

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.12.002
文章编号: 1005-8982 (2019) 12-0007-05

蛴螬提取物对视网膜中央静脉阻塞模型兔小胶质细胞 CD68 表达的影响及机制研究*

蒋鹏飞¹, 董子奕², 彭俊³, 马俊旭¹, 梁凯霞¹, 彭清华¹

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 天津市人民医院 眼科, 天津 300121;
3. 湖南中医药大学第一附属医院 眼科, 湖南长沙 410007)

摘要: 目的 探讨蛴螬提取物对实验性兔视网膜静脉阻塞(RVO)的治疗作用及相关机制。**方法** 选取40只兔并随机分为空白组、模型组、复方血栓通组及蛴螬组。除空白组外,其余3组采用光化学动力学复制RVO动物模型,于给药后7、14及28 d行荧光素眼底血管造影术(FFA),于给药后1、3、7、14及28 d行免疫组织化学检测白细胞分化抗原68(CD68)的表达。**结果** FFA检查显示,模型组给药7 d后,中央静脉荧光渗漏、出血,出现无灌注区;复方血栓通组与蛴螬组出现无灌注区,但渗漏、出血较模型组少;给药28 d后,模型组渗漏、出血的静脉周围无灌注区面积增大,并出现新生血管;复方血栓通组渗漏、出血明显减少;蛴螬组渗漏、出血基本吸收。复方血栓通组、蛴螬组与模型组给药后7、14及28 d的无灌注区与视盘面积比值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组织化学结果显示,各模型组CD68表达增加,复方血栓通和蛴螬提取物都使CD68的阳性表达随时间的延长而减弱,但蛴螬组CD68表达减弱得更快。复方血栓通组、蛴螬组与模型组3、7、14及28 d CD68表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 复方血栓通与蛴螬提取物均不同程度抑制视网膜小胶质细胞的活化,而蛴螬提取物的抑制作用更明显,说明其比单纯的活血化瘀药能更快地抑制小胶质细胞活化。

关键词: 视网膜静脉阻塞; 视网膜新生血管; 蛴螬提取物; 小胶质细胞; 白细胞分化抗原68

中图分类号: R774.1

文献标识码: A

Effect and mechanism of grub extract on expression of CD68 in microglia of rabbits with central retinal vein occlusion*

Peng-fei Jiang¹, Zi-yi Dong², Jun Peng³, Jun-xu Ma¹, Kai-xia Liang¹, Qing-hua Peng¹

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Department of Ophthalmology, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300121, China; 3. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: Objective To evaluate the therapeutic Effect and mechanism of grub extract on expression of CD68 in microglia of rabbits with central retinal vein occlusion (RVO). **Methods** Forty rabbits were randomly divided into 4 groups: blank group, model group, compound Xueshuantong group and grub group. Except for the blank group, the other three groups were used to establish RVO animal model by photochemical kinetic method. FFA examination was performed 7d, 14d, and 28d after administration, and immunohistochemical differentiation of antigen 68 (CD68) was stained 1d, 3d, 7d, 14d, and 28d after administration. The results were observed and analyzed. **Results** The results of FFA examination showed that there was non-perfusion area in the central venous fluorescence leakage and hemorrhage 7 days after administration in the model group. There was non-perfusion area in the compound Xueshuantong group and the grub group

收稿日期: 2018-12-13

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No: 81574031); 中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(No: 2017TP1018)

[通信作者] 彭清华, E-mail: pqh410007@126.com; Tel: 13574833598

7 days after administration, but the incidence of leakage and bleeding was less than that in the model group. On the 28th day, the area of the non-perfusion area around the vein leaking and bleeding in the model group increased, and new blood vessels appeared; the leakage and bleeding of the compound Xueshuantong group were significantly reduced; the leakage and bleeding of the grub group were basically absorbed. The ratio of non-perfusion area to optic disc area 7, 14 and 28 days after administration of compound Xueshuantong group, grub group and model group was significantly different ($P < 0.05$). The results of CD68 immunohistochemistry showed that the expression of CD68 was increased in all groups, and the positive expression of CD68 was attenuated with the increase of CD68, but the expression of CD68 was decreased more rapidly in the grub group. The expression of CD68 in compound Xueshuantong group, grub group and model group at 3, 7, 14 and 28 days was significantly different ($P < 0.05$). **Conclusions** Compound Xueshuantong and grub extract can inhibit the activation of retinal microglia in different degrees, and the inhibitory effect of grub extract was more obvious, indicating that grub extract can inhibit activation of microglia more quickly than simple blood stasis drug.

