

## 凉血活血药物对氧诱导小鼠视网膜新生血管实验中 HIF-1 和 NF- $\kappa$ B 的影响

马 珊<sup>1)</sup>, 王明芳<sup>2)</sup>

(1) 云南中医学院第一附属医院眼科, 云南昆明 650021); 2) 成都中医药大学附属医院眼科, 四川成都 610072)

**[摘要]** **目的** 探讨凉血活血药物对视网膜新生血管的干预及其作用机理. **方法** 通过氧诱导 C57BL/6 幼鼠的方法建立视网膜新生血管的动物模型. 随机分为正常对照组、模型对照组、凉血活血药物高、低剂量组. 计数视网膜切片中突破血管内界膜的内皮细胞核数; 免疫组织化学检测 HIF-1 和 NF- $\kappa$ B 在视网膜中的表达情况. **结果** 氧诱导后, 幼鼠血管内皮细胞核数目明显增加, HIF-1、NF- $\kappa$ B 明显上调, 与正常对照组比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示视网膜新生血管动物模型成功; 各治疗组血管内皮细胞核数目减少、HIF-1、NF- $\kappa$ B 下调, 与模型组比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 提示凉血活血药物对视网膜新生血管有抑制作用. **结论** 凉血活血药物可抑制视网膜新生血管的形成.

**[关键词]** 视网膜新生血管; 凉血活血; HIF-1; NF- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R774.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 10 - 0019 - 04

## Effects of Liangxuehuoxue Drugs on Hyperoxia Induced Retinal Neovascular HIF-1 and NF- $\kappa$ B Expression in Mice

MA Shan<sup>1)</sup>, WANG Ming-fang<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Ophthalmology, The 1st Affiliated Hospital of Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650021; 2) Dept. of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu Sichuan 610072, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the intervention of liangxuehuoxue drugs on retinal neovascularization and the mechanism of action. **Methods** Retinal neovascularization model was established in young C57BL/6 mice by hyperoxia induction. Mice were divided randomly into 4 groups: normal control group, model group, liangxuehuoxue drugs high dose group and low dose group. The number of nucleus of endothelial cells which broke through the endangium in retinal section, and the expression of HIF-1 and NF- $\kappa$ B in retina was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with normal control, after hyperoxia induction, the number of nucleus of endothelial cells significantly increased, and the expression of HIF-1 and NF- $\kappa$ B was upregulated, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), suggesting the retinal neovascularization model was established successfully. Compared with model group, in liangxuehuoxue drugs groups, the number of nucleus of endothelial cells significantly decreased, and the expression of HIF-1 and NF- $\kappa$ B was downregulated, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Liangxuehuoxue can inhibit the retinal neovascularization, and the mechanism may be related to downregulating the expression of HIF-1 and NF- $\kappa$ B related to the angiogenesis.

**[Key words]** Retinal neovascularization; Liangxuehuoxue; HIF-1; NF- $\kappa$ B

**[基金项目]** 云南省自然科学基金资助项目 (2011FZ257)

**[作者简介]** 马珊 (1979~), 女, 云南建水县人, 医学博士, 讲师, 主要从事眼底病的临床及研究工作.

视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 临床多见于增殖性糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻塞、视网膜静脉周围炎、早产儿视网膜病变、Coats 病等眼病的严重并发症<sup>[1]</sup>。因其发育不完全, 管壁薄而脆, 易渗漏, 最终形成出血、渗出、增殖等病理改变而导致视力的丧失, 是一类主要的致盲性眼病。笔者通过建立小鼠视网膜新生血管动物模型, 认识 RNV 出血的病因为虚火灼络、瘀血阻滞, 予凉血活血药物对其干预性治疗, 为临床对此类眼病的早期治疗及寻找相应的干预靶点积累实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

**1.1.1 实验动物** 同日出生的 C57BL/6 幼鼠共 48 只 (上海斯莱克实验动物有限公司提供, 清洁级, 许可证号: SCXK (沪) 2003-0001), 雌雄不分, 由各自哺乳的母鼠喂养, 统一编号后随机分为 4 组: 正常对照组及模型对照组、凉血活血药物高、低剂量组; 每组 12 只幼鼠。

