

· 实验研究 ·

加减驻景方含药血清对缺氧状态下大鼠脉络膜血管内皮细胞增生的抑制作用

刘彦江 亢泽峰 邢凯 刘健

716200 延安, 宜川县人民医院眼科(刘彦江); 102200 北京, 中国中医科学院眼科医院门诊眼科(亢泽峰、刘健); 102200 北京市昌平区中医医院眼科(邢凯)

通信作者: 亢泽峰, Email: zefeng2531@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.003

【摘要】 **背景** 黄斑区脉络膜新生血管(CNV)是致盲率较高的眼病之一, 以往的主要治疗方法是光动力学疗法和玻璃体腔抗血管内皮生长因子(VEGF)药物注射, 但均存在一定的不良反应。研究认为, 加减驻景方的应用对相关病变有治疗效果。 **目的** 探讨加减驻景方含药血清对缺氧状态下大鼠脉络膜血管内皮细胞(RCVECs)增生的影响。 **方法** 10 只 SD 大鼠给予 0.525 g/ml 加减驻景方药液 20 ml/kg 灌胃 3 d, 于末次给药后 2 h 无菌条件下采集腹主动脉血, 制备加减驻景方含药血清。将培养的 RCVECs 分为 4 个组, 空白对照组细胞用常规培养液进行培养, 氯化钴组在培养液中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴 100 μl 以制备细胞缺氧模型, 空白血清+氯化钴组在缺氧细胞培养液中添加体积分数 20% 空白血清, 含药血清+氯化钴组在缺氧细胞培养液中添加体积分数 20% 含药血清。细胞培养后 24 h 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各组细胞的增生情况; 采用逆转录 PCR 和 Western blot 技术检测各组细胞中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)基因和蛋白的相对表达量。 **结果** 培养的 RCVECs 生长良好, 呈梭形。100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴作用后成功建立了缺氧细胞模型。MTT 法检测显示, 空白对照组、氯化钴组、含药血清+氯化钴组和空白血清+氯化钴组吸光度(A)值分别为 0.659 ± 0.051 、 0.757 ± 0.553 、 0.683 ± 0.037 和 0.731 ± 0.038 , 其中氯化钴组 A 值明显高于空白对照组和含药血清+氯化钴组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。空白对照组、氯化钴组、含药血清+氯化钴组和空白血清+氯化钴组细胞中 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 及其蛋白的相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义(HIF-1 α mRNA: $F = 3.100$, $P < 0.05$; VEGF mRNA: $F = 3.420$, $P < 0.05$; HIF-1 α 蛋白: $F = 470.600$, $P = 0.000$; VEGF 蛋白: $F = 146.700$, $P = 0.000$), 其中氯化钴组细胞中 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 及其蛋白的相对表达量均明显高于空白对照组和含药血清+氯化钴组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。 **结论** 加减驻景方含药血清可能通过抑制 RCVECs 分泌 HIF-1 α 和 VEGF 的机制而抑制缺氧状态下 RCVECs 的增生。

【关键词】 缺氧/化学诱导; 脉络膜血管内皮细胞; 中草药; SD 大鼠; 含药血清; 加减驻景方; 细胞培养

基金项目: 国家自然科学基金项目(81574032)

Inhibitory effects of *jiajianzhuji* decoction containing serum on proliferation of rat choroidal vascular endothelial cells

Liu Yanjiang, Kang Zefeng, Xing Kai, Liu Jian

Department of Ophthalmology, Yichuan People's Hospital of Yan'an City, Yan'an 716200, China (Liu YJ); Outpatient

Department of Ophthalmology, Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 102200, China

(Kang ZF, Liu J); Department of Ophthalmology, Changping District Traditional Chinese Medicine Hospital, Beijing

102200, China (Xing K)

Corresponding author: Kang Zefeng, Email: zefeng2531@163.com

【Abstract】 **Background** Choroidal neovascularization (CNV) of macular zone is one of blinding eye diseases. Conventional treatment methods include photodynamic therapy and intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs. However, there are some adverse effects following these treatments. Researches showed that *jiajianzhuji* decoction, a Chinese herbal medicine, can inhibit CNV. **Objective** This study was to investigate the impact of drug serum of *jiajianzhuji* decoction (drug serum) on the proliferation of rat choroidal vascular endothelial cells (RCVECs). **Methods** *Jiajianzhuji* decoction (0.525 g/ml) was used by

