

凉血化瘀法干预老年性黄斑变性 CNV 与外周血 CCR3 表达的相关研究

胡艳红, 祁明信, 陈 胜

基金项目:福建省卫生厅中医药科研项目(No. wzyb0903);福建省教育厅项目(No. JA10077)

作者单位:(350003)中国福建省福州市,福建中医药大学附属第二人民医院

作者简介:胡艳红,女,医学博士,副主任医师,研究方向:中西医结合眼病研究。

通讯作者:胡艳红. 12212022@163.com

收稿日期:2012-11-07 修回日期:2013-02-21

Study of liangxue huayu in treatment of CNV in exudative age-related macular degeneration and expression of CCR3 on peripheral blood mononuclear cells

Yan-Hong Hu, Ming-Xin Qi, Sheng Chen

Foundation items: Chinese Traditional Medicine Research Program of Health Bureau of Fujian Province, China (No. wzyb0903); Program of Education Department of Fujian Province, China (No. JA10077)

Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Fujian Province, University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Correspondence to: Yan-Hong Hu. Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Fujian Province, University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China. 12212022@163.com

Received:2012-11-07 Accepted:2013-02-21

Abstract

• **AIM:** To compare the expressions of CCR3 on T lymphocytes and/or eosinophil peripheral blood cell surface before and after liangxue huayu in treatment of choroidal neovascularization (CNV) in exudative age-related macular degeneration (AMD) and explore the mechanism of the incidence of CNV on exudative AMD.

• **METHODS:** Totally 32 cases of exudative AMD patients, 44 cases of atrophic AMD patients and 50 healthy subjects were observed. 32 cases of exudative AMD patients were treated by liangxue huayu decoction and the expressions of CCR3 on T lymphocytes and/or eosinophil peripheral blood cell surface were detected by flow cytometry.

• **RESULTS:** The expressions of CCR3 on T lymphocytes and/or eosinophil peripheral blood cell surface of the patients with exudative AMD were higher than the control group of healthy people ($P < 0.01$); The expressions of CCR3 on T lymphocytes and/or eosinophil peripheral blood cell surface were no significant difference between

the patients with atrophic AMD and the control group of healthy people ($P > 0.05$); The expressions of CCR3 on T lymphocytes and/or eosinophil peripheral blood cell surface were no significant difference after liangxue huayu on treatment of CNV on exudative AMD ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** The CNV formation of exudative AMD may be related to the higher expressions of CCR3 on T lymphocytes and/or eosinophil cell surface. Liangxue huayu decoction is effective in treating exudative age-related macular degeneration CNV, but it is not related with the expression of CCR3.

• **KEYWORDS:** age-related macular degeneration; choroidal neovascularization; CCR3; liangxue huayu

Citation: Hu YH, Qi MX, Chen S. Study of liangxue huayu in treatment of CNV in exudative age-related macular degeneration and expression of CCR3 on peripheral blood mononuclear cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(3):546-548

摘要

目的:探讨凉血化瘀法治疗渗出型老年性黄斑变性 CNV 与外周血 T 淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面 CCR3 表达的关系。

方法:以 32 例 38 眼渗出型老年性黄斑变性患者、44 例 73 眼萎缩型老年性黄斑变性患者及 50 例健康人为观察对象,流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面 CCR3 的表达,对渗出型老年性黄斑变性患者予凉血化瘀中药治疗,比较治疗前后患者外周血 CCR3 的表达。

结果:渗出型老年性黄斑变性患者外周血 T 淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面 CCR3 表达均高于健康对照组 ($P < 0.01$)。萎缩型老年性黄斑变性患者外周血 CCR3 表达和健康对照组没有显著性差异 ($P > 0.05$)。渗出型老年性黄斑变性患者治疗前后外周血 CCR3 的表达没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

结论:渗出型老年性黄斑变性 CNV 的形成可能与外周血 T 淋巴细胞及/或嗜酸性粒细胞表面 CCR3 的高表达有关,而凉血化瘀法能有效治疗渗出型老年性黄斑变性 CNV,却与 CCR3 表达不相关。