**1.1.2 主要实验仪器及试剂** 医用氧: 成都中医药大学附属医院提供; 玻璃容器: 成都市金牛区德龙玻璃装饰部; CY-3 数字式测氧仪: 上海华光仪器仪表厂; BX50 型光学显微镜: 日本 OLYMPUS 公司; FA1104 上皿电子天平: 上海天平仪器厂; Mias-2000 型图像分析系统: 四川大学图形图像研究所; 显微手术器械: 苏州医疗器械厂兔抗鼠 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体; 兔抗鼠 NF- $\kappa$ B 多克隆抗体; 免疫组化二抗及相应试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 造模方法** 正常对照组: 幼鼠出生时为第 0 天。出生后 7 d (Postnatal day 7, P7) 置于 (20 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C 的空气环境下饲养。氧诱导模型组: 将 P7 的幼鼠与哺乳的母鼠一起放入 60 cm $\times$ 30 cm $\times$ 20 cm 玻璃容器内 (容器设有 4 个圆形孔: 2 孔插入进气管, 进气管连于氧气瓶, 另 2 孔为出气孔), 然后接入湿润医用氧, 氧气的流量控制在 1.5 L/min, 期间用测氧仪间断监测容器内的氧浓度, 每日 4~6 次, 保持容器内氧气浓度为 (75 $\pm$ 2) %, 室温保持 (20 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C, 光照不超过 300 Lux, 每天 12 h 的照明。每 2 d 打开玻璃容器更换垫料、加食、换水。在高氧环境中饲养 5 d 后回到正常空气环境中饲养。

**1.2.2 实验分组及给药方法** 按 0.1 mL/10 g 体重灌

胃, P12 时开始, 持续至 P22, 1 次/d。正常对照组: 与治疗组等溶的蒸馏水灌胃。模型对照组: 与治疗组等溶的蒸馏水灌胃。凉血活血药物高剂量组: 予凉血活血药物浓煎剂灌胃, 剂量为 24.6 g 原生药/(kg $\cdot$ d), 根据成人量的 18 倍计算。凉血活血药物低剂量组: 予凉血活血药物浓煎剂灌胃, 剂量为 6.15 g 原生药/(kg $\cdot$ d), 根据成人量的 4.5 倍计算。

**1.2.3 病理标本采集** P17, P22 时, 每组随机取小鼠 5 只。颈椎脱臼处死, 用 5-0 的黑色丝线于角膜缘处 3、9 点钟位作定位缝线, 摘除眼球。摘除的眼球放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h; 梯度酒精脱水、二甲苯透明; 石蜡包埋。连续切片, 厚度 3~4  $\mu$ m。切片方向平行于角膜至视乳头的矢状位平面; 将切片在温水中展平整后用载玻片贴上; 二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水, 备用。

### 1.3 指标观测及方法

**1.3.1 视网膜内皮细胞核计数** 每只眼球间断选取不包括视盘的 10 张切片行 HE 染色, 计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目, 统计平均每只眼球每张切片突破内界膜的血管内皮细胞核数。选取切片时应避开视盘周围, 计数血管内皮细胞核时仅计数与内界膜有紧密联系血管内皮细胞核。

**1.3.2 HIF-1、NF- $\kappa$ B 免疫组织化学染色及观察** 每组任意选取 20 张切片行免疫组化染色, 具体方法为: 石蜡切片, 常规脱蜡至水; 蒸馏水冲洗, 用 PBS (0.01 M, pH7.5 $\pm$ 0.1) 浸泡 5 min; 抗原修复 0.01 M, pH=6.05 柠檬酸 Buffer 高压 2 min, 冷却 20 min; PBS 液冲洗 3 次, 每次 3 min; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性; 滴加正常山羊血清, 室温下孵育 10 min; 除去血清不洗; 滴加稀释的一抗 (稀释度: HIF-1 为 1:200; NF- $\kappa$ B 为 1:100), 4  $^{\circ}$ C 过夜; PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 除去 PBS 液, 滴加二抗 (生物素山羊抗兔 IgG1:50), 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 除去 PBS 液, 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液 (1:100), 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 显色剂 (DAB) 显色; 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 脱水, 透明, 树胶封片。于 400 倍光镜下观察, 每张切片均选取免疫组化染色最多的 5 个视野框, 用 Mias-2000 图形分析系统行视网膜上测量框内 HIF-1、NF- $\kappa$ B 的平均光密度 (Optical Density, OD) 的测定。光镜下在清晰背景衬托下的黄色、棕黄色颗粒为阳性反应。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计学处理. 多组间计量资料比较采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 多组间两两比较采用  $q$  检验 (S-N-K 法) 以及 LSD (方差齐) 或 Tamhane (方差不齐). 数据采用均数  $\pm$  标准 ( $\bar{x} \pm s$ ) 差表示.

