

杞黄颗粒对实验性脉络膜新生血管中 HIF-1 蛋白含量及基因表达的干预研究

王莹莹¹, 梁凤鸣¹, 王莉¹, 王燕², 黎红梅¹, 全颖¹, 关玉双¹

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津, 300193;

2. 广东省中医院, 广东 广州, 510530)

[摘要] 目的:通过缺氧诱导因子(HIF-1)蛋白含量及基因的表达探讨杞黄颗粒对脉络膜新生血管(CNV)发生发展过程的作用机制。方法:健康雄性BN大鼠81只,随机选取13只作为空白对照组,另68只右眼通过激光光凝方式建立CNV模型。光凝7d后随机选取3只检验造模是否成功,余下65只随机分为5组:模型对照组、杞黄颗粒A组、杞黄颗粒B组、雷珠单抗组、杞黄颗粒+雷珠单抗组,各13只。治疗结束后,除杞黄颗粒B组在治疗的第90天处死,其余组大鼠均在治疗的第60天心脏灌注处死,取右眼制作标本,采用Western blotting和RT-PCR检测HIF-1的蛋白含量及mRNA表达。结果:模型大鼠于激光后第7天OCT检查可见视网膜色素上皮复合层不连续,局部增厚,反射增强,界限不清,眼底荧光血管造影检查显示出少量圆盘状荧光渗漏,表明造模成功。与空白对照组比较,模型对照组HIF-1蛋白和其mRNA的表达趋势一致,均有上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HIF-1蛋白表达量,模型对照组明显高于杞黄颗粒+雷珠单抗组,差异有统计学意义($P < 0.01$);杞黄颗粒A组、雷珠单抗组、模型对照组组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);杞黄颗粒B组与A组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HIF-1mRNA表达,模型对照组明显高于雷珠单抗组、杞黄颗粒+雷珠单抗组,杞黄颗粒A组表达高于雷珠单抗组和杞黄颗粒+雷珠单抗组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);杞黄颗粒+雷珠单抗组优于雷珠单抗组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);杞黄颗粒B组与A组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:杞黄颗粒联合雷珠单抗在抑制CNV中下调HIF-1蛋白含量及基因表达效果较单纯应用杞黄颗粒更加稳定,长期应用杞黄颗粒对抑制CNV有临床意义,其作用机制可能与下调HIF-1因子有关。

[关键词] 脉络膜新生血管;黄斑变性;BN大鼠;杞黄颗粒;HIF-1;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.08.081

Interventional effect of Qihuang granules on protein and mRNA expression of hypoxia-inducible factor-1 in experimental choroidal neovascularization

WANG Ying-ying¹, LIANG Feng-ming¹, WANG Li¹, WANG Yan²,
LI Hong-mei¹, QUAN Ying¹, GUAN Yu-shuang¹

(1. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510530, Guangdong, China)

Abstract: Objective: To investigate the mechanism of action of Qihuang granules in choroidal neovascularization (CNV) by measuring the protein and mRNA expression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Methods: A total of 81 healthy male BN rats were selected, among which 13 were randomly selected as blank control group and 68 were treated with laser photocoagulation for the right eye to establish a model of CNV. After 7 days of photocoagulation, 3 rats were randomly selected to evaluate whether the model was successfully established; the remaining 65 rats were randomly divided into model control group, Qihuang granule group A, Qihuang granule group B, ranibizumab group, and Qihuang granule + ranibizumab group, with 13 rats in each group. After the treatment ended, the rats in the Qihuang granule group B were sacrificed on day 90 of treatment, and the other rats were sacrificed on day 60 of treatment by cardiac perfusion. The right eye was collected, and Western blot and RT-PCT were used to measure the protein and mRNA expression of HIF-1. Results: On day 7 after laser photocoagulation, the rats in the model showed discontinuity, local thickening, enhanced reflex, and un-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81373694)

第一作者:王莹莹,女,2015级硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗眼底病

通讯作者:梁凤鸣,男,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合防治眼底病, E-mail: liangfm66@163.com