Keywords: retinal vein occlusion; retinal neovascularization; grub extract; microglia; CD68

视网膜静脉阻塞 (retinal vein occlusion, RVO) 病程冗长, 治疗困难, 尚无特效疗法, 视网膜新生血管是 RVO 的常见并发症。文献记载蛭螭可治疗目疾, 并有破血、行瘀、散结及明目的功效, 前期研究发现蛭螭提取物可促进 RVO 出血的吸收, 抑制视网膜新生血管^[1-2]。为明确其机制, 本文通过复制 RVO 动物模型, 探讨蛭螭提取物对视网膜新生血管的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

选用 40 只健康实验性兔, 雌雄兼用, 体重 1.8 ~ 2.3 kg (合格证号: 湘医动字第 30-015 号)。蛭螭提取物制备参考阳长明等^[3]的方法。复方血栓通片 (扬州中惠制药有限公司), 一抗为兔抗白细胞分化抗原 68 (cluster of differentiation 68, CD68) 多克隆抗体 (武汉博士德公司), 二抗为生物素标记的 IgG (武汉博士德公司)。

1.2 设备

电子秤 (JY0001, 上海天平仪器厂), 勒克斯照度计 (ZDS-10, 上海嘉定学联仪器厂), 眼科手术显微镜 (YZZOT, 苏州医疗器械设备厂), PCR 仪 (德国 Biometra 公司), 凝胶成像系统 (Gel Doc XR+, 美国 Bio-Rad 公司), 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司), 垂直板电泳槽 (DYCZ-24D, 北京六一仪器厂), 台式高速冷冻离心机 (美国赛默飞公司), 水平电转槽 (DYCP-40C, 北京六一仪器厂), 超纯水仪 (美国 Millipore 公司), 紫外可见分光光度计 (SP-752, 上海 Spectrum 公司), 恒温摇床 (THZ-82A, 金坛华特实验仪器有限公司), 水平摇床 (WD-9405B, 北京六一仪器厂), 扫描仪 (9000F Mark II, 日本 Canon 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 将 40 只实验性兔依次编为 1 ~ 40 号, 通过随机数字表法, 从第 3 行第 5 个数开始抄录 40 个数, 将这些数字除以 4, 余数为 1 作为空白组, 余数为 2 作为模型组, 余数为 3 作为复方血栓通组, 余数为 0 作为蛭螭组, 最终每组 10 只动物, 20 只眼。

1.3.2 动物模型的复制 应用光化学动力学法复制实验性 RVO 模型, 模型组、复方血栓通组及蛭螭组兔双眼散瞳后, 麻醉动物, 固定于裂隙灯前, 安置三面镜; 激光器指示光斑定位于视盘边缘的静脉后, 自耳缘静脉缓慢推入 20% 荧光素钠注射液 (0.3 ml/kg), 30 s 内推完。注药后, 照射双侧视网膜静脉, 同时避开伴行的动脉, 有明显的远端静脉扩张时停止^[4]。

1.3.3 动物给药 空白组、模型组以生理盐水 5 ml/kg 灌胃; 复方血栓通组: 复方血栓通 0.1 g/kg 溶于生理盐水制成混悬液, 5 ml/kg 灌胃; 蛭螭组: 蛭螭提取物 1.5 ml/kg 灌胃。各组均为 1 次/d, 持续至模型复制后 3 周, 各组于模型复制后 1、3、7、14 及 28 d 随机处死 2 只动物。

1.3.4 取材 动物耳缘静脉注射空气处死后, 立即摘除眼球 (包括球后视神经 2 mm), 于角膜缘后 0.5 mm 处剪开眼球壁, 去除眼前节组织和玻璃体, 手术显微镜下剥离眼球壁激光斑部位的视网膜, 逐级酒精脱水, 常规石蜡包埋, 经视乳头颞侧旁开 1 mm 纵向做 4 μm 厚的切片, 烘干备用。

