士, 研究方向: 中西医眼科临床。

通讯作者: 亢泽峰, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 眼底病. zefeng2531@163.com

收稿日期: 2013-04-26 修回日期: 2013-07-19

## Effect of modified Zhu Jing prescriptions on the expression of VEGF in pathological myopia with choroidal neovascularization

Nan-Nan Tian<sup>1</sup>, Ze-Feng Kang<sup>2</sup>, Qing Zhang<sup>1</sup>, Wei Jiang<sup>2</sup>, Ling Li<sup>3</sup>, Yong-Gui Wang<sup>4</sup>

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81072843)

<sup>1</sup>Medical College of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China; <sup>2</sup>Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China; <sup>3</sup>Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810001, Qinghai Province, China; <sup>4</sup>The 322<sup>nd</sup> Hospital of Chinese PLA, Datong 037002, Shanxi Province, China

Correspondence to: Ze-Feng Kang. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China. zefeng2531@163.com

Received: 2013-04-26 Accepted: 2013-07-19

## Abstract

• AIM: To observe the effect of traditional medicine to the expression of vascular endothelium growth factor (VEGF), and explore the intervention effect to the pathological myopia with choroidal neovascularization (CNV) through experimental model of lasers-induced CNV in guinea pigs with pathological myopia induced by form deprivation.

• METHODS: Fifteen of the forty-five 3-week old female guinea pigs were randomly selected as the blank control group, the rest 30 guinea pigs were using facemask to induce high myopia in 4 weeks, then randomly assigned to model group and treatment group, then induced CNV by different wavelength laser. The treatment group gavigated with modified Zhu Jing prescriptions while the control group was gavigated with distill water. 21 days after treatment, histopathologic choroidal flat mounts, HE stain, immunofluorescence stain and immunohistochemistry for VEGF in the experimental eyes and control eyes were performed.

• RESULTS: All the 30 guinea pigs were successfully induced high myopia and the axial length of the right eyes were significantly greater than the non-facemask eyes and the eyes of control group. Immunofluorescence stain and immunohistochemistry for VEGF showed that the expression of VEGF of the treatment group was less than the model group. The average optical density (AOD) of the form deprivation eye in the treatment group ( $0.0589 \pm 0.0146$ ) was higher than that in the model group ( $0.0972 \pm 0.0507$ ) ( $P < 0.01$ ).

• CONCLUSION: Modified Zhu Jing prescriptions has a positive effect to the reduction of the VEGF expression in the CNV with pathological myopia and thus it can inhibit the growth of CNV.

• KEYWORDS: modified Zhu Jing prescriptions; pathological myopia; choroidal neovascularization; vascular endothelium growth factor

Citation: Tian NN, Kang ZF, Zhang Q, et al. Effect of modified Zhu Jing prescriptions on the expression of VEGF in pathological myopia with choroidal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(8):1525-1528

## 摘要

目的: 观察中药驻景方对氩激光诱导的病理性近视脉络膜新生血管 VEGF 表达的影响, 探讨中药驻景方对病理性近视脉络膜新生血管的干预作用。

方法: 将 3 周龄雌性三色豚鼠 45 只随机选出 15 只为空白对照组, 剩余豚鼠均带头套右眼形觉剥夺诱导病理性近视, A 超检影(诱导失败者剔除出组)并随机分为模型组、中药组, 双眼行氩激光光凝。中药组于光凝后第 2d 开始连续灌胃 21d,  $3.285\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , 每次 1.5mL, 1 次/d。21d 后行脉络膜铺片、HE 染色、免疫荧光、免疫组织化学观察。

结果: 形觉剥夺 4wk 后右眼均诱导出高度近视, 且眼轴较左眼增长; 脉络膜铺片及免疫荧光示模型组右眼 CNV 面积及视网膜 VEGF 表达均明显高于左眼 ( $P < 0.01$ ), 中药组右眼 CNV 的面积及 VEGF 的表达较模型组右眼减少 ( $P < 0.01$ ); 免疫组织化学结果显示, 中药组右眼 VEGF 的平均光密度值 ( $0.0589 \pm 0.0146$ ) 较模型组右眼 ( $0.0972 \pm 0.0507$ ) 减少 ( $P < 0.01$ )。