clear boundaries of the retinal pigment epithelium on optical coherence tomography and a small amount of disc - shaped fluorescence leakage on fundus fluorescein angiography, suggesting that the model was successfully established. Compared with the blank control group, the model control group had significant increases in the protein and mRNA expression of HIF - 1 ($P < 0.05$). The model control group had significantly higher protein expression of HIF - 1 than the Qihuang granule + ranibizumab group ($P < 0.01$); there was no significant difference between the Qihuang granule group A, the ranibizumab group, and the model control group ($P > 0.05$), while there was a significant difference between the Qihuang granule group B and the Qihuang granule group A ($P < 0.05$). The model control group had significantly higher mRNA expression of HIF - 1 than the ranibizumab group and the Qihuang granule + ranibizumab group, and the Qihuang granule group A had significantly higher expression than the ranibizumab group and the Qihuang granule + ranibizumab group ($P < 0.05$); the Qihuang granule + ranibizumab group had slightly better results than the ranibizumab group ($P > 0.05$); there was a significant difference between the Qihuang granule group B and the Qihuang granule group A ($P < 0.05$). Conclusion: Compared with Qihuang granules alone, Qihuang granules combined with ranibizumab has a more stable effect in downregulating the protein and mRNA expression of HIF - 1 to inhibit CNV. Long - term application of Qihuang granules has a certain clinical effect in inhibiting CNV, possibly by downregulating HIF - 1.

Key words: choroidal neovascularization; macular degeneration; BN rat; Qihuang granule; hypoxia - inducible factor - 1; experimental study

年龄相关性黄斑变性(Age - related Macular Degeneration, AMD)又称为黄斑变性,研究显示 AMD 已经成为年龄 50 岁以上人群引起视力丢失的首要原因^[1]。临床上 AMD 分为萎缩型(干性)和新生血管型(湿性或渗出性),虽然新生血管型 AMD 的发病率低于萎缩型,但却造成了 AMD 患者中 80% 以上的视力损失。脉络膜新生血管(Choroidal Neovascularization, CNV)的形成以 RPE 脱离或盘状纤维化为病理特点^[2]。随着全球人口老龄化趋势的发展,继发于 AMD 的 CNV 对患者生活质量和经济问题的影响,逐渐成为一个严重的医学 - 社会问题^[3]。本实验采用 YAG 激光制备 BN 大鼠 CNV 模型,观察杞黄颗粒对大鼠模型的影响,探讨杞黄颗粒对 CNV 中 HIF - 1 蛋白含量及基因表达的影响。现报告如下。

1 实验材料

1.1 动物 雄性、健康 Brown Norway (BN) 大鼠 100 只,体重 200 ~ 250g,鼠龄 9 ~ 10 周,北京华阜康公司提供,生产许可证号: SCXK (京) 2012 - 0001,使用许可证号: SYXK (津) 2014 - 0002。实验前检查无眼前节、眼后段病变。

1.2 药物及试剂 杞黄颗粒(处方组成主要成分:枸杞 10g、楮实子 10g、茺蔚子 10g、丹参 10g 等。功效:补益肝肾,祛瘀明目。江苏江阴天江药业有限公司生产,批号:1612350);雷珠单抗注射液(Lucentis, Genentech 公司);复方托品酰胺滴眼液(沈阳兴齐制药厂);若丹明标记的蓖麻子凝集素(美国 Vector);Trizol 试剂(美国 Gibco 公司);RT - PCR 引物、HIF - 1 抗体、HIF - 1 α 引物均购自 Proteintech 公司。

1.3 主要仪器 532nm 倍频 Nd:YAG 激光器(法国 Quantel medical 公司);汉密尔顿注射器(生产厂家:罗马尼亚,批号:87930/00);凝胶成像系统(美国 Alpha innotech 公司);荧光素眼底血管造影(Fundus Fluorescein Angiography, FFA)和吲哚菁绿血管造影(Indocyanine Green Angiography, ICGA)摄像

机(德国 Heidelberg 公司);LV100 激光共焦显微镜(日本 Olympus 公司);紫外分光光度计(HITACHI 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI7500real - time PCR system);蔡司 200 眼科手术显微镜(德国蔡司公司);MetaMorph/DP10/BX41 显微图像分析系统(日本 Olympus 公司)。

2 实验方法

2.1 动物模型建立 81 只 BN 大鼠随机选取 13 只做为空白对照组。其余 68 只为造模组,通过激光光凝方式建立 CNV 模型。1% 戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉,右眼复方托吡卡胺充分散瞳后,滴用医用透明质酸钠凝胶,通过裂隙灯和载玻片将倍频 532 激光导入大鼠眼内。避开大血管,围绕视盘约 1.5 ~ 3PD 均匀光凝约 10 个点。以光凝后有气泡产生为度,表示已击破 Bruch 膜。具体参考文献[4],预实验后,设置 532nm 倍频 Nd YAG 激光器参数:532nm 波长,曝光时间 0.05s,光斑为 50 μ m,能量 300mw。

2.2 分组与给药

2.2.1 分组 造模后第 7 天,68 只造模大鼠随机抽取 3 只进行 OCT、FFA、共聚焦检测,剩余 65 只随机分为 5 组并开始用药观察,分别为模型对照组、杞黄颗粒 A 组、杞黄颗粒 B 组、雷珠单抗组、杞黄颗粒 + 雷珠单抗组,各 13 只。