intra-gastric administration with the dosage 20 ml/kg for 3 days, and the abdominal aortic blood was collected 2 hours after last dosage to prepare the drug serum. Cultured RCVECs were divided into 4 groups. CoCl_2 with the concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ (100 μl) was added in the medium to establish the anoxic models in the CoCl_2 group, and 20% drug serum was added in the anoxic culture medium in the drug serum+ CoCl_2 group. Regular culture medium was used in the blank control group, and 20% pure serum was added in the anoxic culture medium in the pure serum+ CoCl_2 group. The cells were incubated for consecutive 24 hours, and the growth of the cells was detected by monotetrazolium (MTT) assay as absorbance (A). The expressions of gene and protein of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and VEGF in the cells were detected by reverse transcription PCR and Western blot, respectively. This study was approved by the Ethics Committee of Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences. **Results** Cultured cells grew well with fusiform shape. Hypoxic cell models were created by adding CoCl_2 . The mean A values were 0.659 ± 0.051 , 0.757 ± 0.553 , 0.683 ± 0.037 and 0.731 ± 0.038 in the blank control group, CoCl_2 group, drug serum+ CoCl_2 group and pure serum+ CoCl_2 group, respectively, and the A value in the CoCl_2 group was significantly elevated in comparison with the blank control group and drug serum+ CoCl_2 group (both at $P < 0.01$). The significant differences were found in the relative expressions of HIF-1 α and VEGF among the blank control group, CoCl_2 group, drug serum+ CoCl_2 group and pure serum+ CoCl_2 group (HIF-1 α : $F = 3.100$, $P < 0.05$; VEGF mRNA: $F = 3.420$, $P < 0.05$; HIF-1 α protein: $F = 470.600$, $P = 0.000$; VEGF protein: $F = 146.700$, $P = 0.000$), and the relative expressions of HIF-1 α mRNA, VEGF mRNA, HIF-1 α protein and VEGF protein in the CoCl_2 group were significantly higher than those in the blank control group and drug serum+ CoCl_2 group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Drug serum of *jiajianzhujing* decoction can inhibit the growth and proliferation of hypoxic RCVECs by down-regulating the secretion of HIF-1 α and VEGF.

[Key words] Hypoxia/chemistry-induced; Choroidal vascular endothelial cells; Chinese herbal medicine; Rats, Sprague-Dawley; Drug serum; *Jiajianzhujing* decoction; Cultured, cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81574032)

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是病理性近视严重的并发症,也是患者致盲和低视力的主要原因之一。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 可促进血管内皮细胞的活化、增生和迁移,在 CNV 的形成中发挥重要作用,研究表明在病理性近视形成的过程中因缺氧微环境所产生的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 可促进 VEGF 高表达,参与 CNV 的形成^[1]。临床研究证实,加减驻景方既能补肝肾益精血和补脾气除痰湿,又可行气活血而通络,从而抑制 CNV 的形成^[2],但其机制尚不清楚。本研究观察加减驻景方含药血清对体外培养缺氧诱导的大鼠脉络膜血管内皮细胞 (rat choroidal vascular endothelial cells, RCVECs) 中 HIF-1 α 和 VEGF 的影响,为中医药治疗病理性近视所致的 CNV 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只,体质量 (220 ± 20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。本课题已通过中国中医科学院眼科医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂及仪器 大鼠 RCVECs (江阴齐氏生物有限公司);胰蛋白酶、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Amresco 公司);胎牛血清 (美国 HyClone 公司);四甲基偶氮唑盐 (monotetrazolium, MTT) (美国 Sigma 公司);PCR 试剂盒、PCR 引物 (北京博奥森生物技术有限公司);抗 HIF-1 α 一抗 (编号:HK14125,上海户实医药科技有限公司,稀释比例为 1:500);二抗 (编号:GL1538,北京百奥莱博科技有限公司)。IX81 型荧光倒置显微镜 (美国 Olympus 公司);超净工作台 (西安永乐精密机械有限公司);体积分数 5% CO_2 培养箱 (美国 Thermo 公司);全自动酶标仪 (德国 Katyo 公司);5417R 型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司);电泳仪 (北京市六一仪器厂);UV-2401 PC13.0 型紫外分光光度计 (日本津岛公司);PCR 热循环仪 (新加坡 Applied Biosystems 公司);WD-9413A 型凝胶成像分析仪 (德国 Alpha Innotech 公司);4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 (德国 Katyo 公司)。

1.1.3 加减驻景方药液 加减驻景方的配方为楮实子 15 g,枸杞子 15 g,菟丝子 15 g,当归 10 g,菟蔚子 12 g,生芪 10 g,茯苓 10 g,生三七粉 3 g,密蒙花 10 g,桂枝 10 g,由四川新绿药业科技发展股份有限公司配成质量浓度为 0.525 g/ml 的药液,高压灭菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存

备用。

1.2 方法

1.2.1 大鼠含药血清的制备 正常 SD 大鼠 20 只,按照随机数字表法将大鼠随机分为含药血清组和空白血清组,每组 10 只。含药血清组大鼠给予 0.525 g/ml 加减驻景方药液 20 ml/kg 灌胃,相当于 60 kg 成人临床用量的 10 倍,每日 2 次;空白血清组大鼠以相同的方式给予质量分数 0.9% 氯化钠溶液 20 ml/kg 连续灌胃 3 d,于末次给药后 2 h 下肢肌内注射盐酸氯胺酮和盐酸赛拉嗪混合液麻醉动物,于无菌条件下腹主动脉采血,静置 3 h,离心半径 3 cm,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,56 °C 灭菌 30 min,0.22 μm 滤网过滤除菌,-20 °C 保存备用。