结论: 中药驻景方可抑制氩激光诱导的病理性近视脉络膜新生血管的生长及 VEGF 的表达。

关键词: 中药驻景方; 病理性近视; 脉络膜新生血管; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.08.03

引用: 田楠楠, 亢泽峰, 张庆, 等. 驻景方对病理性近视脉络膜新生血管 VEGF 表达的影响. 国际眼科杂志 2013;13(8):1525-1528

## 0 引言

病理性近视又称高度近视,是指屈光度 $>-6.00D$ ,视力进行性下降,且多伴有眼轴延长和眼底出现的眼病,常伴有眼底的退行性改变,包括后巩膜葡萄肿、视网膜脉络膜萎缩、Fuchs斑、漆裂纹及脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)等<sup>[1]</sup>。而 CNV 是病理性近视视力损害而致盲的最重要原因<sup>[2]</sup>,但其发病机制尚不明确。其中血管内皮生长因子(vascular endothelium growth factor, VEGF)是目前发现的作用最强的、促进眼部新生血管形成的因子<sup>[3]</sup>,它特异地作用于血管内皮细胞,增加血管的通透性、刺激内皮细胞分裂,促进新生血管生成<sup>[4,5]</sup>。本研究通过建立豚鼠病理性近视 CNV 模型,研究 VEGF 在病理性近视 CNV 形成过程中的表达和中药驻景方对其的干预作用,为中医药治疗此类疾病提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验仪器** 多波长氩激光机(Laserex LP352, Lumenis Inc., Salt Lake City, UT),冰冻切片机(Leica CM1850),生物显微镜(重庆奥特光学仪器公司),荧光倒置显微镜(Olympus IX81)。

**1.1.2 实验动物及试剂** 英国属短毛三色豚鼠45只,雌性,3周龄,体质量150~200g(北京芳元缘养殖场)。兔抗人多克隆抗体 VEGF(北京博奥森生物技术有限公司),Alexa Fluor 555 标记的羊抗小鼠 IgG(北京博奥森生物技术有限公司),SP 免疫组化检测试剂盒(兔,北京博奥森生物技术有限公司),DAPI 染色液(北京博奥森生物技术有限公司),AEC 底物显色试剂盒(康为世纪),苏木素染料、伊红染料(北京益利公司),水性封片剂(康为世纪),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC, Amresco 公司)。

**1.1.3 中药** 中药驻景方加减,由楮实子、枸杞子、菟丝子、五味子、三七等组成,由四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供,浓度为3.285g/(kg·d)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立及分组** 将45只3周龄健康无眼疾雌性英国种短毛三色豚鼠随机抽出15只为空白对照组,无任何干预;其余豚鼠均带橡胶头套遮盖右眼形觉剥夺诱导病理性近视,4wk后行A超检影,右眼屈光度 $<-6.00D$ 者排除出组,并随机分为模型组、中药组,每组15只,双眼行多波长激光532nm造模(激光功率为120~180mW,直径50 $\mu$ m,曝光时间为0.1s),在视盘下方光凝两排,每排5个点,共10个光凝斑点,击破Bruch's膜(激光时产生的汽化泡沫示激光点Bruch's膜破裂)。激光后第2d开始中药组予中药1.5mL;模型组予生理盐水1.5mL/d,共给药21d。

**1.2.2 脉络膜铺片** 每组选取5只豚鼠,于耳缘静脉注入FITC 5mg/mL,15min后处死取眼球,行脉络膜铺片,荧光倒置显微镜下观察CNV并拍照。Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测量脉络膜铺片CNV面积。

