

双丹明目胶囊对 DR 大鼠视网膜血管形态学及 VEGF 表达的影响

秦裕辉,李文娟,张熙,戴宗顺,陈晓柳,周亚莎,凌艳君,郑兵

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81473737);湖南省教育厅科研基金重点项目(No. 13A072)

作者单位:(410006)中国湖南省长沙市,湖南省中医药研究院
作者简介:秦裕辉,毕业于湖南中医药大学,硕士,研究员,博士研究生导师,研究方向:眼底病的中医药防治研究。

通讯作者:秦裕辉. dlqyh@sohu.com

收稿日期:2014-08-06 修回日期:2014-12-22

Effects of Shuangdanmingmu capsule on retinal vascular morphology and VEGF expression in rats with diabetic retinopathy

Yu-Hui Qin, Wen-Juan Li, Xi Zhang, Zong-Shun Dai, Xiao-Liu Chen, Ya-Sha Zhou, Yan-Jun Ling, Bing Zheng

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81473737); Key Project Research Foundation of Hunan Educational Committee (No. 13A072)

Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan Province, China

Correspondence to: Yu-Hui Qin. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan Province, China. dlqyh@sohu.com

Received:2014-08-06 Accepted:2014-12-22

Abstract

• AIM: To observe the effects of Shuangdanmingmu capsule on VEGF expression and retinal vascular morphology in rats with diabetic retinopathy (DR).

• METHODS: DR rats were fed with Shuangdanmingmu capsule. By comparing with the normal group, the model control group, and positive control group, the effect of Shuangdanmingmu capsule on retinal tissue of DR rats was observed under electron microscopy. After HE staining, retinal structure was observed under the light microscope. Immunohistochemical staining was used to detect the VEGF expression in retina.

• RESULTS: Two months after treatment, the layers tissue of retina presented mild edema, capillary pericytes performed edema, mitochondria showed mild swelling and less clear structure, some endothelial cells showed slight proliferation in Shuangdanmingmu group. Compared with the normal group, the expression level of VEGF in retina increased in the other groups, especially in model control group. A significant differential in expression of VEGF was found between Shuangdanmingmu group, positive control group and model control group ($P < 0.01$).

• CONCLUSION: Shuangdanmingmu capsule can effectively improve the retinal microvascular, reduce edema and necrosis of each layer of retina, improve the ultrastructure of retina's tissue and inhibit VEGF expression in DR rats.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; Shuangdanmingmu capsule; retina; VEGF

Citation: Qin YH, Li WJ, Zhang X, et al. Effects of Shuangdanmingmu capsule on retinal vascular morphology and VEGF expression in rats with diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(1):30-33

摘要

目的:观察糖尿病视网膜病变大鼠模型视网膜血管的病理变化及 VEGF 表达变化,初步评价双丹明目胶囊抑制视网膜血管新生效应。

方法:将双丹明目胶囊作用于糖尿病视网膜病变大鼠,通过与正常组、模型对照组、阳性对照组的比较,电镜下观察双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜组织的影响,HE 染色后光镜下观察视网膜结构,并采用免疫组织化学法检测大鼠视网膜中 VEGF 的表达。

结果:经双丹明目胶囊治疗 2mo 后,双丹明目组大鼠视网膜组织轻度水肿,毛细血管周细胞水肿,线粒体轻度肿胀,结构稍欠清晰,部分内皮细胞轻度增生。除正常组外各组视网膜 VEGF 表达增加,以模型对照组最为明显,且双丹明目组和阳性对照组与模型对照组 VEGF 的表达有明显差异($P < 0.01$)。

结论:双丹明目胶囊能有效地改善糖尿病大鼠视网膜微血管改变,减轻视网膜各层结构水肿、坏死情况,改善超微结构改变,可以抑制 DR 大鼠视网膜 VEGF 表达。

关键词:糖尿病视网膜病变;双丹明目胶囊;视网膜;VEGF
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.1.07

