

银杏叶提取物对激光诱导的大鼠脉络膜新生血管的疗效

王玲^{1,3}, 陈超², 刘筠², 毕宏生³

基金项目: 济宁市中医药科技计划项目 (No. LC2012013); 山东省高等学校青年骨干教师国内访问学者项目经费资助

作者单位:¹(272000) 中国山东省济宁市, 济宁医学院临床学院;²(272000) 中国山东省济宁市第一人民医院眼科;

³(251000) 中国山东省济南市, 山东中医药大学眼科研究所

作者简介: 王玲, 在读博士研究生, 研究方向: 白内障及屈光。

通讯作者: 王玲. valley08@126.com

收稿日期: 2013-07-02 修回日期: 2013-10-15

Effects of ginkgo biloba extract on laser-induced choroidal neovascularization in rats

Ling Wang^{1,3}, Chao Chen², Jun Liu², Hong-Sheng Bi³

Foundation items: Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project of Jining, China (No. LC2012013); Young Core Instructor and Domestic Visitor Foundation of High School of Shandong Province, China

¹Clinical College, Jining Medical University, Jining 272000, Shandong Province, China; ²Department of Ophthalmology, Jining No. 1 People's Hospital, Jining 272000, Shandong Province, China; ³Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 251000, Shandong Province, China

Correspondence to: Ling Wang. Clinical College, Jining Medical University, Jining 272000, Shandong Province, China. valley08@126.com
Received: 2013-07-02 Accepted: 2013-10-15

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of ginkgo biloba extract (EGb 761) on laser-induced choroidal neovascularization (CNV) in rats.

• **METHODS:** Totally 60 BN rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, model group, experimental group, physiological saline group with 15 in each group. All CNV models were made by krypton laser. Rats in experimental group were intraperitoneally injected with 0.35% EGb761 (100mg/kg) every day after laser exposure until they were sacrificed. Rats in physiological saline group were intraperitoneally injected physiological saline every day after laser exposure until they were sacrificed. Fundus fluorescein angiography (FFA) was performed on every rat on the 7th day, 14th day and the 21st day after laser exposure, then the rats were sacrificed immediately. The eyes were enucleated and processed for histopathologic examination.

• **RESULTS:** There was no choroidal fluorescein leakage staining in normal rats. There were obviously less choroidal fluorescein leakage points in experimental

groups than that in the corresponding model groups ($P < 0.05$), the difference had statistical significance. The structures of the retina and choroid were preserved better in experimental group than that in the model group.

• **CONCLUSION:** EGb761 len inhibit the formation of laser-induced CNV in rats. The longer the time, the better curative effect.

• **KEYWORDS:** ginkgo biloba extract; choroidal neovascularization; effect

Citation: Wang L, Chen C, Liu J, *et al.* Effects of ginkgo biloba extract on laser-induced choroidal neovascularization in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(11):2179-2181

摘要

目的: 观察银杏叶提取物对激光诱导的大鼠脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 的疗效。

方法: 选取 60 只大鼠, 随机分为 4 组, 分别为正常组、模型组、实验组、生理盐水组, 每组 15 只大鼠。除正常组外其余各组均行氩激光光凝制作 CNV 模型, 模型组不做任何处理, 实验组均在光凝后每日行腹腔注射银杏叶提取物 (Extract of Ginkgo Biloba, EGb761), 生理盐水组在光凝后每日腹腔注射生理盐水。于光凝后 7, 14, 21d 后对各组大鼠行眼底造影检查, 观察 CNV 的渗漏情况, 然后立即处死各组动物, 行脉络膜视网膜切片, HE 染色后观察各组视网膜及脉络膜的结构和 CNV 的情况。

结果: 荧光造影结果显示正常大鼠脉络膜无渗漏, 7d 时各组大鼠脉络膜渗漏均较轻微, 14, 21d 时模型组和生理盐水组大鼠脉络膜渗漏明显, 实验组大鼠脉络膜荧光素渗漏点数明显要少于对应的模型组和生理盐水组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组大鼠的视网膜、脉络膜结构保存比模型组更好。