**1.2.3 冰冻切片** 于激光造模完成后第21d处死剩余豚鼠,取双眼眼球,蔗糖-OCT液包埋,垂直于视轴方向切片,至激光斑处开始收片,切片厚度为8 $\mu$ m。

**1.2.4 HE染色观察激光斑处视网膜脉络膜病理改变** 每组右眼各选取一张视网膜及脉络膜结构连续且有激光

斑的切片,苏木素-伊红染色,光学显微镜下观察激光斑处视网膜脉络膜病理改变并拍照。

**1.2.5 免疫组织化学检测 VEGF 表达** 每组各眼球分别选取5张视网膜及脉络膜结构连续且有激光斑的切片,小牛血清封闭30min。分别加入一抗:兔抗人 VEGF 抗体(1:200),二抗:生物素标记的羊抗兔 IgG,辣根酶标记链霉卵白素工作液;AEC 显色(阳性染色为红色或棕色),封片,拍照。用 Image-proplus6.0 专业图像分析软件进行图像分析,计算 VEGF 表达的平均光密度值(average optical density, AOD)。

**1.2.6 免疫荧光检测 VEGF 表达** 每组各眼球各取2张视网膜及脉络膜结构连续且有激光斑的切片,山羊血清封闭1h。加入一抗:兔抗人 VEGF 抗体(1:200),4 $^{\circ}C$ 过夜,二抗:Alexa Fluor 555(1:200)标记的羊抗小鼠 IgG 避光室温放置3h,DAPI核染,抗荧光衰减封片剂封片。

统计学分析:采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 视网膜检影及 A 超** 形觉剥夺4wk后,30只豚鼠屈光度右眼为 $-7.827\pm 2.241D$ ,左眼为 $-1.115\pm 0.369D$ ,两者比较差异有统计学意义( $t=-15.07, P=0.01$ );眼轴长度,右眼为 $9.156\pm 0.11mm$ ,左眼为 $8.42\pm 0.13mm$ ,两者比较差异有统计学意义( $t=9.60, P=0.039$ );右眼诱导高度近视成功,眼轴也明显增长。

**2.2 脉络膜铺片结果** 荧光倒置显微镜下可见,光凝后激光斑周围有簇状新生血管生成,激光斑中心高荧光。模型组右眼 CNV 面积为 $2.81\pm 1.0401dm^2$ ,明显大于左眼( $1.015\pm 0.1295dm^2$ ),差异均具有统计学意义( $t=0.54, P=0.035$ )。中药组右眼激光斑中心及周围荧光较模型组右眼减弱,且 CNV 的面积( $0.606\pm 0.225dm^2$ )明显小于模型组(图1),差异有统计学意义( $t=0.8, P=0.02$ )。

**2.3 HE染色结果** 空白对照组可见视网膜、脉络膜各层结构清晰完整。激光后模型组右眼激光斑处可见 RPE 层和 Bruch 膜明显破坏,内核层和外核层结构紊乱,增生的细胞穿过破损的 Bruch 膜和 RPE 层向视网膜内层生长,RPE 细胞移行增生并包绕新生血管,或可见空泡样结构(图2)。

**2.4 VEGF 表达的免疫组织化学结果** 模型组 VEGF 的表达较空白组强(图3),且模型组高度近视眼与非高度近视眼间 VEGF 表达差异有统计学意义(表1)。中药组右眼 VEGF 的表达( $0.0556\pm 0.0119$ )较模型组( $0.09606\pm 0.0259$ )减少,差异有统计学意义( $t=31.972, P<0.01$ )。

**2.5 VEGF 表达的免疫荧光结果** 红色为 VEGF 阳性信号,细胞核用 DAPI 染为蓝色。模型组可见视网膜及脉络膜明显阳性信号表达,右眼较左眼更明显。中药组右眼可见网膜色素上皮-脉络膜层阳性信号表达,且阳性信号表达较模型组右眼减少(图4)。

## 3 讨论

目前,关于病理性近视 CNV 的发病机制尚不明确,可能与缺氧、炎症等有关<sup>[6-8]</sup>。CNV 的形成是一个多细胞、多因子参与的复杂过程,如巨噬细胞、血管内皮生长因子(vascular endothelium growth factor, VEGF)等;其中 VEGF 在病理性近视 CNV 形成过程中起重要作用<sup>[9]</sup>。VEGF