1.2.2 细胞培养 将 RCVECs 接种至 25 cm² 培养瓶中,加入培养液,置入 37 °C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中静置 6~8 h 或过夜,以稳定细胞状态;待细胞贴壁生长铺满瓶底达 80% 以上时进行消化、传代和冻存。

1.2.3 氯化钴和含药血清影响细胞增生能力实验的最适质量浓度筛选 取对数生长期大鼠 RCVECs 悬液,以 3×10⁴/ml 的密度接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl,每组设 4 个复孔,分为空白对照组、氯化钴组、含药血清+氯化钴组和空白血清+氯化钴组,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,弃培养液,空白对照组加入 100 μl 的新培养液,氯化钴组分别加入 25、50、75、100、125、150、200 和 300 μmol/L 氯化钴 100 μl,含药血清+氯化钴组分别加入体积分数 5%、10%、15%、20% 加减驻景方含药血清 100 μl,空白血清+氯化钴组分别加入体积分数 5%、10%、15%、20% 空白血清 100 μl,于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,避光下每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl,孵育 4 h,弃上清液,避光条件下加入 DMSO 150 μl/孔,置酶标仪上振荡 10 min,于波长 630 nm 处测定各孔吸光度(A)值。实验重复 3 次。

1.2.4 MTT 法检测细胞的增生能力 取对数生长期大鼠 RCVECs 悬液,以 3×10⁴/ml 密度接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl,每组设 4 个复孔,分为空白对照组、氯化钴组、含药血清+氯化钴组和空白血清+氯化钴组,细胞于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,弃培养液,空白对照组加入 100 μl 新培养液,氯化钴组加入 100 μmol/L 氯化钴 100 μl,含药血清+氯化钴组加入含 20% 含药血清与等浓度氯化钴混合液 100 μl,空白血清+氯化钴组加入含 20% 空白血清与等浓度氯化钴混合液 100 μl,于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,在避光条件下每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl,孵育 4 h,

弃上清液,避光条件下每孔加入 DMSO 150 μl,置酶标仪上振荡 10 min,于波长 630 nm 处测各孔吸光度(A)值,实验重复 3 次。

1.2.5 逆转录 PCR 法检测 HIF-1α 和 VEGF mRNA 的表达 取对数生长期大鼠 RCVECs 悬液,以 1×10⁵/ml 密度接种于 6 孔培养板,每孔 1 ml,37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,弃培养液。细胞分组和培养方法同 1.2.4。按照 Trizol 说明书提取细胞的 RNA,按逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,以 β-actin 作为内参。引物序列:HIF-1α 上游引物为 5'-GAACA AACACACACAGCGAACGT-3',下游引物为 5'-TGTTACTGTTGTTATCAATATAGTGA-3';VEGF 上游引物为 5'-TGGATGTCTACCAGCGAAGC-3',下游引物为 5'-ACAAGGCTCACAGTGATTTT-3';β-actin 上游引物为 5'-ACAGTCCGCCTAGAAGCAC-3',下游引物为 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'。反应条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 37 个循环;4 °C 停止反应。取出反应管,于 4 °C 保存备用,其中 β-actin 反应为 27 个循环。HIF-1α 的扩增产物长度为 700 bp,VEGF 为 500 bp。琼脂糖凝胶电泳,以 Image J 分析软件对 PCR 产物进行半定量分析,基因的相对表达量 = 目标基因 A 值/β-actin A 值。

1.2.6 Western blot 法检测细胞中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的相对表达量 收集各组细胞,用蛋白提取液常规提取蛋白质,BCA 法测定蛋白质量浓度,取 30 μg 样品至 2 ml EP 管中,加入等容积缓冲液,混匀后沸水煮 5 min,冷却后 10 000 r/min 离心 5 min,吸出上清液备用。行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,取下玻璃板,将凝胶移入电泳槽内,加入电泳缓冲液,将处理好的样品加样,开始电泳。电泳结束后转膜至 PVDF 膜上,PVDF 膜置于封闭液中水平轻摇孵育 1 h,弃封闭液,漂洗 3 次。把 PVDF 膜放入杂交袋中,加入稀释好的一抗和 β-actin,封口杂交,37 °C 水平摇动孵育 2 h,4 °C 过夜。二抗孵育,再将 PVDF 膜移到新的杂交袋中,加入稀释好的二抗,封口杂交,37 °C 水平摇动孵育 3 h。将膜放入 GE-ImageQuant-LAS-4000 化学发光成像分析仪内成像,再用图像分析软件进行分析,以 β-actin 作为内参对照,蛋白相对表达水平 = 目的蛋白灰度值/β-actin 灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析。测定指标的数据资料经 W 检验均呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene 检验证实组间方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平实验设计,不同浓度氯化钴组、不同体