结论: 腹腔注射 EGb761 可以明显减少大鼠 CNV 的形成, 用药时间越长, 疗效越好。

关键词: 银杏叶提取物; 脉络膜新生血管; 疗效

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.11.04

引用: 王玲, 陈超, 刘筠, 等. 银杏叶提取物对激光诱导的大鼠脉络膜新生血管的疗效. 国际眼科杂志 2013;13(11):2179-2181

0 引言

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 引起的渗出、出血和机化等一系列改变是导致年龄相关性黄斑变性等多种眼底疾病视力丧失的主要原因。目前已有的 CNV 临床治疗方法主要有激光、光动力疗法、手术、放射治疗等, 但均存在疗效不佳和复发率高的缺点。Rosenfeld 等^[1] 研究发现玻璃体腔内注射 VEGF 抗体治疗新生血管性疾病可导致视网膜地图样萎缩, 视力降低。

加之 VEGF 抗体价格昂贵,很难普及。所以寻找一种有效且价格低廉的药物是目前 CNV 疾病治疗面临的主要问题。

银杏叶提取物(Extract of Ginkgo Biloba, EGB761)是采用现代提取技术从银杏叶中提取的活性物质,有效成分主要有 2 种,即黄酮苷和萜类内酯。研究发现在大鼠的早产儿视网膜病变模型中,EGB761 可以抑制视网膜新生血管的生成^[2,3]。也有研究证明 EGB761 可以改善视网膜、脉络膜的血流。但是关于 EGB761 对 CNV 的疗效却未见报道,因此我们通过建立大鼠 CNV 模型并给与 EGB761 治疗,观察其对大鼠 CNV 是否有抑制作用,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:60 只雄性 BN 大鼠,体质量约 220g(济宁医学院实验动物研究所提供)。所有动物均在济宁医学院动物中心饲养,自由进食饲料和水,动物房温度控制在 26℃左右,湿度 50%~60%,自然光照节律。

1.2 方法 动物分组及模型制作:随机分为正常对照组、模型组、实验组、生理盐水组,各组 15 只大鼠,均取右眼为实验眼。正常对照组不给予任何处理。其余三组参照赵世红等^[4]的方法建立 CNV 模型:将 BN 大鼠麻醉(30g/L 戊巴比妥腹腔注射,40mg/kg),5g/L 托品酰胺滴眼液充分散瞳后,紧贴角膜中央放置-53.00D 角膜接触镜,通过裂隙灯显微镜将光斑聚焦于视网膜上,避开大血管,围绕视乳头周围进行视网膜光凝;每眼击射约 8 点,以光凝后有气泡产生为度,相当于 Noyori 分级法的第Ⅲ级,光凝斑部位的视网膜呈白色,光凝后拍摄眼底照相(氩激光波长 647nm,功率 360mW,直径 50μm,曝光时间 0.05s)。模型组:仅给予激光制作模型;实验组:造模后即开始每日腹腔注射 3.5g/L EGB761,剂量为 100mg/kg,直至被处死。生理盐水组:造模后即开始每日腹腔注射生理盐水,剂量为 100mg/kg,直至被处死。造模后第 7,14,21d 分别取各组 5 只大鼠行眼底造影检查,观察 CNV 情况,方法如下:将 BN 大鼠麻醉散瞳,100g/L 荧光素钠(0.5mL/kg)腹腔注射后,立即开始摄影,持续约 30min,记录荧光素渗漏情况。以动脉期即开始显影,迅速扩大成强荧光斑,直至造影晚期仍持续不退,且与视网膜血管无关为荧光素渗漏判断标准。在静脉期,参照 Takebana 的方法将荧光素渗漏程度分为无渗漏(0 级)、轻度渗漏(1 级)、中度渗漏(2 级)和重度渗漏(3 级)四个级别,由两位有经验的眼底病医生通过双盲法对荧光素渗漏程度进行分级,计算其荧光素渗漏率(渗漏激光斑数量/总的激光斑数量)。每组 FFA 检查后用 30g/L 戊巴比妥过量腹腔注射,分别处死;将眼球角膜 12:00 位做标记,摘除眼球,立即置入 40g/L 多聚甲醛磷酸盐缓冲液中室温过夜,常规脱水、石蜡包埋,矢状位平行视神经连续切片,片厚 6μm,HE 染色后光镜观察视网膜脉络膜结构及新生血管的改变。