2.2.2 给药方法 空白对照组、模型对照组予 0.9% 氯化钠注射液灌胃,每天 1 次;杞黄颗粒组予杞黄颗粒灌胃,每天 1 次;雷珠单抗组予雷珠单抗玻璃体内注射,每月 1 次,共 3 次;杞黄颗粒 + 雷珠单抗组予杞黄颗粒灌胃,每日 1 次,同时予雷珠单抗玻璃体内注射,每月 1 次。雷珠单抗玻璃体内注射方法:BN 大鼠腹腔麻醉后,右眼托比卡胺滴眼液散瞳,然后用汉密尔顿注射器抽取雷珠单抗 3 μ L,距角膜缘 1.0mm 左右,显微镜下透过瞳孔约可看到针头,刺入玻璃体内,并确认药物注入玻璃体内^[5]。注射中不损伤晶状体及视网膜,经过试验,确定使用汉密尔顿注射器行玻璃体

腔注药。

2.3 指标检测

2.3.1 光学相干断层扫描 (OCT) 和眼底荧光血管造影 (FFA) 造模后 7d, 随机选取 3 只大鼠麻醉后散瞳, 造模眼行视网膜光凝区水平和垂直线扫, 每只眼睛重复 5 次。随后腹腔内注射 10% 荧光素钠注射液 1 mL/kg, 立即通过德国海德堡眼底血管造影仪连续观察。OCT 检查采用视网膜颞侧后极部和视盘中心连线的直线横向线性扫描, 长度 2.8 mm, 深度 2 mm, 观察 CNV 渗漏情况。

2.3.2 RPE-脉络膜-巩膜铺片检测 CNV 的面积 OCT 和 FFA 检测后的 3 只大鼠过量麻醉, 经心脏灌注 400 mL 0.9% 氯化钠注射液和 400 mL 4% 多聚甲醛, 处死, 摘除右眼球, 在 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 然后置 PBS 中 2 h。显微镜下去除角膜、晶状体和视网膜神经感觉层。在剩余的视网膜色素上皮 (Retinal Pigment Epithelial, RPE)-脉络膜-巩膜复合体做 6~8 个放射状切口, 展平。整个过程力求无菌。将铺片置于 1% TritonX-100 中室温放置 24 h, 接着与若丹明标记的蓖麻子凝集素 (1:1000) 在室温下避光孵育 24 h。最后于 TBS 缓冲液中避光洗涤 24 h。将铺片在载玻片上展平, 水性封片剂封片后激光共聚焦显微镜下观察并拍照。可见簇状高荧光, 红色荧光区域为 CNV 区域, 红色区域大于 1/2, 可视为 CNV 形成^[6]。

2.3.3 Western blotting 检测 HIF-1 蛋白表达 治疗结束后, 除杞黄颗粒 B 组灌胃治疗 90 d 处死, 其余组灌胃治疗 60 d 处死, 摘取右眼球, RPE-脉络膜-巩膜复合体分析用药后各组蛋白表达。提取蛋白, BCA 法蛋白定量, 电泳, ECL 显色系统压片, 洗片后扫描。以 β -tubulin 作为内参照。LabWorks™ 凝胶成像及分析系统进行摄像, 以各组 HIF-1 蛋白条带与其相应内参照条带的灰度值比值作为 HIF-1 蛋白表达的相对量^[7]。比较造模组各组 60 d, 杞黄颗粒组 60 d 和 90 d 的 HIF-1 蛋白表达量差异。

2.3.4 RT-PCR 检测 HIF-1 mRNA 表达 摘取右眼球, 分离 RPE-脉络膜-巩膜复合体。提取总 RNA 后逆转录合成 cDNA, cDNA 为模板进行 PCR 扩增。根据 HIF-1、 β -actin 的基因信息, 运用 Primer Premier 5.0 软件, 设计上下游引物扩增 HIF-1、 β -actin 的部分 CDS。HIF-1-S: 5'-CCGAGGCCCCACTAAAGG3', HIF-1-AS: 5'GCTGTTGAAGTC-