1.3.5 荧光素眼底血管造影术 (fluorescein fundus angiography, FFA) 模型复制后 7、14 及 28 d 对兔行 FFA 检查, 将 FFA 结果输入 Mias-2000 型显微图像分析系统自动测量无灌注区和视盘的面积, 并求出其比值^[5]。分为无灌注区、有灌注区、无新生血管 (甲类)、

有新生血管(乙类)。

1.3.6 免疫组织化学法 将取材的切片行苏木精-伊红染色,检测 CD68 的表达。一抗为兔抗 CD68 多克隆抗体,二抗为生物素标记的 IgG,在光学显微镜下观察视网膜组织的变化。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组无灌注区与视盘面积比值比较

给药 7 d 后,模型组中央静脉荧光渗漏、出血,出现无灌注区,尚无新生血管出现;复方血栓通组和蛭螭组出现无灌注区,但渗漏、出血较模型组少。给药 28 d 后,模型组渗漏、出血的静脉周围无灌注区面

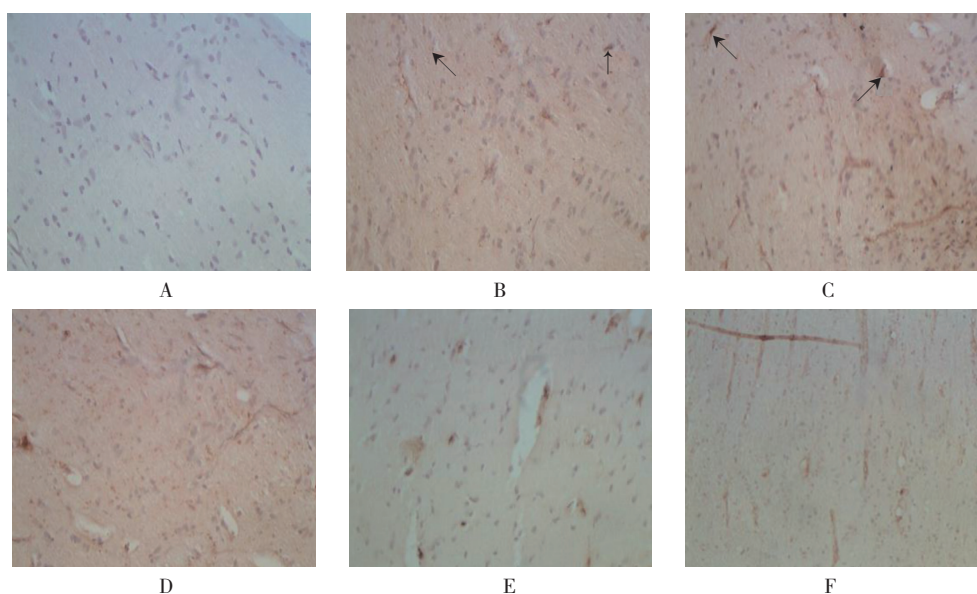
积增大,并出现新生血管;复方血栓通组渗漏、出血明显减少;蛭螭组渗漏、出血基本吸收。复方血栓通组、蛭螭组与模型组给药后 7、14 及 28 d 的无灌注区与视盘面积比值比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的无灌注区与视盘面积比值比较,差异有统计学意义 ($F = 28.862, P = 0.000$);②3 组无灌注区与视盘面积比值比较,差异有统计学意义 ($F = 53.221, P = 0.000$);③3 组无灌注区与视盘面积比值变化趋势比较,差异无统计学意义 ($F = 0.622, P = 0.737$)。见表 1。

2.2 各组 CD68 的表达水平比较

空白组视神经小胶质细胞均表现为无表达或极少量表达(见图 1A)。模型组 1 d 时小胶质细胞增多(见图 1B),3 d 时小胶质细胞数量达最高峰(见图 1C),7、14 及 28 d 时小胶质细胞数量较前依次减少,28 d 时多转变为杆状的静止状态(见图 1D~F)。复方血栓通组小胶质细胞 1 d 时即有活化表现,3 d 时活化达

表 1 各组不同时间无灌注区与视盘面积比值比较 ($n = 2, \bar{x} \pm s$)

组别	眼数	7 d	14 d	28 d
模型组	4	16.34 \pm 3.51	17.72 \pm 2.20	19.42 \pm 2.69
复方血栓通组	4	11.88 \pm 2.14	8.22 \pm 1.97	4.18 \pm 1.75
蛭螭组	4	9.78 \pm 1.87	6.26 \pm 1.95	2.90 \pm 1.50