统计学分析:SPSS 13.0 统计软件进行分析,采用成组设计多个样本比较秩和检验和多个样本两两比较的秩和检验;以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义。

2 结果

2.1 眼底造影结果 正常大鼠眼底视网膜血管呈放射状,脉络膜血管充盈为背景荧光荧光素无渗漏。模型组及生理盐水组大鼠:光凝后 7d,光凝区早期可见轻度荧光素渗漏,光凝后 14d 时光凝部位在动脉早期出现强荧光,造影晚期荧光渗漏、扩大、增强。光凝后 21d 时可见光

表 1 光凝 14d 后各组不同级别荧光素渗漏的光凝斑数目 个

分组	0 级	1 级	2 级	3 级
模型组	12	11	9	8
实验组	20	10	6	4
生理盐水组	11	10	12	7

表 2 光凝后 21d 的各组不同级别荧光素渗漏的光凝斑数目 个

分组	0 级	1 级	2 级	3 级
模型组	8	6	12	14
实验组	26	6	5	3
生理盐水组	9	6	14	11

凝部位早期也出现强荧光,晚期荧光素渗漏,渗漏强度较光凝后 14d 时要强。实验组大鼠:光凝后 7d 时光凝部位可见较轻的脉络膜荧光素渗漏,光凝后 14d 时光凝处可见荧光素渗漏,光凝后 21d 时光凝处荧光素渗漏未连接成片,渗漏强度较光凝后 14d 组明显减小。

2.2 FFA 检查各组荧光素渗漏率 考虑光凝后 7d 光凝区的渗漏强度较弱,未计算光凝后 7d 的荧光素渗漏率。光凝后 14,21d 的 6 组共 240 个激光斑由两位共同医师进行观察分级,只有 4 个点的荧光素渗漏程度的分级不同,且差别不超过一个级别,均定为较高级别。在第 14d 时,各组的渗漏率分别为:模型组 70%,实验组 50%,生理盐水组 72.5%,模型组与实验组比较均有显著性差异($P < 0.05$,表 1)。光凝后第 21d,各组的渗漏率分别为:模型组 80%,实验组 35%,生理盐水组 77.5%,模型组实验组相比有显著性差异($P < 0.05$,表 2),模型组与生理盐水组相比均无显著性差异。各组眼底照相见图 1。

2.3 组织病理学检查结果 正常 BN 大鼠的视网膜及脉络膜各层组织结构清晰、完整。模型组及生理盐水组光凝后 7d 可见光凝区视网膜全层水肿,细胞排列紊乱可见大量成纤维细胞和少量 CNV 形成,光凝后 14d 视网膜结构破坏,CNV 突破 Bruch 膜呈芽状伸向视网膜下,大量成纤维细胞增生,色素上皮细胞增生、移行,外核层破坏,内核层排列紊乱,光凝后 21d 可见 CNV 增殖加重,厚度增加,大量新生血管出现,可见 RPE 细胞迁移包绕新生血管(图 2A 箭头所指处)。而实验组的大鼠视网膜及脉络膜光凝后 14d 时可见轻度 CNV 增殖(图 2B 箭头所指处),视网膜结构保持较其余组清晰,CNV 的增殖较低。随治疗时间延长,实验组 21d 时可见视网膜结构保存较好,细胞排列规整,少量的纤维细胞增生,CNV 增殖逐渐减轻(图 2C 箭头所指处)。