## 2 结果

凉血活血含药血清对内皮细胞的增殖有抑制作

用. 随浓度的增加含药血清组 A 值降低, 与正常对照组比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ). 其中 20% 浓度含药血清组既可抑制细胞增殖又对细胞无毒性作用. 2.5% ~ 10% 含药血清组与相应空白对照组比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1.

凉血活血含药血清可降低 VEGF 表达, 随浓度的增加 VEGF 含量下降, 2.5%、20%、40% 浓度组与相应空白对照组比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2. NF- $\kappa$ B 染色平均光密度比较见表 3.

表 1 突破内界膜内皮细胞核计数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The number of nucleus of endothelial cells which broke through the endangium in retinal section ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	P17 内皮细胞核数 (个)	P22 内皮细胞核数 (个)
正常对照组	0.40 $\pm$ 0.516	0.22 $\pm$ 0.441
模型对照组	23.80 $\pm$ 3.011**	17.44 $\pm$ 2.297**
凉血活血药物高剂量组	15.80 $\pm$ 1.619** $\blacktriangle\blacktriangle$	12.11 $\pm$ 1.900** $\blacktriangle\blacktriangle$
凉血活血药物低剂量组	20.20 $\pm$ 2.044** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$	14.44 $\pm$ 2.242** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$

与正常组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ ; 与高剂量组比较,  $\triangle P < 0.05$ ,  $\triangle\triangle P < 0.01$ .

表 2 HIF-1 染色平均光密度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The average optical density of HIF-1 staining ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	P17 平均光密度	P22 平均光密度
正常对照组	22.40 $\pm$ 2.757	19.70 $\pm$ 1.889
模型对照组	39.70 $\pm$ 3.683**	31.50 $\pm$ 5.543**
凉血活血药物高剂量组	25.90 $\pm$ 3.479 $\blacktriangle\blacktriangle$	21.90 $\pm$ 2.234 $\blacktriangle\blacktriangle$
凉血活血药物低剂量组	31.80 $\pm$ 2.440** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$	26.20 $\pm$ 3.458** $\triangle$

与正常组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ ; 与高剂量组比较,  $\triangle P < 0.05$ ,  $\triangle\triangle P < 0.01$ .

表 3 NF- $\kappa$ B 染色平均光密度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 The average optical density of NF- $\kappa$ B staining ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	P17 平均光密度	P22 平均光密度
正常对照组	20.10 $\pm$ 3.479	12.10 $\pm$ 2.234
模型对照组	115.40 $\pm$ 11.108**	79.70 $\pm$ 4.473**
凉血活血药物高剂量组	72.50 $\pm$ 8.554** $\blacktriangle\blacktriangle$	42.70 $\pm$ 2.263** $\blacktriangle\blacktriangle$
凉血活血药物低剂量组	99.60 $\pm$ 7.619** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$	56.70 $\pm$ 3.682** $\blacktriangle\blacktriangle\triangle$

与正常组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ ; 与高剂量组比较,  $\triangle\triangle P < 0.01$ .