引用:秦裕辉,李文娟,张熙,等.双丹明目胶囊对 DR 大鼠视网膜血管形态学及 VEGF 表达的影响. *国际眼科杂志* 2015;15(1):30-33

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的微血管并发症和成年人后天性失明的主要原因^[1]。目前认为糖尿病患者存在明显的血管内皮细胞结构和功能损伤,并认为其可能是微血管病变发生、发展的主要原因^[2]。本文以血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)为中心,阐明双丹明目胶囊的分子机制,从中医“肾虚血瘀”的角度,探讨双丹明目

胶囊对于 DR 模型大鼠视网膜血管新生和 VEGF 通路的干预作用,目的在于为 DR 的中医药防治研究寻找新的切入点。

1 材料和方法

1.1 材料 取健康,无眼部疾患,一月龄 SD 大鼠 40 只(北京维通利华实验动物有限公司提供,SPF 级,远交系),体质量 0.25kg 左右。采用随机数字法分为 A、B、C、D 4 组,每组 10 只。分别为:A 组:正常组;B 组:模型对照组;C 组:双丹明目组;D 组:阳性对照组。除 A 组外的 30 只大鼠进行造模,造模前大鼠禁食 10h,自由饮水。链脲佐菌素(Streptozocin,STZ)50mg/kg 的剂量一次性大鼠尾静脉注射。A 组鼠尾静脉注射等量生理盐水。72h 后取尾静脉血,强生血糖测试仪测血糖;尿糖试纸定性测尿糖。空腹血糖浓度 >16.7 mmol/L、尿糖在+++以上者,即为糖尿病大鼠。成模后观察 1wk,稳定者为造模成功。然后开始计算病程。双丹明目胶囊:由湖南省中医药研究院药剂科提供,批号:国药准字 Z20080062。羟苯磺酸钙(Calcium dobesilate):宁夏康亚药业有限公司,250mg/粒,批号:国药准字 H20030809。重组人血管内皮抑制素注射液:烟台麦得津生物工程股份有限公司,15mg/3mL/支,批号:国药准字 S20050088。

1.2 方法

1.2.1 给药方法 各组动物自造模后 1wk 后开始连续灌胃用药 8wk。A、B 组用生理盐水(10mL/kg,每日一次)灌胃;C 组使用双丹明目胶囊溶液灌胃,剂量 12.5mL/kg;D 组用羟苯磺酸钙溶液灌胃+重组人血管内皮抑制素玻璃体内注射^[2],羟苯磺酸钙:1 次/d,重组人血管内皮抑制素注射液:5g/L,造模后第 10d 开始玻璃体注射,每 10d 1 次;各组大鼠均不限饮食,每日更换垫料 1 次,按时通风,保持环境安静。

1.2.2 取材及指标测定

1.2.2.1 电镜观察各组大鼠视网膜超微结构变化 2%戊巴比妥钠过量麻醉后断头法处死动物,即刻摘除眼球以 10%福尔马林固定 24h,去除眼前节,分离出视网膜组织,流水冲洗 8h,经梯度酒精脱水后,行浸蜡、包埋、切片(厚度 4 μ m)。部分标本(材料小于 1mm³)经 2.5%戊二醛前固定,清洗,1%饿酸 4 $^{\circ}$ C 下后固定 3h,梯级乙醇脱水,Epon812 环氧树脂与丙酮溶液浸透 30min,Epon812 环氧树脂包埋,半薄切片光镜观察定位后做超薄切片,经柠檬酸铅和醋酸铀双重染色后于 JSM-1200 透射电镜观察。

1.2.2.2 HE 染色后观察视网膜形态学变化 将石蜡切片常规脱蜡浸入苏木素染液中,染色 5~10min,自来水浸洗;浸入稀盐酸酒精溶液中,进行分色 3~5s,自来水浸洗;浸入淡氨水中,使细胞核蓝化 3~5min,自来水浸洗;浸入伊红染液中,染色 5~10min,自来水浸洗;经 70%、80%、90%酒精各一次,95%酒精 2 次和 100%酒精 3 次逐级脱水,每次 1min;通过二甲苯溶液 3 次,每次 1min;中性树胶封固。