ACAGGAGACAA3'。PCR 产物长度应为 306 bp。 β -actin-S: 5'-GCTATTTGGCGCTGGACTT3'。 β -actin-AS: 5'-GCGGCTCGTAGCTCTTCTC3'。PCR 产物长度应为 78 bp。取 2 μ g RNA 运用 Promega MMLV 逆转录酶 (Cat No: 9PIM170) 及相关试剂进行逆转录反应, 取 0.5 μ L RT 产物运用 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa) 进行实时定量 PCR 反应。数据处理: $\text{Fold} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。以各组 HIF-1 的 RT-PCR 产物条带与其相应的 β -actin 的 RT-PCR 产物条带的光密度比值作为 HIF-1 mRNA 表达的相对量^[8]。比较造模组各组 60 d, 杞黄颗粒组 60 d 和 90 d HIF-1 mRNA 表达量的差异。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件包建立数据库并进行数据分析。计量资料数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用完全随机设计方差分析。杞黄颗粒 A 组和杞黄颗粒 B 组比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

3 实验结果

3.1 激光损伤 BN 鼠 CNV 模型 围绕视乳头, 避开视网膜周围血管, 距离视乳头边缘约 2 个视盘距离可见光损伤点, 均匀分布于 4 个象限之中, 激光光凝区域可见网膜色泽灰白, 激光斑周围网膜局部水肿^[9], 视网膜神经上皮增厚, RPE 层不连续, 局部增厚, 反射增强, 界限不清。(见图 1)

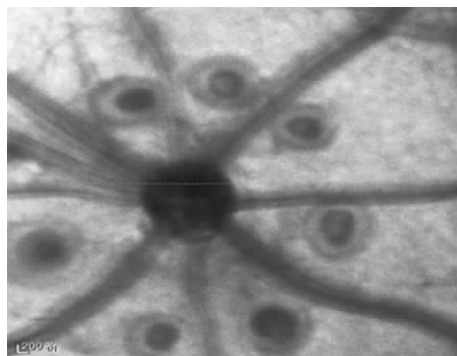


图 1 OCT 观察视盘周围光凝

3.2 CNV 形成检验 造模组随机挑选 3 只, 与空白对照组 3 只一同处死, 激光共聚焦显微镜检测 RPE-脉络膜-巩膜复合体标本铺片 CNV 面积 (见图 2.1)。造模组每组各选取 3 只大鼠麻醉后散瞳, 造模眼行荧光素眼底血管造影 (FFA) FFA 晚期伴有荧光素渗漏 (见图 2.2、2.3)。

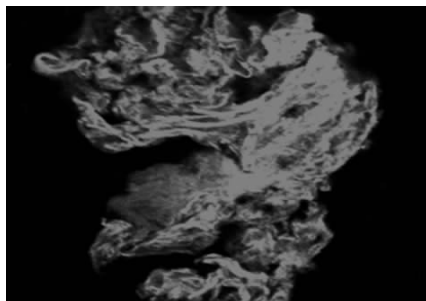


图 2.1 激光共聚焦检测 CNV

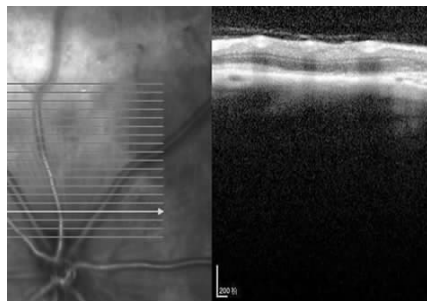


图 2.2 OCT 检查眼底所见
图 2 CNV 形成检验

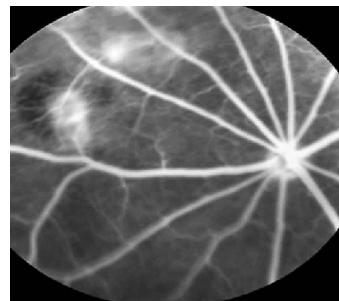


图 2.3 FFA 示 CNV 渗漏情况

3.3 用药观察 60d 后各组 HIF-1 蛋白表达情况比较 各组 HIF-1 的蛋白表达水平用空白对照组样本内的各目的基因与内参 β -tublin 的相对表达量标准化,得模型对照组、杞黄颗粒 A 组、雷珠单抗组、杞黄颗粒+雷珠单抗组样本中各蛋白的相对表达量。与空白对照组比较,模型对照组 HIF-1 蛋白含量明显降低,差异有统计学意义,说明激光模型增强 HIF-1 蛋白表达量;杞黄颗粒+雷珠单抗组与模型对照组差异有统计学意义,说明杞黄颗粒+雷珠单抗组下调 HIF-1 蛋白高表达优于模型对照组;杞黄颗粒 A 组、雷珠单抗组、模型对照组的组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。(见表 1,图 3)