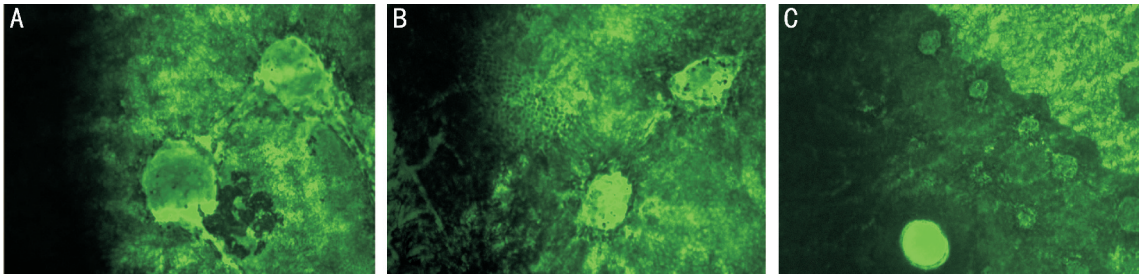


图1 豚鼠激光后21d脉络膜铺片(×400) A:模型组右眼;B:模型组左眼;C:中药组右眼。

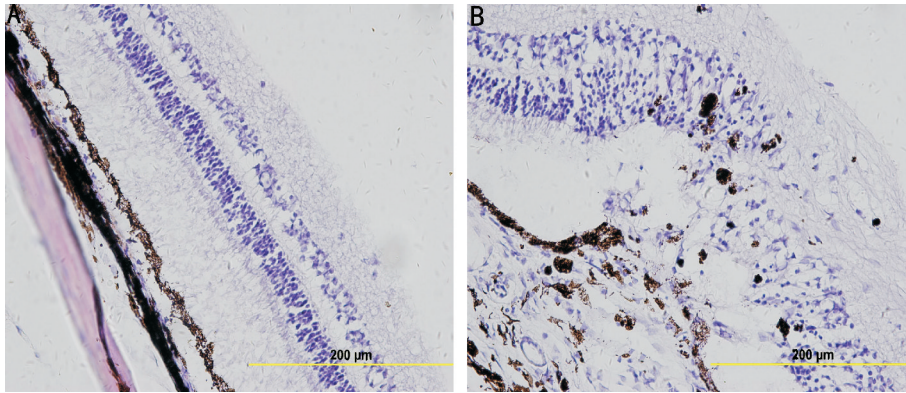


图2 豚鼠右眼21d时HE染色(×400) A:空白对照组右眼;B:模型组右眼。

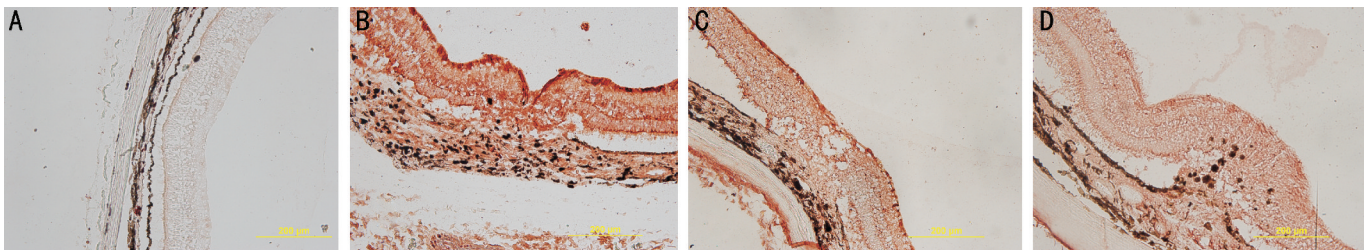


图3 豚鼠21d免疫组织化学结果(×200) A:空白对照组右眼;B:模型组右眼;C:模型组左眼;D:中药组右眼。

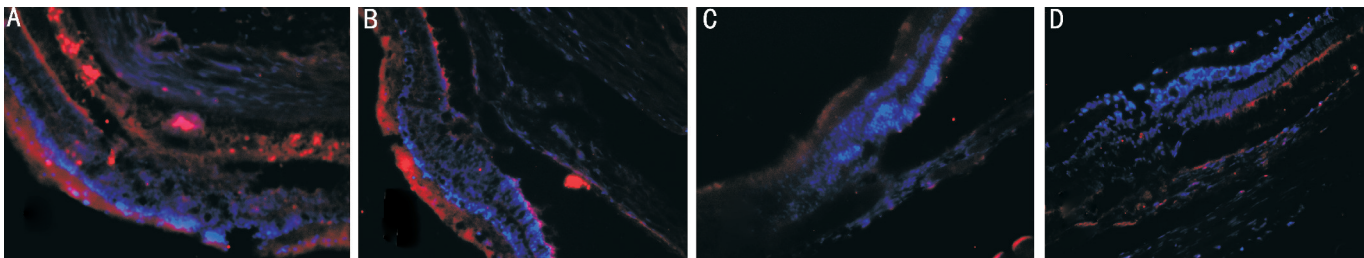


图4 豚鼠21d免疫荧光结果(×200) A:模型组右眼;B:模型组左眼;C:中药组右眼;D:中药组左眼。

表1 空白组与模型组豚鼠视网膜 VEGF 表达的 AOD 值  $\bar{x} \pm s$

分组	右眼	左眼
空白组	0.0335±0.00982 <sup>a</sup>	0.0390±0.00959
模型组	0.09606±0.0259 <sup>b,d</sup>	0.0517±0.00932

注:<sup>a</sup> $P>0.05$  vs 空白组左眼;<sup>b</sup> $P=0.01$  vs 模型组左眼;<sup>d</sup> $P<0.01$  vs 空白组右眼。

家族包括 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E 及胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)<sup>[10]</sup>。VEGF 与其特异性酪氨酸激酶受体,即血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)结合后才能调控血管通透性及内皮细胞的增殖、迁徙,其中 VEGFR-1 和 VEGFR-2 主要参与血管的生成。VEGF-A 通过与 VEGFR-1 和 VEGFR-2 结合,而在血管新生过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。VEGF 可通过促进细胞内皮增生、血