积分含药血清组、不同药物作用组细胞增生能力(A 值)的总体差异比较均采用单因素方差分析;各组细胞中 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 及其蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较均采用 LSD-*t* 检验。采用双侧检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养的大鼠 RCVECs 形态

培养第 3 天,大鼠 RCVECs 轮廓较清晰;培养第 4 天 RCVECs 的细胞核呈梭形,位于中央,至培养后第 6 天和第 7 天,细胞呈轮廓较清晰的梭形(图 1)。

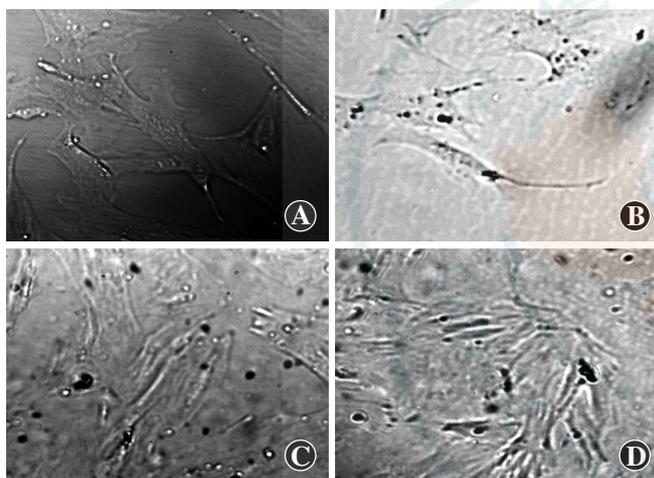


图 1 培养的大鼠 RCVECs 形态($\times 400$) A:培养 3 d 的细胞轮廓较清晰 B:培养 4 d 的细胞细胞核呈梭形,位于中央 C:培养 6 d 可见细胞呈轮廓较清晰的梭形 D:培养 7 d 可见细胞呈轮廓较清晰的梭形

2.2 不同浓度氯化钴和不同体积分数含药血清作用后 RCVECs 的增生能力

不同浓度氯化钴作用后对大鼠 RCVECs 的增生能力明显不同,总体比较差异有统计学意义($F = 23.460$, $P < 0.01$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组细胞增生值较空白对照组轻度升高,但差异均无统计学意义($P = 0.966, 0.895$); 75、100 和 125 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组细胞增生值均明显升高,而 150、200 和 300 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组细胞增生值明显下降,差异均有统计学意义($P = 0.040, 0.001, 0.007, 0.047, 7.52\text{E-}05, 9.639\text{E-}11$), 其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组细胞增生值最大, 300 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组细胞增生值最小(表 1)。空白对照组, 5%、10%、15%、20% 含药血清组和 5%、10%、15%、20% 空白血清组细胞增生值明显不同,组间总体比较差异有统计学意义($F = 9.881$, $P < 0.05$), 与空白对照组比较, 5%、10%、15%、20% 含药血清组细胞增生值均明

显下降,差异均有统计学意义($P = 0.000, 3.416\text{E-}05, 3.932\text{E-}05, 1.359\text{E-}08$), 其中 20% 含药血清组细胞增生值最低;而 5%、10%、15%、20% 空白血清组细胞增生值与空白对照组相比差异均无统计学意义($P = 0.462, 0.477, 0.410, 0.403$)(表 2)。

表 1 不同浓度氯化钴组 RCVECs 增生值的比较($\bar{x} \pm s, A$ 值)

组别	样本量	细胞增生值
空白对照组	12	0.669 \pm 0.041
25 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组	12	0.670 \pm 0.091
50 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组	12	0.671 \pm 0.063
75 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组	12	0.717 \pm 0.044 ^a
100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组	12	0.748 \pm 0.052 ^b
125 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组	12	0.733 \pm 0.042 ^b
150 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组	12	0.622 \pm 0.066 ^a
200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组	12	0.573 \pm 0.077 ^b
300 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组	12	0.500 \pm 0.076 ^b
<i>F</i> 值		23.460
<i>P</i> 值		<0.01

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) RCVECs:大鼠脉络膜血管内皮细胞

表 2 不同体积分数含药和空白血清组 RCVECs 增生值的比较($\bar{x} \pm s, A$ 值)

组别	样本量	细胞增生值
空白对照组	12	0.669 \pm 0.041
5% 含药血清组	12	0.588 \pm 0.053 ^a
10% 含药血清组	12	0.571 \pm 0.062 ^a
15% 含药血清组	12	0.572 \pm 0.059 ^a
20% 含药血清组	12	0.529 \pm 0.076 ^a
5% 空白血清组	12	0.652 \pm 0.044
10% 空白血清组	12	0.653 \pm 0.056
15% 空白血清组	12	0.651 \pm 0.057
20% 空白血清组	12	0.650 \pm 0.071
<i>F</i> 值		9.881
<i>P</i> 值		<0.05