表 1 用药观察 60d 后各组 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 HIF-1 蛋白含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	蛋白含量
空白对照组	13	0.8646 $\pm$ 0.4788 ^a
模型对照组	13	1.2937 $\pm$ 0.8572
杞黄颗粒 A 组	13	1.0704 $\pm$ 0.5756
雷珠单抗组	13	0.8858 $\pm$ 0.5061
杞黄颗粒+雷珠单抗组	13	0.6037 $\pm$ 0.4473 ^a

注:与模型对照组比较,^a $P<0.05$ 。

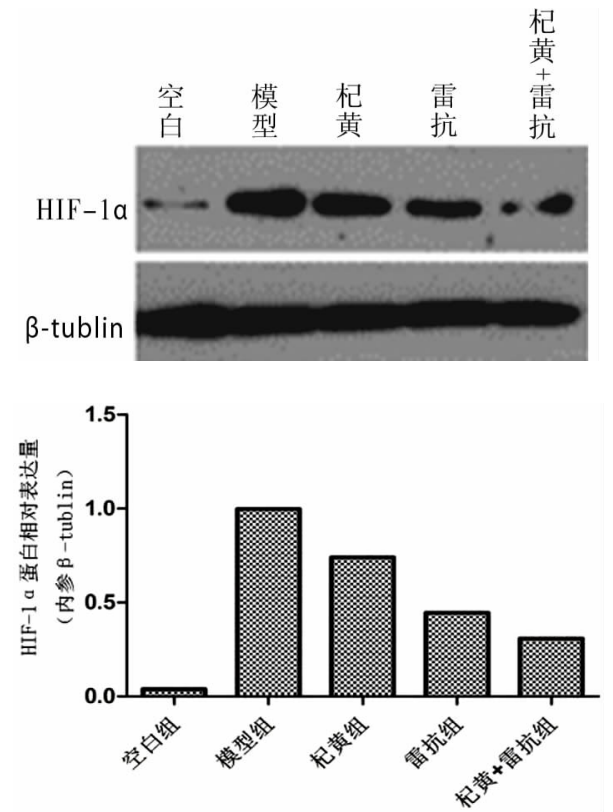


图 3 用药观察 60d 后各组复合体中 HIF-1 的蛋白含量

3.4 杞黄颗粒治疗 60d 和 90d 后 HIF-1 蛋白表达情况比较 杞黄颗粒 A 组(60d)与 B 组(90d)HIF-1 蛋白含量分别为(0.5856 $\pm$ 0.211)、(0.3629 $\pm$ 0.2321),差异有统计学

意义($P<0.05$),可以认为杞黄颗粒组 90d 效果优于 60d。(见图 4)

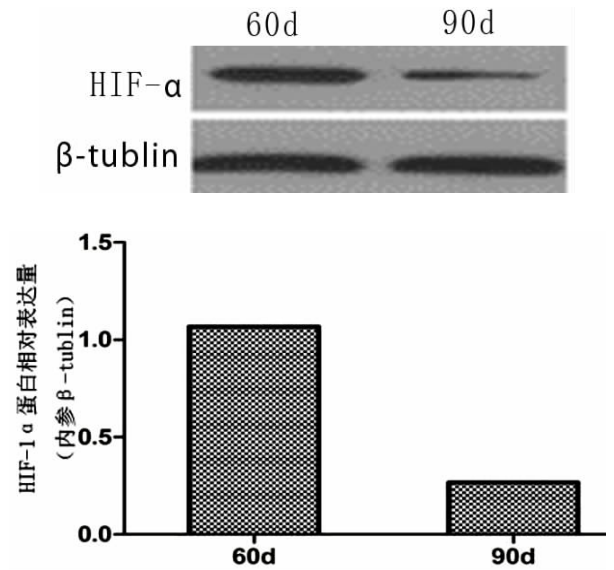


图 4 用药观察 60d 和 90d 复合体中 HIF-1 的蛋白含量

3.5 用药观察 60d 后各组 HIF-1 mRNA 表达情况比较 各组 HIF-1 mRNA 表达水平用空白对照组样本内的各目的基因与内参 β -actin 的相对表达量标准化,得出空白对照组样本内各目的基因的相对 mRNA 表达量为 1 时,模型对照组、杞黄颗粒组、雷珠单抗组、杞黄颗粒+雷珠单抗组样本中各目的基因的 mRNA 相对表达量。与空白对照组比较,模型对照组 HIF-1 mRNA 表达显著上升,差异有统计学意义;与模型对照组比较,3 组治疗组 HIF-1 mRNA 表达均下降,差异均有统计学意义;雷珠单抗组及杞黄颗粒+雷珠单抗组下调 HIF-1 优于杞黄颗粒 A 组,差异有统计学意义;杞黄颗粒+雷珠单抗组差异无统计学意义。(见表 2)