1.2.2.3 免疫组织化学检测 将石蜡切片捞于预先用 APES 处理过的载玻片上,60 $^{\circ}$ C 温箱烤片过夜;二甲苯脱蜡,复水至水;蒸馏水洗 1 次,PBS 浸泡 5min;擦片,滴加 0.3% H₂O₂,室温 10min 以灭活内源性酶,蒸馏水洗 2min \times 3 次;擦片,滴加复合消化液,室温 10min,PBS 泡 2min,蒸馏水洗 2min;擦片,滴加正常山羊血清(1:10 稀释),室温 10min 以封闭非特异抗原,甩去多余液体,不洗;

分别滴加兔抗人 VEGF 蛋白抗体(1:50 稀释),37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育,结合抗原 2.5h,PBS 洗 2min \times 3 次;擦片,滴加 PV6001,37 $^{\circ}$ C 30min,PBS 洗 5min \times 3 次;DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒。取 1mL 蒸馏水,加试剂盒中的 A、B、C 液各一滴,混匀后加至切片。室温显色,显微镜下控制显色反应时间,显色 3~5min 左右。蒸馏水洗涤终止显色反应,以洗去非特异性染色;苏木素轻度复染(约 10s),酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.2.4 结果判定 双目光学显微镜下观察视网膜血管内皮细胞 VEGF 阳性表达为细胞浆棕黄色染色。应用图像分析系统对结果进行分析,随机选取 5 个高倍视野,Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测量 VEGF 平均光密度(AOD)。

统计学分析:所有实验数据采用 SPSS 16.0 系统软件处理。计量资料实验数据以均数 \pm 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 法及 Dunnett 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 视网膜超微结构结果 给药 2wk 后,正常组大鼠视网膜内皮细胞形态正常,呈梭形,细胞间有较好的链接装置,视网膜毛细血管腔壁完整,基底膜连续、未见增厚。模型对照组大鼠视网膜毛细血管内皮细胞明显肿胀,胞体变圆,突向管腔,线粒体肿胀,空泡化,基底膜增厚,部分增厚较明显。双丹明目组大鼠视网膜毛细血管腔壁尚较光整,基底膜稍增厚,少数毛细血管周细胞水肿,线粒体轻度肿胀,结构稍欠清,部分内皮细胞轻度增生。阳性对照组整个组织结构较好,大鼠视网膜毛细血管病变较轻,毛细血管腔壁较光整,基底膜未见明显增厚,仅少数周细胞出现水肿,线粒体轻度肿胀,结构稍欠清(图 1~4)。

2.2 视网膜形态学变化 造模后第 8wk 视网膜组织病理切片 HE 染色后,在光镜 200 倍视野下观察视网膜结构。A 组视网膜各细胞层排列整齐,外核层、外丛状层、内核层、内丛状层各细胞无水肿、肿胀,神经纤维排列整齐。毛细血管管腔无闭塞,内皮细胞、周细胞完整无水肿。神经节细胞无肿胀溶解(图 5)。B 组视网膜各层组织均出现程度不等细胞内、细胞间水肿等现象。光感受器细胞层细胞结构较紊乱。外核层、外丛状层、内核层、内丛状层出现细胞内、细胞间水肿。部分毛细血管管腔闭塞,周细胞水肿。节细胞出现肿胀、胞浆脱失、溶解现象,节细胞数量有所减少(图 6)。C 组和 D 组病变较模型对照组轻。光感受器细胞层排列基本整齐,各层组织细胞内、细胞外水肿现象较模型对照组轻,毛细血管管腔无闭塞,周细胞轻度水肿。部分节细胞出现肿胀溶解现象(图 7,8)。

2.3 VEGF 免疫组织化学染色 造模后第 8wk 视网膜组织病理切片免疫组化染色后,在光镜 200 倍视野下观察 VEGF 的表达。A 组视网膜 VEGF 表达正常(图 9),B 组视网膜 VEGF 表达显著增高(图 10),C 组、D 组 VEGF 表达比均 A 组增多,均较 B 组少(图 11,12)。应用图像分析系统对结果进行分析,各组 VEGF 平均光密度分别为:A 组 0.289 \pm 0.0150,B 组 0.426 \pm 0.0174,C 组 0.351 \pm 0.0129,D 组 0.396 \pm 0.0124。各治疗组 VEGF 的表达较 A 组均有不同