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) RCVECs:大鼠脉络膜血管内皮细胞

2.3 各组 RCVECs 增生能力的比较

空白对照组、氯化钴组、含药血清+氯化钴组和空白血清+氯化钴组 RCVECs 增生值明显不同,总体比较差异有统计学意义($F = 11.100$, $P < 0.01$), 其中氯化钴组细胞增生值明显高于空白对照组,差异有统计学意义($P = 5.42\text{E-}06$), 含药血清+氯化钴组细胞增生值明显低于氯化钴组,差异有统计学意义($P = 0.000$), 而空白血清+氯化钴组与氯化钴组间细胞增生值的差异无统计学意义($P = 0.171$)(表 3)。

表 3 氯化钴和不同血清处理后各组间 RCVECs 增生能力的比较 ($\bar{x} \pm s, A$ 值)

组别	样本量	细胞增生值
空白对照组	12	0.659±0.051
氯化钴组	12	0.757±0.553 ^a
含药血清+氯化钴组	12	0.683±0.037 ^b
空白血清+氯化钴组	12	0.731±0.038
F 值		11.100
P 值		<0.01

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与氯化钴组比较,^b $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) RCVECs:大鼠脉络膜血管内皮细胞

2.4 各组 RCVECs 中 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 的表达

空白对照组、氯化钴组、含药血清+氯化钴组和空白血清+氯化钴组 RCVECs 中 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 的相对表达量明显不同,总体比较差异均有统计学意义($F = 3.100, 3.420$,均 $P < 0.05$)。氯化钴组细胞中 HIF-1 α mRNA 的相对表达量明显高于空白对照组,差异有统计学意义($t = 0.025, P < 0.05$),含药血清+氯化钴组 HIF-1 α mRNA 的相对表达量明显低于氯化钴组,差异有统计学意义($P = 0.039$),空白血清+氯化钴组细胞中 HIF-1 α mRNA 的相对表达量与氯化钴组比较差异无统计学意义($P = 0.079$)。氯化钴组细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量明显高于空白对照组,差异有统计学意义($P = 0.018$),含药血清+氯化钴组细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量明显低于氯化钴组,差异有统计学意义($P = 0.034$),空白血清+氯化钴组 VEGF mRNA 的相对表达量与氯化钴组比较差异无统计学意义($P = 0.118$)(图 2,表 4)。

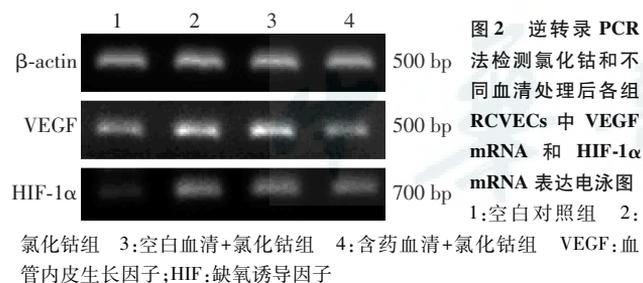


图 2 逆转录 PCR 法检测氯化钴和不同血清处理后各组 RCVECs 中 VEGF mRNA 和 HIF-1 α mRNA 表达电泳图

1:空白对照组 2:氯化钴组 3:空白血清+氯化钴组 4:含药血清+氯化钴组 VEGF:血管内皮生长因子;HIF:缺氧诱导因子

表 4 氯化钴和不同血清处理后各组间 RCVECs 中 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	HIF-1 α mRNA 相对表达量	VEGF mRNA 相对表达量
空白对照组	3	0.857±0.049	0.675±0.091
氯化钴组	3	1.017±0.027 ^a	0.957±0.019 ^a
含药血清+氯化钴组	3	0.873±0.020 ^b	0.713±0.141 ^b
空白血清+氯化钴组	3	0.900±0.122	0.790±0.158
F 值		3.100	3.420
P 值		<0.05	<0.05

注:与各自的空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自的氯化钴组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) RCVECs:大鼠脉络膜血管内皮细胞;HIF:缺氧诱导因子;VEGF:血管内皮生长因子

2.5 各组 RCVECs 中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达

空白对照组、氯化钴组、含药血清+氯化钴组和空白血清+氯化钴组 RCVECs 中 HIF-1 α 蛋白和 VEGF 蛋白的相对表达量明显不同,总体比较差异均有统计学意义($F = 470.600, 146.700$,均 $P = 0.000$);氯化钴组细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的相对表达量均明显高于空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),含药血清+氯化钴组细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的相对表达量明显低于氯化钴组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),空白血清+氯化钴组细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的相对表达量与氯化钴组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(图 3,表 5)。



图 3 Western blot 法检测氯化钴和不同血清处理后各组 RCVECs 中 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 表达电泳图 1:空白对照组 2:氯化钴组 3:空白血清+氯化钴组 4:含药血清+氯化钴组 HIF:缺氧诱导因子;VEGF:血管内皮生长因子