表 2 用药观察 60d 后各组 HIF-1 mRNA 表达情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	mRNA
空白对照组	13	1.00 $\pm$ 0.00
模型对照组	13	3.554 $\pm$ 0.8577 ^a
杞黄颗粒 A 组	13	2.3243 $\pm$ 0.6705 ^b
雷珠单抗组	13	1.603 $\pm$ 0.4307 ^{bc}
杞黄颗粒+雷珠单抗组	13	1.318 $\pm$ 0.2839 ^{bcd}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与杞黄颗粒 A 组比较,^c $P<0.05$;与雷珠单抗组比较,^d $P>0.05$ 。

3.6 杞黄颗粒组治疗 60d 和 90d 后 HIF-1 mRNA 表达情况比较 杞黄颗粒 A 组(60d)和 B 组(90d)HIF-1 mRNA 表达分别为(819.25 $\pm$ 308.805)、(588.23 $\pm$ 451.467),2 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),杞黄颗粒 B 组对 HIF-1 mRNA 下调优于杞黄颗粒 A 组。(见图 5)

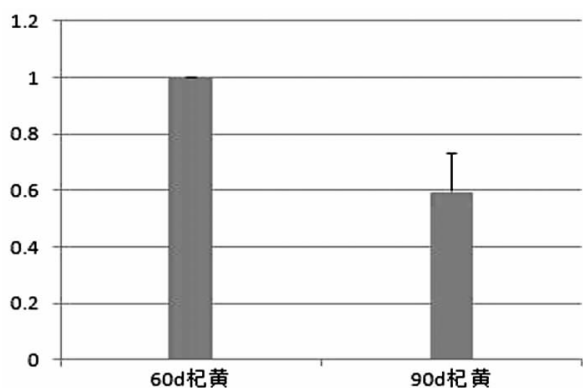


图5 用药观察 60d 与 90d 杞黄组 HIF-1 mRNA 表达

4 讨 论

YAG 激光光凝损伤视网膜及脉络膜,在各种刺激因子作用下,诱导产生的 BN 大鼠视网膜下 CNV,这与人类 AMD 的 CNV 发生机制和过程是完全不相同的^[10],一是激光损伤后瘢痕的再修复过程,一是老年性的退行性病变,但二者最终均形成病理产物 CNV,且 CNV 中均有多种相同细胞因子的表达。笔者前期采用 YAG 激光成功复制了 BN 大鼠的 CNV 模型,为本次实验的成功奠定了基础,在此基础上我们运用 Western blotting 和 PCR 检测 HIF-1 的蛋白含量及基因表达,对于揭示 CNV 的发生机制,进而防治 CNV 性疾病具有重要意义。虽然眼内新生血管的发病机制尚未研究清楚,但普遍认为缺血缺氧、炎症以及衰老等均可成为 CNV 的始动因素,CNV 发生过程中,RPE 细胞起着重要的调控作用^[11]。RPE 参与视黄醇循环^[12],是运输养分、产生生长因子以及吞噬坏死的光感受器的重要支持组织,在正常生理状态下,RPE 层构成了视网膜的外屏障,而在缺血缺氧环境下 RPE 细胞通过增加 HIF-1 α 和血管内皮生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 的表达^[13],促进 CNV 发生及发展。

HIF-1 是缺氧反应中一个重要的转录调节因子,HIF-1 在缺氧反应中扮演着重要的角色,在正常的氧环境下,HIF-1 α 蛋白可被迅速降解^[14],微环境中无论是慢性还是急性缺氧(氧含量 < 5%),HIF-1 对缺氧刺激特异感受、持续性累积,参与缺氧诱导 VEGF 等基因的表达,可引起血管生成等一系列病理反应^[15]。HIF-1 这种诱导 VEGF 高表达的机制在缺氧性视网膜病变中被认为是主要的调控机制^[16]。

临床上玻璃体腔内注入抗 VEGF 药物靶向抑制新生血管继续形成和渗漏的疗效被广泛肯定。目前,临床所用药物的安全性和有效性得到一致肯定的雷珠单抗,它是 2 代人源化的抗 VEGF 重组鼠单克隆抗体片段,对人体组织所有具有生物学活性的 VEGF-A 异构体都有广泛的亲和力,能抑制 VEGF-A 异构体与同源受体结合,从而阻断一系列的异常级联反应,起到抑制新生血管的作用。玻璃体腔注射抗 VEGF 药物为 CNV 的治疗打开了新的大门,随着玻璃体腔