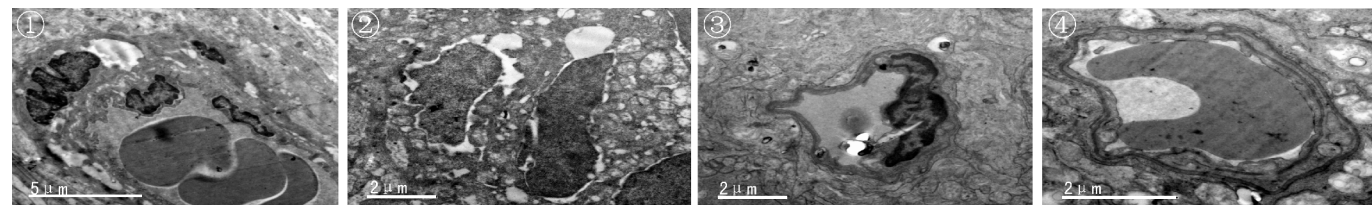


图1 A组大鼠视网膜内皮细胞形态正常,呈梭形,细胞间有较好的链接装置,视网膜毛细血管腔壁完整,基底膜连续、未见增厚。
 图2 B组大鼠视网膜毛细血管病变明显:基底膜增厚,内皮细胞增生,有微绒毛样突起,并向管腔突出,管腔狭窄,周细胞水肿。
 图3 C组大鼠视网膜组织轻度水肿,毛细血管周细胞水肿,线粒体轻度肿胀,结构稍欠清晰,部分内皮细胞轻度增生。
 图4 D组大鼠视网膜组织结构较完整,视网膜毛细血管基底膜稍增厚,可见周细胞轻度水肿,线粒体轻度肿胀,血管内皮细胞未见明显改变。

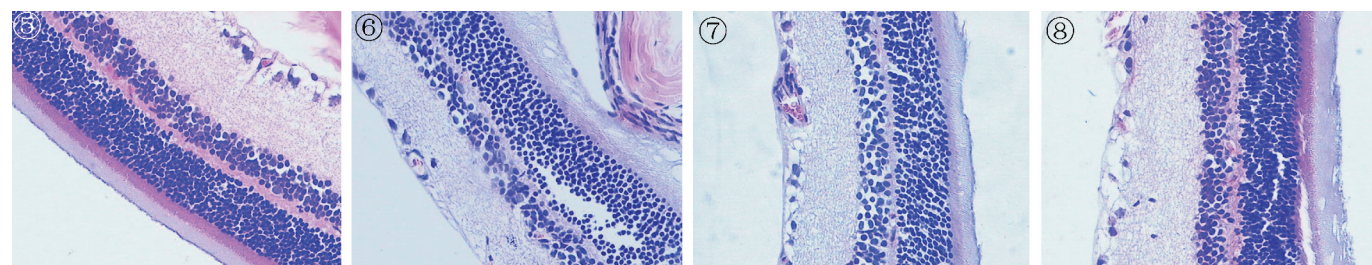


图5 A组视网膜各细胞层排列整齐,外核层、外丛状层、内核层、内丛状层各细胞无水肿、肿胀,神经纤维排列整齐。毛细血管管腔无闭塞,内皮细胞、周细胞完整无水肿。神经节细胞无肿胀溶解(HE×200)。
 图6 B组视网膜各层组织均出现程度不等细胞内、细胞间水肿等现象。光感受器细胞层细胞结构较紊乱。外核层、外丛状层、内核层、内丛状层出现细胞内、细胞间水肿。部分毛细血管管腔闭塞,周细胞水肿。节细胞出现肿胀、胞浆脱失、溶解现象,节细胞数量有所减少(HE×200)。
 图7 C组病变较模型对照组轻,光感受器细胞层排列基本整齐,各层组织细胞内、细胞外水肿现象较模型对照组轻,毛细血管管腔无闭塞,周细胞轻度水肿。部分节细胞出现肿胀溶解现象(HE×200)。
 图8 D组病变较模型对照组轻,光感受器细胞层排列基本整齐,各层组织细胞内、细胞外水肿现象较模型对照组轻,毛细血管管腔无闭塞,周细胞轻度水肿。部分节细胞出现肿胀溶解现象(HE×200)。