关键词:老年性黄斑变性;脉络膜新生血管;CCR3;凉血化瘀法

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.03.36

引用:胡艳红,祁明信,陈胜.凉血化瘀法干预老年性黄斑变性 CNV 与外周血 CCR3 表达的相关研究.国际眼科杂志 2013;13(3):546-548

0 引言

老年性黄斑变性(senile macular degeneration,SMD)又称为年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD),是一种与年龄相关的眼底病变,其影响视力的最主要原因是脉络膜新生血管(choroidal neovascularization,CNV)形成,所以目前的治疗主要是针对CNV的治疗。该病属中医视瞻昏渺范畴,国医大师唐由之等^[1-3]研究证明,凉血化瘀中药对年龄相关性黄斑变性CNV有良好的治疗效果。本研究拟在其基础上进一步研究凉血化瘀中药治疗渗出型AMD后患者血清CCR3表达的变化,从而探讨老年性黄斑变性CNV分子治疗的靶点,现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取2009-02/2012-03符合选择标准的病例共126例,萎缩型老年性黄斑变性患者44例73眼,其中男24例41眼,女20例32眼,平均年龄 58.16 ± 10.65 岁;渗出型老年性黄斑变性患者32例38眼,其中男18例22眼,女14例16眼,平均 63.27 ± 10.04 岁;50例健康人(没有任何眼底黄斑病变者)设为对照组,其中男27例,女23例,平均 60.56 ± 9.45 岁。三组患者在年龄、性别上无统计学差异($P>0.05$)。

1.1.1 病例诊断标准 西医诊断标准参照张承芬主编《眼底病学》中相关标准及我国1986-08中华医学会眼科学会眼底病学组讨论制订的《老年性黄斑变性临床诊断标准》制订^[4,5]。中医辨证标准参照中华人民共和国卫生部编辑的《中药新药临床研究指导原则》(第三辑)的相关标准制订。西医诊断标准:(1)年龄为50岁以上;(2)视力下降较急;(3)眼底检查:早期黄斑区色素脱失,中心反射不清或消失,玻璃膜疣常有融合;中期黄斑区出现浆液性或出血性盘状脱离,重者视网膜下水肿、视网膜内出血、玻璃体出血;晚期瘢痕形成;(4)血管造影黄斑区有脉络膜新生血管,荧光素渗漏,出血者有遮蔽荧光。中医辨证标准:视力下降,或伴有视物变形,眼底查见黄斑区玻璃膜疣、出血、渗出及新生血管膜,伴有头痛失眠、心烦、舌质红或暗红,有瘀斑,苔薄,脉弦数或涩。

1.1.2 纳入和排除标准 纳入标准:(1)符合诊断标准;(2)年龄在50~80岁;(3)患者知情同意。排除标准:(1)过敏体质或其它全身性疾病禁忌行眼底荧光血管造影检查者;(2)既往曾患中心性浆液性视网膜病变,或其它黄斑病变,现眼底检查难以与老年性黄斑变性作明确鉴别者;(3)合并有免疫系统疾病和/或进行激素等免疫抑制剂治疗者;(4)合并有眼前节疾病影响眼底诊断者,如角膜白斑、老年性白内障等;(5)合并有心血管、脑血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病、精神病及老年性痴呆症状者。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 对所有渗出型AMD患者均由同一医师根据眼底表现及全身情况辨证施药。以凉血化瘀法为主随证加减。凉血化瘀方:蒲黄、姜黄、旱莲草、女贞子、当归、川芎、丹参、枸杞子、菟丝子、黄芪、半夏、浙贝母。伴有出血可酌加大小蓟、侧柏叶、白茅根、藕节炭;伴有渗出酌加车前子、泽泻、茯苓等,所有药物均福建中医药大学附属第二人民医院中药房提供,符合国家生药标准,并由福建中医药大学附属第二人民医院煎药室统一煎制。每日1剂,水煎服,日服2次,分别在第2wk;1,2,3mo时各复诊1次,每次复诊时询问核实服药情况,并检查最佳矫正视力;OCT与FFA分别在开始服药前和服药3mo后各检查1