3 讨论

CNV 模型制作方法很多,本实验采用目前应用范围较广的氩激光光凝 BN 大鼠视网膜制作 CNV 模型,这种方法成模率高,CNV 形成确定,是目前应用范围最广的方法。实验中采用 FFA 检查确诊 CNV 的形成,与既往研究结果^[4]类似,本实验发现大鼠的 CNV 在激光光凝后 7d 出现,14d 时 CNV 形成明显增加,21d 时达到顶峰,为了更好的观察 EGB761 的疗效,我们药物治疗时间持续到光凝后 21d。

CNV 的形成原因复杂,确切机制尚不明确。在手术标本中,视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)是 CNV 的主要成分,它可以产生 VEGF、FGF 及 TGF

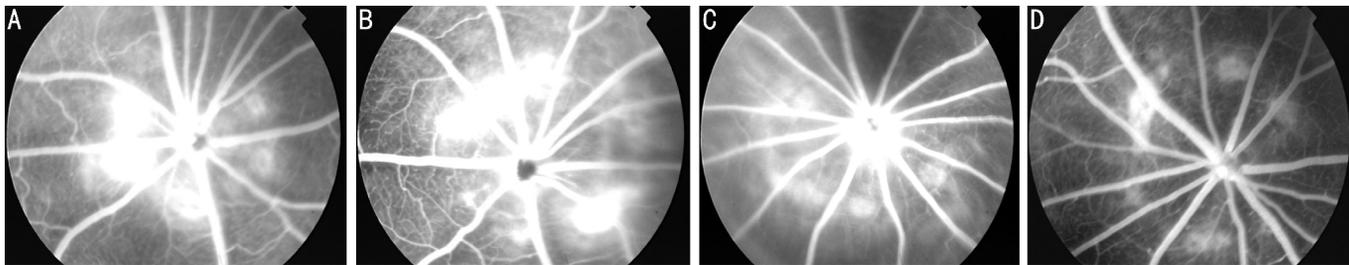


图1 FFA检查 A:模型组 14d;B:模型组 21d; C:实验组 14d; D:实验组 21d。

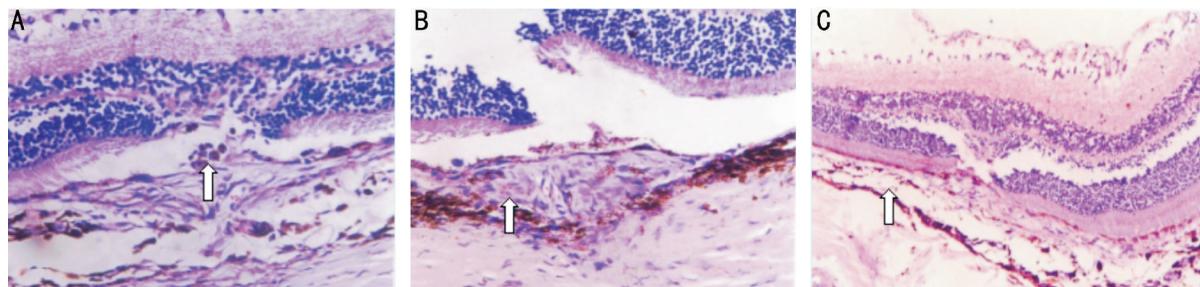


图2 组织病理学检查结果(HE×400) A:模型组 21d; B:实验组 14d; C:实验组 21d。

等生长因子。血管内皮细胞在病理情况下,血管内皮细胞(EC)被活化,表现为分裂、增生和移行,同时表达 FGF, TGF 和 VEGF,并移行突破 Bruch 膜,靠近 RPE 或与之接触或突破 RPE 层,通过紧密连接或缝隙连接形成有极性的单层细胞,最终发展成为 CNV,体外 EC 和 RPEC 共培养实验证实,EC 具有促使 RPEC 释放脉络膜毛细血管管腔形成所必需的细胞因子的作用。