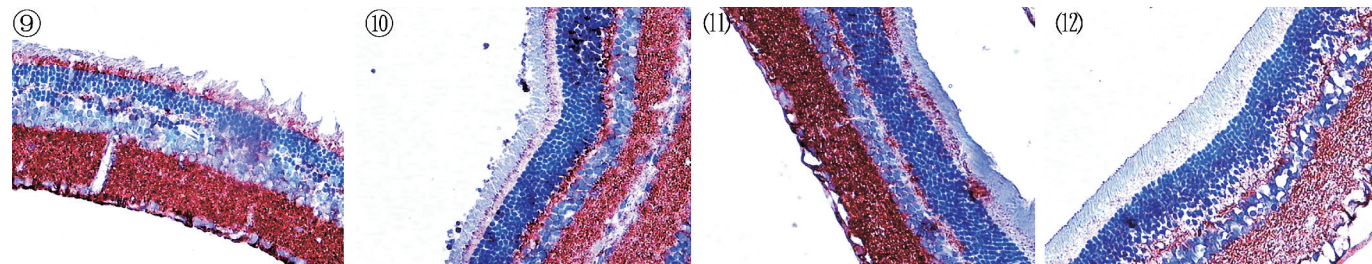


图9 A组正常视网膜 VEGF 表达。图10 B组视网膜 VEGF 表达显著增高。
 图11 C组 VEGF 表达比 A 组增多,但较 B 组少。图12 D组 VEGF 表达比 A 组增多,但较 B 组少。

程度的增加($P<0.05$),以 B 组最为明显,且 C 组和 D 组与 B 组 VEGF 的表达有明显差异($P<0.01$)。从实验结果的分析可见,造模后第 8wk 时 VEGF 表达增加,以 B 组最为明显。双丹明目胶囊可以抑制 VEGF 表达。

3 讨论

DR 发病的确切机制仍未阐明,一般认为是多因素作用的结果,长期的高糖血症是其发病基础^[3]。已知高糖血症能使红细胞内 2,3-二磷酸甘油酸水平下降,红细胞携氧能力降低,使糖化血红蛋白在血红蛋白中的比例升高,其对氧的亲合力高于正常血红蛋白,而使携带的氧不易扩散至组织中;促使视网膜毛细血管基底膜增厚、血小板异常黏附和凝集以及血液黏滞度增高等引起毛细血管闭塞,形成视网膜血流灌注不良,局部缺血、缺氧。而低氧又能使机体一系列的基因转录表达以适应低氧环境的变化,如激活多种促血管生成因子生成、基质金属蛋白酶及整合素等合成,引起细胞基底膜和基质溶解、消退,从而细胞增殖、迁移,导致视网膜新生血管生成,被激活的促血管生成

因子有 20 余种参与了这一过程。其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为是目前发现的最为专一和强大的刺激内皮细胞增生的因子^[4]。VEGF 能特异结合血管内皮细胞,促进内皮细胞生长。另外,它还能使血管通透性增加,血管内皮细胞趋化等功能。因此研究主要集中于 VEGF 上。临床研究证实增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)患者视网膜和玻璃体中 VEGF 水平升高,且随着 DR 严重程度增加,VEGF 表达相应也增加^[4]。