管基底膜和细胞外基质的降解,以及内皮细胞的转移而诱导新生血管的生成。病理性近视眼轴进行性增长,脉络膜视网膜血流减缓,脉络膜血管灌注不良,局部缺血缺氧,是 HIF-1 $\alpha$  通过 VEGF 基因的 HIF-1 结合位点与之结合,诱导 VEGF 转录而上调其表达<sup>[6]</sup>。VEGF 分泌增多,促进了 CNV 的形成。

本实验采用形觉剥夺的方法<sup>[12]</sup>在 4wk 后成功诱导高度近视豚鼠模型,右眼屈光度 $>-6.00D$ ,且眼轴明显增长( $P<0.05$ )。在前期造模基础上,氮激光诱导病理性近视 CNV<sup>[13]</sup>。研究表明,激光造模 21d 后,CNV 保持稳定的纤维血管状态<sup>[4]</sup>,故选取 21d 为观察时间点。脉络膜铺片显示,模型组高度近视眼 CNV 面积及 VEGF 的表达均明显高于非高度近视眼( $P<0.01$ ),这可能是由于病理性近视眼轴增长,后极部进行性扩张将眼球壁拉长,致使脉络膜视网膜血管伸直,血流速度迟缓,血管灌注不良,从而影响

脉络膜及视网膜内外层的血液供应,局部的缺血缺氧促进了HIF-1 $\alpha$ 的产生,上调VEGF的表达,使CNV形成成为可能。

病理性近视CNV属中医“视瞻昏渺”、“瞳神络病”<sup>[14]</sup>等范畴。《灵枢·大惑论》曰:“五脏六腑之精气皆上注于目而为之精”,目中脉络运送五脏六腑之精气上达,使气血津液渗灌目窍,目窍得以濡养才能发挥其视瞻功能。本病多因久视伤血或肝肾亏虚、禀赋不足,气血生化乏源。久则气虚运化失司,津液代谢失常,又久病脾气虚弱,湿浊内生,湿郁日久,煎熬成痰或瘀,痰湿阻络,血不养脉,且久病之人,情志多郁,气机不利,络脉瘀阻,瘀久化火,灼伤脉络,络损而血溢络外,出现视力障碍<sup>[15]</sup>。由于病位深、病程长,病邪易入难出,为本病的治疗带来很大困难。