内注射次数的增加,眼内炎、视网膜脱离、青光眼等并发症也随之而来^[17]。因此抗 VEGF 药物的长期效果和安全性尚待进一步证实。

中医学中无老年性黄斑变性的记载,根据其临床症状,可归于“视直如曲”“暴盲”等疾病范畴。中医学理论中对 AMD 无论从年龄或从慢性退行性病来辨证,均应辨为虚证^[18]。CNV 是由于眼底缺血缺氧而造成,而缺血、缺氧在中医理论中与虚证关系极为密切,新生血管的形成及渗出、出血等有形之物虽属痰、湿、瘀、热等“实邪”^[19],但本质上是由气虚、血虚、阴虚等虚证所致,从全身的角度看,虚证的情况并没有改变。庄曾渊认为湿性 AMD 属于目系疾病,后期多久病致虚或瘀而致虚,虚者多从肝肾论治^[20]。陆绵绵提出在治疗湿性 AMD 时如全身证候中有明显的脾虚,治疗以健脾为主^[21],若脾虚不明显,一般应以滋养肝肾、平补气血为主。中医学中普遍认为目系病后期肝肾不足也多是肝病及肾的结果^[22]。结合现代解剖,RPE-脉络膜-巩膜复合体等组织是湿性黄斑变性的病位,这里富有心之血脉,肾之黑色素。中医眼科五轮学说认为眼底黄斑部深存于瞳神之中,瞳神属肾,统归水轮,即黄斑归属肾水,肝肾同源,因此黄斑部病变与肝肾有关。综上,肝肾亏虚是其本,局部所表现的黄斑出血、水肿、渗出为其标,本病多为本虚标实,虚实夹杂。治疗上从滋补肝肾、调理肝肾关系入手。

杞黄颗粒由枸杞、楮实子、茺蔚子、丹参等组成,功能补益肝肾、活血明目。枸杞,归肝肾二经,滋补肝肾,益精明目,为平补肾精肝血之品;楮实子归肝肾二经,滋肾清肝,明目利尿,善补肝肾之阴;茺蔚子归心包、肝经,活血调经,清肝明目;丹参归心肝经,活血调经,祛瘀止痛,凉血消痈,除烦安神。本品善通行血脉,广泛用于各种瘀血病证。

本实验研究结果显示,就 Western blotting、PCR 检测值分析,杞黄颗粒+雷珠单抗组与模型对照组及杞黄颗粒用药 90d 组和用药 60d 组均有显著性意义;杞黄颗粒+雷珠单抗组,杞黄颗粒 90d 组和 60d 组均有显著性意义。本次实验中,雷珠单抗与模型对照组蛋白表达上无显著性差异可能与具体作用机制不同有关,考虑为雷珠单抗主要作用于抑制 VEGF-A 异构体与同源受体结合,并不是针对于 HIF-1。虽然本次实验统计学显示杞黄颗粒组与模型对照组及雷珠单抗组无明显差异,但是杞黄颗粒+雷珠单抗组效果优于其他各组,说明杞黄颗粒在长期用药过程中可以改善 CNV 局部缺血缺氧状态,使局部血脉通畅。结合 Western blotting 和 PCR 的蛋白及基因统计学结果,我们认为,杞黄颗粒+雷珠单抗组在抑制大鼠 CNV、下调 HIF-1 蛋白含量及基因表达,联合治疗效果优于其他组,杞黄颗粒 90d 组较杞黄颗粒 60d 组药效更为明显,也为杞黄颗粒长期应用于临床提供了一个证据。

研究表明晚期萎缩性 AMD 可发展为湿性 AMD 或二者共存。我们前期的研究中证实杞黄颗粒在治疗肝肾阴虚型

AMD 中,干性有效率为 88.64%^[23],近期研究中我们初步证明杞黄颗粒可以抑制 BN 大鼠新生血管的发生、发展,下一步将继续观察杞黄颗粒对 RPE 细胞的信号通路以及 HIF-1 在 CNV 局部分化是否有影响,从而进一步通过研究揭示杞黄颗粒防治 CNV 的作用机制。随着研究的进一步进行,我们期待中西医结合治疗可以有效地减少玻璃体腔内注射次数,由此带来的长期疗效,并能有效减少并发症的发生,起到延缓抑制 CNV 的后续发展。