表 5 氯化钴和不同血清处理后各组间 RCVECs 中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	HIF-1 α 蛋白相对表达量	VEGF 蛋白相对表达量
空白对照组	3	0.675±0.005	0.671±0.090
氯化钴组	3	1.374±0.003 ^a	1.370±0.151 ^a
含药血清+氯化钴组	3	0.827±0.041 ^b	0.732±0.202 ^b
空白血清+氯化钴组	3	1.327±0.140	1.451±0.221
F 值		470.600	146.700
P 值		0.000	0.000

注:与各自的空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自的氯化钴组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) RCVECs:大鼠脉络膜血管内皮细胞;HIF:缺氧诱导因子;VEGF:血管内皮生长因子

3 讨论

病理性近视可引起多种眼底病变,其主要病理机制为患眼眼轴变长、球壁伸展变薄、视网膜和脉络膜毛细血管变细、组织营养代谢障碍,进而引起视网膜、脉络膜和巩膜组织的退行性变性,血管灌注不良,从而影响脉络膜及视网膜内层、外层的血液供应,诱导新生血管生成因子的形成,促使 CNV 形成^[1]。CNV 是病理性近视严重的并发症之一,其发病机制尚不完全明确,目前认为多种因素可致视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞发生退行性改变,诱发 RPE 细胞、Bruch 膜和脉络膜血管床发生病理性改变,继而形成新生血管^[3]。研究认为 CNV 的形成是一个

多细胞、多因子协同参与的复杂病理过程,如血管内皮细胞、RPE 细胞、VEGF、苏氨酸蛋白激酶 (protein kinase B, PKB/AKT) 等,调控这些细胞和因子的相关信号通路,如 HIF-1 α 、VEGF、炎症因子、DLL4/Notch 等相关的信号转导通路是目前研究的热点^[4-6],其中 HIF-1 α 相关信号转导通路是 CNV 形成过程中的重要通路之一,是调控 VEGF 高表达的主要信号通路。目前,CNV 的主要治疗方法有光动力学疗法、手术疗法、玻璃体腔注射抗 VEGF 药物等,其中传统的光动力学疗法治疗后易形成黄斑区瘢痕,且其远期疗效较差,复发率高^[7]。玻璃体腔注射抗血管内皮细胞单克隆抗体是目前常用的治疗 CNV 的方法,但其价格昂贵,复发率高,操作过程中发生眼内感染的风险较大,而且其远期的安全性尚未确定,影响其预后的因素也较为复杂^[8-10]。中医药以其辨证论治和整体治疗观念等特色在眼底黄斑病变等难治性眼病中的应用有一定作用,中西医结合治疗也能够发挥协同作用。

中药血清药理学是近十余年来兴起的一门药理实验方法学,进行药物的体外实验是深入研究其药理作用机制、作用的物质基础和细胞分子水平变化必不可少的步骤。中药血清药理学以含药血清为研究对象,排除了中药制剂的理化干扰,为中药复方药理学、药化学、药动学提供了新的研究思路^[11]。

传统医学认为,高度近视黄斑病变责之于肝、脾、肾三脏,肝血肾精耗伤不能养目,目络空虚出现视物昏花视力下降;肝郁脾虚,津液不运,则聚为痰湿,虚火上炎灼络出血,痰瘀互结,血不养脉,反复日久,则成病络^[12-13],病络易损则血溢络外,出现视力障碍。为此,本研究中应用补精养血,行气活血,通络明目治法,在此方基础上进行加减,形成固定方剂,方剂中褚实子、菟丝子、枸杞子补肾益精、养肝明目,加入菟蔚子以助明目;密蒙花明目退翳;再配桂枝、茯苓温阳利水;生芪、当归合用益气补血,三七粉活血止血还可以防止再次出血,水肿明显时加夏枯草,渗出较多时加炒山楂、浙贝,诸药合用,既补肝肾益精血,补脾气除痰湿,又行气活血而通络,邪阻去而目得濡养,神光发越。现代药理学研究发现,行气活血中药可以改善局部血液循环,密蒙花可抑制 HIF-1 α 的表达^[14];三七可改善局部血液循环,改善缺氧状态^[15],从而减少 HIF-1 α 的表达,进而减少新生血管的形成。我们前期的动物研究证实,加减驻景方能有效抑制 VEGF、基质金属蛋白酶-2 在巩膜和视网膜中的表达,同时上调色素上皮源性生长因子和金属蛋白酶组织抑制剂-2 的表达,促进血管生成与抑制之间形成的动态平衡,从而抑制 CNV 的产