表1 老年性黄斑变性患者及健康人外周血T淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面CCR3的表达

分组	n(例)	CCR3(T淋巴细胞)	CCR3(嗜酸性粒细胞)
健康对照组	50	2.89±0.36	1.21±0.22
萎缩型AMD组	44	2.76±0.31	1.32±0.31
渗出型AMD组	32	4.21±0.32	3.03±0.46

表2 萎缩型老年性黄斑变性患者治疗前后外周血T淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面CCR3的表达

时间	CCR3(T淋巴细胞)	CCR3(嗜酸性粒细胞)
治疗前	4.21±0.32	3.03±0.46
治疗后	4.28±0.92	2.96±0.75

次。受试者依从性差,在纳入研究期间参与其他抗CNV治疗或自行退出者或服药后产生严重不适者均为脱落病例。脱落病例的处理:(1)对于中途退出研究病例或失访脱落病例,研究者应积极采取措施,尽可能完成最后一次检测,以备对其疗效和安全性进行分析,所有脱落病例,均在病例报告中填写研究结论表及病例脱落的原因;(2)所有剔除或脱落病例均应如实记录脱落原因,用药过程中出现不良反应者,均列入不良反应统计。

1.2.2 视力评价 视力:采用国际标准视力表进行检查,记录最佳矫正视力。视力疗效标准:视力提高两行及两行以上者为显效,视力在上下1行波动者为有效,视力下降两行及两行以上者为无效。

1.2.3 流式细胞术检测外周血T淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面CCR3的表达情况 取100 μ L用肝素抗凝的全血,加入10 μ L PE标记CCR3单克隆抗体,震荡混匀后室温避光孵育20min,加1:10稀释后的溶血素2mL,震荡混匀后室温避光孵育12min,离心,1000r/min,5min,弃上清,用2mL Stain buffer (pH=7.4的磷酸盐缓冲液加20mL/L小牛血清和1g/L叠氮钠)洗2次,细胞沉淀用500 μ L Stain buffer重悬后上流式细胞仪检测,同时设不加标记抗体的阴性对照管。

统计学分析:所有数据应用SPSS 17.0统计软件包进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 老年性黄斑变性患者及健康人外周血T淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面CCR3的表达 由表1可见,萎缩型老年性黄斑变性患者外周血T淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面CCR3表达和健康对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。渗出型老年性黄斑变性患者外周血T淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面CCR3表达均高于健康对照组($P<0.01$)。

2.2 渗出型AMD患者治疗后视力变化 共观察32例患者38眼,其中,显效9眼(23.68%),有效21眼(55.26%),无效8眼(21.05%)。视力稳定并提高的患者达78.95%。

2.3 渗出型AMD患者治疗后外周血CCR3表达 由表2可见,渗出型AMD患者治疗前后外周血T淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面CCR3的表达没有显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

AMD 大多发生于 50 岁以上,是局限于视网膜黄斑区的一种退行性变性。从临床和病理特征来看,AMD 分为两型:萎缩型(干性)和渗出型(湿性)。干性 AMD 表现为进行性的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)和光感受器变性。渗出型在黄斑视网膜下出现 CNV,有时伴出血和渗出。目前全球大约有 3000~5000 万 AMD 患者,其中 90% 的患者由于 CNV 形成而造成严重视力损害^[6]。目前由于其发病机制不明,至今还没有一种常规的临床治疗方案。