## 3 讨论

视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 因其结构发育不良而易反复出血, 多发于眼底病的中、后期, 体现了“五脏之伤, 穷及必肾”等中医理论. 故多责之于肾, 肝肾同源, 共居下焦, 肝肾亏虚, 阴虚生内热, 虚火灼络, 血

溢络外, 当出血溢于视衣 (视网膜), 视物模糊时, 可出现“视瞻昏渺”. 少量出血溢于神膏 (玻璃体) 时表现为“云雾移睛”. “久病多瘀”、“瘀久化热”, 故认识 RNV 出血的病因为虚火灼络, 瘀血阻滞, 治疗宜凉血活血, 既可清虚火, 散瘀血, 又防止其反复出血. 实验用凉血活血药物为导师王明芳教授临床常用凉血活血药物牡丹

皮、赤芍药、白茅根、紫草等。现代药理学研究丹皮酚及糖甙成分有抗炎的作用,而且具有抑制毛细血管的通透性、抗渗出,改善微循环的作用。赤芍可改善微循环,保护血管内皮细胞损伤,降低血液黏度,改善血液流变性。紫草因性味甘寒、色紫入血,故有清理血份之热的功效,紫草有抗炎作用,对急性渗出期的血管通透性、渗出和水肿均有拮抗作用。

在正常眼组织中,血管生成的自稳态是由血管生成刺激因子和血管生成抑制因子两种因素所维持的<sup>[2,3]</sup>。新生血管的发生机制,主要由于在某些病理状态下(如缺血缺氧),打破了血管生成的平衡调节。在视网膜病变研究中发现缺氧是刺激生长因子合成和分泌增加的重要因素。缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是促血管新生关键物质,它由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  两个亚基构成,其中 HIF-1 $\alpha$  对 HIF 活性起主要调节作用<sup>[4]</sup>。在缺氧状态下迅速聚集在细胞核内, HIF-1 $\alpha$  与 HIF-1 $\beta$  结合,改变 VEGF 等基因的表达<sup>[5]</sup>。缺氧、缺血是视网膜新生血管形成最常见的致病因素,而缺氧又是 NF- $\kappa$ B 的活化因素。其机制可能为:在缺氧过程中,机体产生大量活性氧分子,活性氧分子引起  $\kappa$ B 激活,从而导致 NF- $\kappa$ B 从细胞浆向细胞核转移,并启动和促进内皮细胞分泌细胞粘附分子和其他与新生血管形成相关的细胞因子,增强多形核白细胞与内皮细胞黏附,促进新生血管形成<sup>[6]</sup>。本实验结果显示在正常视网膜组织中, HIF-1 $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 表达阴性,当组织缺氧时, HIF-1 $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 主要表达在节细胞层和新生血管上,这可能是节细胞层对组织缺氧最敏感,而 HIF-1 $\alpha$  只在细胞缺氧时表达, P17、P22 模型组

HIF-1 $\alpha$  染色的阳性表达均高于正常对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),据此推断,氧诱导视网膜新生血管动物模型的发生机制与 HIF-1、NF- $\kappa$ B 的上调有关;凉血活血药物高、低剂量组较模型组有不同程度的下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示凉血活血药物可能是通过降低 HIF-1、NF- $\kappa$ B 的表达,抑制视网膜新生血管的生长。

研究结果提示凉血活血药物可作为潜在的早期干预视网膜新生血管及其相关疾病的研究靶点,但其具体作用机制还需进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 刘家琦,李凤鸣,实用眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:460.
- [2] CALDWELL R B, BARTOLI M. Vascular endothelial factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress[J]. *Curr Drug Targets*, 2005, 6(4): 511 - 524.
- [3] DAWSON D W, VOLPERT V, GILLIS P, et al. Pigment epithelium derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 245 - 248.
- [4] PUGH C W, RATCLIFFE R J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 677 - 684.
- [5] JUANCC, KHALDOUNA, LILIANAN. Transient expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and target genes in peripheral nerves from diabetic rats[J]. *Neuroscience Letters*, 2005, 374(3): 179 - 182.
- [6] YASUDA M, SHIMIZU, STOKUYAMA S, et al. A novel effect of polymorphonuclear leukocytes in the facilitation of angiogenesis[J]. *Life Sci*, 2000, 66(21): 2113 - 2121.

(2012-06-24 收稿)