生^[16]。本研究中采用 MTT 法检测氯化钴及含药血清对 RCVECs 增生能力的影响,证实低浓度的氯化钴能促进细胞的增生,高浓度的氯化钴则可抑制 RCVECs 的增生,100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组细胞的增生能力最强,而 >200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴组细胞增生能力较空白对照组明显下降,20% 含药血清+氯化钴组细胞增生能力较空白对照组明显增强。本研究成功地建立了化学性缺氧的细胞模型,分别采用逆转录 PCR 和 Western blot 技术检测发现缺氧细胞中 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 及其蛋白的表达均明显强于正常细胞,含药血清处理的细胞中 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 及其蛋白表达明显减弱,提示加减驻景方含药血清能够减缓缺氧引起的细胞损害。

先前的研究表明,在高度近视进展过程中脉络膜及视网膜内外层的血供不良而诱导的 HIF-1 α 、VEGF 的产生是 CNV 生成的主要因素,也是脉络膜和视网膜间多种细胞相互作用的结果^[16-18]。本研究基于上述理论进行干预实验,结果表明加减驻景方含药血清可以抑制 RCVECs 的增生,并发现其可能是通过改善细胞的缺血缺氧状态,从而下调细胞中 HIF-1 α 的表达,进一步减少 VEGF 的表达来实现的。本研究中采用的是血清药理学中单一细胞的体外模型实验,但单一的体外细胞实验并不能揭示细胞之间的相互作用。目前,国外已成功地建立了小鼠的脉络膜、RPE 及脉络膜联合组织的新生血管模型,本研究组的进一步研究方向是培养小鼠的脉络膜组织,更好地模拟在体状态下病理性近视的自然病程,观察病理性近视病理改变中各种细胞间的相互作用。

参考文献

- [1] Yoshida T, Ohno-Matsui K, Ohtake Y, et al. Long-term visual prognosis of choroidal neovascularization in high myopia: a comparison between age groups [J]. *Ophthalmology*, 2002, 109(4): 712-719.
- [2] 刘彦江, 张月, 元泽峰, 等. 加减驻景方联合雷珠单抗治疗高度近视性黄斑出血 [J]. *国际眼科杂志*, 2014, 14(2): 313-316. DOI: 10.3980/j. issn. 1672-5123. 2014. 02. 32.
- [3] Liu YJ, Zhang Y, Kang ZF, et al. Modified Zhujing Formula combined with Lucentis in treating macula hemorrhage of pathological myopia [J]. *Int Eye Sci*, 2014, 14(2): 313-316. DOI: 10.3980/j. issn. 1672-5123. 2014. 02. 32.
- [4] 王雨生. 脉络膜新生血管性疾病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 30-43.
- [5] Chen P, Yin H, Wang Y, et al. Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by shRNA targeting HIF-1 α in a mouse model of closed eye contact lens wear [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 864-873.
- [6] Iyer S, Acharya KR. Tying the knot: the cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines [J]. *FEBS J*, 2011, 278(22): 4304-4322. DOI: 10.1111/j. 1742-4658. 2011. 08350. x.
- [7] Coleman AM, Rendon BE, Zhao M, et al. Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma angiogenic potential by macrophage migration