目前病理性近视CNV的治疗主要为激光光凝(laser coagulation)、经瞳孔温热疗法(transpupillary thermol therapy, TTT)、光动力疗(photodynamic therapy, PDT)、抗VEGF药物治疗及手术治疗等<sup>[9,16,17]</sup>,但远期效果欠佳。中医对高度近视CNV的研究较少,且多为临床的辨证论治,缺乏基础研究。

本方以《中医眼科六经法要》<sup>[18]</sup>中驻景方加减形成固定方剂,既滋肝肾精血,又益气健脾、行气活血通络,补而不滞,在临床中用于治疗病理性近视CNV取得了较好的疗效。我们运用该方,通过建立氮激光诱导的病理性近视CNV动物模型,进一步探讨中药驻景方对病理性近视CNV形成的干预作用。中药驻景方治疗后显示,中药组右眼CNV面积及视网膜VEGF的表达均较模型组减少( $P<0.01$ );说明中药驻景方可以减少VEGF的表达,抑制CNV的生成。这可能是中药驻景方通过滋补肝肾、活血通络的功效增加眼部血液循环,改善局部缺血缺氧状况,从而抑制病理性近视CNV中VEGF的表达,达到抑制CNV的形成的作用。

综上所述,中药驻景方可以通过抑制病理性近视CNV视网膜及脉络膜VEGF的表达而减少CNV的生成。这为以后进一步探讨驻景方对病理性近视CNV形成的干预机制提供了研究基础,也为中药治疗病理性近视CNV开拓了新的方向。

#### 参考文献

1 葛坚. 眼科学. 北京:人民卫生出版社 2005:136

2 Cotter SA, Varma R, Ying-Lai M, et al. Causes of low vision and blindness in adult Latinos. *Ophthalmology* 2006;113(9):1574-1582

3 Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2006;82(1):99-110

4 王雨生. 脉络膜新生血管性疾病. 北京:人民卫生出版社 2007:26

5 Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(6):1367-1374

6 李丽华. 诱导缺氧诱导因子1表达的相关因素. 医学研究通讯 2009;2:15-18

7 Wang Q, Gao Y, Wang PF, et al. Replication study of significant single nucleotide polymorphisms associated with myopia from two genome-wide association studies. *Molecular Vision* 2011;17:3290-3299

8 Vitale S, Sperduto RD, Ferris FL. Increased prevalence of myopia in the United States between 1971-1972 and 1999-2004. *Arch Ophthalmol* 2009;127(12):1632-1639

9 akaguchi H, Ikuno Y, Gomi F, et al. Intravitreal injection of bevacizumab for choroidal neovascularisation associated with pathological myopia. *Br J Ophthalmol* 2007;91(2):161-165

10 Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(6):1367-1374

11 Kondo K, Kaneko T, Baba M, et al. VEGF-C and VEGF-A synergistically enhance lymph node metastasis of gastric cancer. *Biol Pharm Bull* 2007;30:633-637

12 王江辉. 多波长激光诱导的形觉剥夺性高度近视豚鼠脉络膜新生血管模型建立的研究. 青海大学 2012

13 Wang JH, Jiang W, Kang ZF, et al. Study of Krypton Laser-Induced Choroidal Neovascularization in a Guinea Pig Model of High Anisometropia. *Eye Science* 2012;27:76-81

14 亢泽峰. 瞳神络病病机及其证治探析. 北京中医药大学学报 2003;4:77-79

15 郑燕林, 王万杰. 浅谈中医对眼底新生血管的认识. 中国中医眼科杂志 2011;21(1):38-39

16 RuizMoreno JM, Montero JA. Long-term visual acuity after argon green laser photocoagulation of juxtafoveal choroid in neovascularization in highly myopic eyes. *Eur J Ophthalmol* 2002;12(2):117-122

17 王江辉, 亢泽峰. 病理性近视眼脉络膜新生血管治疗的研究进展. 国际眼科纵览 2012;34:338-342

18 陈达夫. 中医眼科六经法要. 成都:四川人民出版社 1978:62