DR 的中医病名为“消渴内障”,根据患眼视觉变化及视力下降情况,将其纳入不同的病症中,如“视瞻昏渺”、“云雾移睛”、“血灌瞳神”、“暴盲”等。我们认为本病病因病理机制为:肾虚是根、阴虚为本、血瘀为标,概言之“肾虚血瘀”为其主要病理机制。“虚”为气血阴阳的虚损;“瘀”为瘀血,它贯穿病机演变过程的始终。因虚致瘀,虚瘀夹杂,以虚为本,以瘀为标,血瘀又是诱发和加快本病发展的病理基础。因此,我们认为 DR 的治疗方法应该以“滋肾活血”为基本法则。基于这一法则,我们创制

了双丹明目胶囊。该药由女贞子、旱莲草、山茱萸、淮山、茯苓、泽泻、丹皮、丹参、三七、菟萸、牛膝等十一味药物组成,方中女贞子、旱莲草滋补肝肾为君药;山茱萸、山药补肾养肝、健脾固精,丹参、三七养血活血、化瘀通络共为臣药;丹皮、泽泻、茯苓、菟萸清肝泻火、除湿利水为佐药;牛膝味苦酸、性平,归肝、肾经,功能活血逐瘀、强筋壮骨且性善下行,可防血气上逆。诸药合用共奏益肾养肝、活血明目之功,主治肝肾阴虚、淤血阻络所致的糖尿病视网膜病变^[5]。

本实验选用SD大鼠通过尾静脉STZ造模后形成糖尿病视网膜病变大鼠模型,然后对其进行不同药物给药。研究发现2mo后,双丹明目组能有效地改善糖尿病大鼠视网膜微血管改变,减轻视网膜各层结构水肿、坏死情况,改善超微结构改变,且双丹明目胶囊能有效降低DR大鼠视网膜VEGF的生成。总之,本研究结果表明,双丹明目胶囊具有改善视网膜组织结构和抑制新生血管形成的作用。

参考文献

- 1 Sogawa K, Nagaoka T, Tanano I, *et al.* Association between diabetic retinopathy and flow-mediated vasodilation in type 2 DM. *Curr Eye Res* 2012;37(5):446
- 2 Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, *et al.* Impaired retinal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus: retinal laser doppler velocimetry study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(12):6729
- 3 Sultan MB, Starita C, Huang K. Epidemiology risk factors and management of paediatric diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2012;96(3):312-317
- 4 Wang S, Xu L, Jonas JB, *et al.* Major eye diseases and risk factor associated with systemic hypertension in an adult Chinese population: the Beijing Eye study. *Ophthalmology* 2009;116(12):2373-2380
- 5 秦裕辉,李文娟,张熙,等. 双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠血糖及视网膜功能的影响. *国际眼科杂志* 2014;14(11):1943-1945

热烈祝贺《国际眼科杂志》英文刊 IJO 入选 2014 中国国际影响力优秀学术期刊

本刊讯:2014年12月16日,“2014中国最具国际影响力学术期刊暨中国学术期刊国际、国内引证报告发布会”在清华大学隆重举行。全国人大常委会科教文卫委员会主任委员、中国出版协会理事长柳斌杰,中宣部、教育部、新闻出版广电总局、中国科协、中国科学院、中国社会科学院、清华大学、北京大学的有关领导和专家,以及来自全国期刊出版界、学术界的2000多位代表出席发布大会。此次发布的各种中国学术期刊国际国内影响力的研究报告,是由清华大学所属中国学术期刊电子杂志社和清华大学图书馆联合设立的中国学术文献国际评价研究中心研制的,也是他们连续发布的第三个年度报告,受到了国内外期刊界、学术界的普遍关注。

本次入选2014中国最具国际影响力学术期刊(TOP5%)的有Cell Research和Chinese Medical Journal等,共175种期刊。入选2014中国国际影响力优秀学术期刊(TOP5%~10%)的共175种,其中眼科学期刊仅2种,分别是国际眼科杂志英文刊——International Journal of Ophthalmology和中华眼科杂志。这表明,IJO的国际影响力正在快速提升。我们的下一个目标是努力争取尽快入选中国最具国际影响力学术期刊。值此,我们特别感谢本刊编委和广大作者及审稿人对本刊的宝贵指导和大力支持!

IJO编辑部