该病属中医视瞻昏渺范畴,古代医家认为其病因病机与肝、脾、肾的功能失调有关。肝肾亏损为老年性眼病的常见病机之一,而身体衰老所致脏腑功能不足,气血虚损亦可发生本病。现代中医基本上一致认为湿性黄斑变性从本质上来讲,属于本虚标实之证,当出现典型的脉络膜新生血管及出血者,患者多属于虚实夹杂证(痰湿、血瘀、肝郁)。故在治疗方面,不仅要注意全身辨证,局部辨证亦非常重要,眼内外的出血、积血,局部组织的增生物(颗粒、结节、隆起)及眼底一切新生血管,均属于血瘀证范畴,故治疗以凉血止血或活血止血为常用治法。凉血止血常用药物为:生地、玄参、大小蓟、槐花、藕节、茅根、地榆、仙鹤草、珍珠母、紫草、紫珠、地锦草;活血止血常用药物:丹参、丹皮、茜草、三七、蒲黄、益母草、五灵脂、王不留行、血竭等。从本研究的结果看,凉血化瘀法对于老年性黄斑变性 CNV 的治疗确实有效。

CCR3 是一种 G 蛋白偶联受体,主要表达于嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、Th2 细胞,其中嗜酸性粒细胞的表达水平最高,主要介导细胞对某些趋化因子的反应并产生细胞迁移、活化等效应,选择性促进嗜酸性粒细胞(Eos)募集浸润到炎症部位,从而参与过敏性鼻炎、过敏性哮喘等疾病的形成和发展^[7-9]。也有学者报道在人类微血管内皮细胞中有 CCR3 表达,并证明其参与了血管生成^[10]。我们的研究结果显示:渗出型 AMD 组 T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞表面 CCR3 的表达均较健康对照组高,而萎缩型 AMD 组与健康对照组没有显著差异,由此我们

推断 T 淋巴细胞和/或嗜酸性粒细胞表面 CCR3 的高表达可能是渗出型 AMD 患者 CNV 形成的因素之一,也就是说采用 CCR3 拮抗剂降低 CCR3 表达可能减少 CNV 形成。这与 Takeda 等^[11]近期研究结果通过阻滞 CCR3 来抑制 CNV 可以直接抑制内皮细胞的增殖,减少 CNV 形成相符。因此通过早期 CCR3 靶点诊断和治疗也许可以减少 AMD 患者的视觉丢失。本研究结果同时显示凉血化瘀法对于老年性黄斑变性 CNV 的治疗虽然有效,但治疗前后患者外周血 T 淋巴细胞及嗜酸性粒细胞表面 CCR3 的表达均没有显著变化,说明凉血化瘀中药干预老年性黄斑变性 CNV 不是通过阻断 CCR3 的表达这条通路,其具体的机制有待进一步研究。

参考文献

- 1 王慧娟,唐由之.凉血化瘀方治疗湿性老年黄斑变性临床研究.中国中医眼科杂志 2008;18(6):322-324
- 2 唐由之,周尚昆,冯俊,等.中药治疗湿性晚期老年性黄斑变性临床疗效观察.中国中医眼科杂志 2009;19(6):340-341
- 3 李学晶,唐由之,张海涛.凉血化瘀中药治疗特发性脉络膜新生血管临床观察.国际眼科杂志 2009;9(11):2195-2197
- 4 张承芬.眼底病学.北京:人民卫生出版社 1997:332
- 5 全国眼底病研究协作组.老年性黄斑变性临床诊断标准.眼科新进展 1986;6(4):15
- 6 Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 2003;48:257-293
- 7 Owen C. Chemokine receptors in airway disease: which receptors to target? *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:193-202
- 8 Pease JE, Williams TJ. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:305-318
- 9 Willems LI, Ijzerman AP. Small molecule antagonists for chemokine CCR3 receptors. *Med Res Rev* 2010;30:778-817
- 10 Salcedo R, Young HA, Ponce ML, et al. Eotaxin (CCL11) induces *in vivo* angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J Immunol* 2001;166:7571-7578
- 11 Takeda A, Baffi JZ, Kleinman ME, et al. CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature* 2009;460:225-230