- inhibitory factor and its homolog, D-dopachrome tautomerase [J]. J Immunol, 2008, 181 (4) : 2330-2337.
- [7] Silva R. Myopic maculopathy: a review [J]. Ophthalmologica, 2012, 228 (4) : 197-213. DOI: 10. 1159/00039893.
- [8] Yoon JU, Byun YJ, Koh HJ. Intravitreal anti-VEGF versus photodynamic therapy with verteporfin for treatment of myopic choroidal neovascularization [J]. Retina, 2010, 30 (3) : 418-424. DOI: 10. 1097/IAE. 0b013e3181bd2fe4.
- [9] Wang J, Kang Z. Summary of prognostic factors for choroidal neovascularization due to pathological myopia treated by intravitreal bevacizumab injection [J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012, 250 (12) : 1717-1723. DOI: 10. 1007/s00417-012-2159-5.
- [10] Wang JH, Jiang W, Kang ZF. Reply to: effect of axial length on myopic choroidal neovascularization [J/OL]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 2013, 251 (9) : 2271 [2016-04-20]. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00417-012-2251-x>. DOI: 10. 1007/s00417-012-2251-x.
- [11] 靳福鹏, 张梅, 李平, 等. 益气养阴解毒方含药血清对 Lewis 肺癌细胞增殖及凋亡影响的体外实验 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38 (8) : 866-870. DOI: 10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 08. 004. Jin FP, Zhang M, Li P, et al. Experimental research on effect of medicated serum contained with yiqiyanginjiedu recipe on proliferation and apoptosis of Lewis lung cancer cells *in vitro* [J]. Cancer Res Prevent Treatment, 2011, 38 (8) : 866-870. DOI: 10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 08. 004.
- [12] 亢泽峰, 庄曾渊, 冯俊. 瞳神络病理探微及其研究思路 [J]. 中国临床康复, 2003, 7 (32) : 4402-4403. Kang ZF, Zhuang ZY, Feng J. Investigation of collateral disease theory of the eye [J]. Chin J Clin Rehabil, 2003, 7 (32) : 4402-4403.
- [13] 亢泽峰, 庄曾渊. 瞳神络病病机及其证治探析 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26 (4) : 77-79.
- [14] 栾兆倩, 高健生, 接传红, 等. 密蒙花方对缺氧状态下脐静脉内皮细胞增殖及 HIF-1 α 表达的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2011, 21 (1) : 4-7. Luan ZQ, Gao JS, Jie CH, et al. Effects of Buddleia Decoction on the proliferation of HUVEC and the expression of HIF-1 α in HUVEC in hypoxia state [J]. J Trad Radit Chin Ophthal, 2011, 21 (1) : 4-7.
- [15] 李景恒, 黄萍, 詹宇坚, 等. 三七和丹参对视网膜新生血管化小鼠血管内皮细胞生长因子的影响 [J]. 中国临床康复, 2005, 9 (30) : 96-97. Li JH, Hung P, Zhan YJ, et al. Effects of sanchi and dan-shen root on the vascular endothelial growth factors in mice with retinal neovascularization [J]. Chin J Clin Rehabil, 2005, 9 (30) : 96-97.
- [16] 张庆, 田楠楠, 亢泽峰, 等. 加减驻景方对实验性脉络膜新生血管的作用研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 2013, 23 (2) : 79-82. Zhang Q, Tian NN, Kang ZF, et al. Study of choroidal neovascularization treated by administration with modified Zhujing Formula [J]. Chin J Clin Ophthalmol, 2013, 23 (2) : 79-82.
- [17] 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 [J]. 国际眼科杂志, 2013, 13 (8) : 1525-1528. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2013. 08. 03. 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 [J]. Int Eye Sci, 2013, 13 (8) : 1525-1528. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2013. 08. 03.
- [18] Shao Z, Friedlander M, Hurst CG, et al. Choroid sprouting assay: an *ex vivo* model of microvascular angiogenesis [J/OL]. PLoS One, 2013, 8 (7) : e69552 [2015-07-23]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069552>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0069552.

(收稿日期: 2016-08-18)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)

消息

我国第三代电子化、智能化、去镜化《立体视觉检查图》正式出版

颜少明教授编著的第三代《立体视觉检查图》全新升级版于近日由人民卫生出版社正式出版发行。

该图第 1 版是由解放军海军总医院颜少明教授和中国科学院生物物理研究所郑竺英教授合作、于 1985 年率先研制出版的我国第一部随机点《立体视觉检查图》，并在全国广泛应用，开辟了一个新的领域。该图备受青睐，现已成为国内眼科经典权威力作。2004 年，第二代《数字化立体视觉检查图》问世，该图于 2006 年出版英文版，从而走向国门。2013 年，颜少明教授及其团队应用 21 世纪 3D 高科技前沿技术，从优化随机点矩阵视差像素核心结构着手；从优化载体手段着眼，超常量增扩视差像素，大幅度提高了视差信息刺激的正能量；超常量量化伪装像素，降低 70% 以上噪声；从 10/16 多视点采集信息，扩大深度视野范围；应用现代电子数码 3D 光栅载体技术；研制成我国第三代《立体视觉检查图》全新升级版。该图包括大视野立体盲检查图和低噪声立体视锐度检测图，彻底告别了 3D 眼镜的束缚和困扰，乘上了电子化、智能化、去镜化的时代快车。该图领先当今备受国际推崇的、问世于 20 世纪 80 年代的 TNO、Randot、Lang 和 Titmus 等经典权威版本，拥有自主创新的独立知识产权，并获得国家发明专利。

立体视觉又称三维视觉，是人的高级视觉功能——双眼视觉的最高形式，在视觉功能评价体系中举足轻重，是眼科一项不可或缺的重要常规检查。普及高端的立体视觉功能检查，优化视觉功能评价体系的内涵，提升评价视觉品质的维度，促进干预立体盲工作的开展迫在眉睫。该图着眼构建一个立体视觉检测的新平台，首先用于各种斜弱视等多种眼病的诊断和疗效评估；选拔飞行员、司机等特殊职业人员、学龄前儿童立体视觉（检查）普查；它是眼科临床、教学、科研具有极高应用价值的重要工具。我国著名的视觉科学家、中华医学会眼科学分会副主任委员瞿佳教授在本图的序言中指出：普及推广立体视觉检查成为我国一个亟待解决的重要课题。

本图册 5 万余字，大 16 开，精装，定价：2 280.00 元，全国各大新华书店、医药书店、当当网（www.dangdang.com.cn）、卓越亚马逊网（www.amazon.cn）均有销售，也可登录人卫智慧服务商城（<http://www.pmphall.com>）或人民卫生出版社天猫旗舰店（<http://sxrwts.tmall.com>），或联系人民卫生出版社销售部刘佳直接购买，联系电话：13910668535、010-59787226。

(人民卫生出版社)