EGB761 是采用现代提取技术从银杏叶中提取的活性物质,有效成分主要有 2 种,即黄酮苷和萜类内酯。EGB761 在预防大鼠的脑缺血-再灌注损伤^[5]、人肝脏微粒体的脂质过氧化^[6]方面有着强大的清除自由基活性的作用。多项研究表明,EGB761 具有改善血液流变学状况、抑制血小板聚集、抗氧化、清除自由基、缓解缺血缺氧及舒张血管平滑肌等有益作用^[7-9]。以往的研究结果也证明,EGB761 口服后能通过血-眼屏障到达视网膜发挥作用^[10]。因为目前针对动物的研究中大多采用腹腔注射给予 EGB761,本实验中也采取了腹腔注射给药的方式。关于给药剂量也采用了目前研究中最经常采用的 100mg/kg 剂量。我们在实验中发现在给与 EGB761 14d 后大鼠的 CNV 明显减少。且 EGB761 腹腔注射应用时间越长,CNV 越少。说明 EGB761 可以减少 CNV 的形成,更好的保护视网膜及脉络膜的结构。我们考虑这可能是由于其内酯成分对微循环的扩张作用有关,微循环的扩张减轻视网膜、脉络膜的缺血缺氧状态,从而减少了 CNV 的产生。

以往研究表明 EGB761 可以减少脑缺血大鼠脑片内新生血管的生成,降低 VEGF 的表达^[11],同时也有研究证明在大鼠的早产儿视网膜病变模型中,EGB761 可以抑制视网膜新生血管的生成,主要通过抑制 VEGF、PDGF 和 TGF β 2 来发挥作用^[3]。我们推测在本实验中 EGB761 对 CNV 的抑制作用也可能与其对 VEGF、TGF 的抑制有关,当然其对 CNV 的抑制作用机制有待于进一步的研究。但这可能为临床治疗 CNV 性疾病提供了新的治疗方法。

参考文献

- Rosenfeld PJ, Shapiro H, Tuomi L, *et al.* Characteristics of patients losing vision after 2 years of monthly dosing in the phase III ranibizumab clinical trials. *Ophthalmology* 2011;118(3):523-530
- 方玉兰,唐兰芬,阮豫才,等.银杏叶提取物对氧诱导视网膜病新生鼠视网膜血管形态和密度的影响. *中国新生儿杂志* 2012;27(6):418-421
- Juarez CP, Muino JC, Guglielmo H, *et al.* Experimental retinopathy of prematurity; angiostatic inhibition by nimodipine, ginkgo-biloba, and dipyrindamole, and response to different growth factors. *Eur J Ophthalmol* 2000;10(1):51-59
- 赵世红,何守志.氮激光诱导的大鼠 CNV 模型研究. *中华眼科杂志* 2003;39(5):298-302
- Erbil G, Ozbal S, Sonmez U, *et al.* Neuron protective effects of selenium and ginkgo biloba extract (EGB761) against ischemia and reperfusion injury in rat brain. *Neurosciences* 2008;13(3):233-238
- Boveris AD, Galleano M, Puntarulo S. *In vivo* supplementation with Ginkgo biloba protects membranes against lipid peroxidation. *Phytother Res* 2007;21(8):735-740
- Chang HS, Harris A, Kristinsson JK, *et al.* Ginkgo biloba extract increased ocular blood flow velocity. *J Ocul Pharmacol* 1999;15(3):233-240
- Jiang X, Nie B, Fu S, *et al.* EGB761 protects hydroperoxide-induced death of spinal cord neurons through inhibition of intracellular ROS production and modulation of apoptotic regulating genes. *J Mol Neurosci* 2009;38(2):103-113
- 解正高,宫媛媛,宋毅,等.银杏叶提取物对大鼠视网膜光损伤后感光细胞的保护作用. *中华眼底病杂志* 2007;23(5):318-321
- Chida MT, Yasuhara H, Koide R, *et al.* *In vitro* testing of antioxidants and biochemical endpoint in bovine retinal tissue. *Ophthalmic Res* 1999;31(6):407-415
- 梅松柳,高俊霞,杨立杰.银杏叶提取物对局灶性脑缺血大鼠脑片 HIF-1 VEGF 表达及新生血管的影响. *中国急救医学* 2009;29(8):724-726