参考文献

- [1] 李娜,孙先勇. 年龄相关性黄斑变性的发病机制及治疗研究现状[J]. 中国全科医学,2016(6):724-728,732.
- [2] 李文娟,彭清华. 年龄相关性黄斑变性的病因学研究进展[J]. 国际眼科杂志,2011(9):1558-1560.
- [3] 龚斌,范传峰,王玉. 抗 VEGF 药物(雷珠单抗)治疗不同病程湿性年龄相关性黄斑变性 62 例[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2014(5):58-61.
- [4] 聂闯,罗灵,张卯年. 年龄相关性黄斑变性的动物模型[J]. 解放军医学院学报,2015(3):294-298.
- [5] Xu J, Wang Y, Li Y, et al. Inhibitory efficacy of intravitreal dexamethasone acetate loaded PLGA nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser induced rat model[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2007, 23(6):527-540.
- [6] Berglin L, Sarman S, Van der Ploeg I, et al. Reduced choroidal neovascular membrane formation in matrix metalloproteinase-2-deficient mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003(44):403-408.
- [7] Mimura T, Amano S, Usui T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in corneal lymphangiogenesis[J]. Exp Eye Res, 2001, 72(1):71-78.
- [8] 廖新波,唐慰萍,赵颖海,等. 5 核苷酸酶碱性磷酸酶双重染色法在毛细淋巴管研究中的应用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,1996,5(2):184-187.
- [9] 杨秀梅,王雨生. 脉络膜新生血管动物模型[J]. 国际眼科纵览,2006,30(3):166-170.
- [10] Ciulla TA, Cirswell MH, Danis RP, et al. Intravitreal itramcinolone acetate inhibits choroidal neovascularization in a laser-treated rat model[J]. Arch Ophthalmol, 2001(119):399-404.
- [11] 黄冰林,丁淑华,杭丽,等. 枸杞提取物及其成分叶黄素/玉米黄质在体内外对年龄相关性黄斑变性防治的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2013(4):531-537.
- [12] Meijer TW, Kaanders JH, Span PN, et al. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(20):5585-5594.
- [13] Wang Z, Dillon J, Gaillard ER. Antioxidant properties of melanin in retinal pigment epithelial cells[J]. Photochem Photobiol, 2006(82):474-479.
- [14] 蔡春梅,孙葆忱,刘旭阳. 短发夹 RNA 对人视网膜色素上皮细胞 VEGF 表达的抑制[J]. 中华眼科杂志,2006,42(4):334-337.
- [15] Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, et al. Review: hypoxia-inducible factor-1(HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions[J]. J Interferon Cytokine Res, 2005, 25(6):297-310.
- [16] 赵炜. HIF-1 α 在缺氧诱导的体外脉络膜新生血管生成中的调控作用[D]. 西安:第四军医大学,2008.
- [17] Ueta T, Yanagi Y, Tamaki Y. Cerebrovascular accidents in ranibizumab[J]. Ophthalmology, 2009, 116(2):362.
- [18] 侯乐,唐由之,梁丽娜. 补肾益精方对干性年龄相关性黄斑变性动物模型骨髓来源干细胞动员的影响[J]. 中国中医眼科杂志,2017(1):3-7.
- [19] 牛宝华,唐林,腾薇,等. 化瘀明目丸联合光动力治疗湿性老年性黄斑变性的临床研究[J]. 中医药导报,2016(3):63-65.
- [20] 盛倩,庄曾渊. 庄曾渊从精气血津液辨证分期论治老年性黄斑变性的经验[J]. 世界中西医结合杂志,2015(5):610-612,616.
- [21] 孙化萍,陆绵绵. 陆绵绵教授内眼病中西医结合点探索[J]. 中国中医眼科杂志,2012(6):438-439.
- [22] 李瑜,刘铮,郭泽莉,等. 黄斑方剂治疗老年性黄斑变性 166 例 282 只眼疗效观察[J]. 中药材,2013(12):2062-2064.
- [23] 梁凤鸣,王莉,黎红梅,等. 基于肝肾亏虚理论的年龄相关性黄斑变性的中医药研究现状[J]. 陕西中医药大学学报,2016(6):142-146.

(收稿日期:2018-01-02)

肩关节损伤防治(三)

注意保护颈椎 颈椎和肩关节关系密切,非常多的肌肉同时连接颈椎和肩关节使其相互影响。颈椎不好,肩关节也会连带出问题,反之肩关节问题也会牵连颈椎。所以在日常生活中,在保护肩关节的同时也要注意保护颈椎。

肩部保暖很重要 肩关节保暖尤其重要。肩周炎在中医上又称“漏肩风”,这个名词形象地说明了肩关节感受风寒后易感不适。现代医学认为关节受凉后会导致肌肉韧带挛缩硬化,关节黏滞,活动不利,容易导致损伤,一旦受凉,症状会加重,也更容易受伤。避免关节受凉,生活中要避免晚上睡觉时受凉,冬天可围围巾、穿高领毛衣来保护肩关节。(http://www.cntcm.com.cn/yskp/2018-07/09/content_46727.htm)