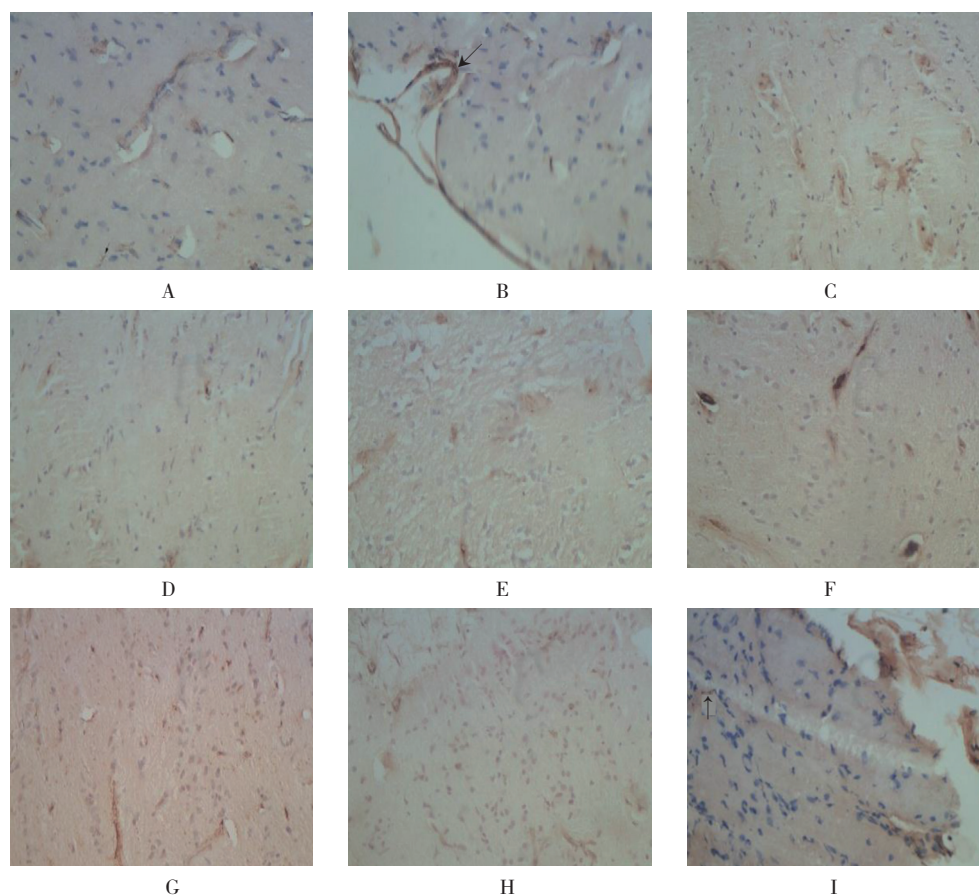


A: 空白组; B: 模型组 1 d, 粗箭头示深棕色的杆状小胶质细胞,细箭头示椭圆形小胶质细胞; C: 模型组 3 d, 粗箭头示棘阿米巴样小胶质细胞,细箭头示分支状小胶质细胞; D: 模型组 7 d; E: 模型组 14 d; F: 模型组 28 d

图 1 空白组和模型组不同时间小胶质细胞 CD68 的表达 (光学显微镜 $\times 400$)

高峰 (见图 2A ~ E)。蛭螬组小胶质细胞在 1 d 时同样表现出了活跃的小胶质细胞, 3 d 时即表现出小胶质细胞受抑制, 28 d 时接近正常水平 (见图 2F ~ I)。复方血栓通组、蛭螬组与模型组在 1、3、7、14 及 28 d 的 CD68 表达水平比较, 采用重复测量设计的方

差分析, 结果: ①不同时间点 CD68 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($F=21.373, P=0.000$); ② 3 组 CD68 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($F=92.425, P=0.000$); ③ 3 组 CD68 表达的变化趋势比较, 差异无统计学意义 ($F=0.743, P=0.569$)。见表 2。



A: 复方血栓通组 1 d; B: 复方血栓通组 3 d, 箭头示靠近视盘的髓鞘深染为棕黄色; C: 复方血栓通组 7 d; D: 复方血栓通组 14 d; E: 复方血栓通组 28 d; F: 蛭螬组 1 d; G: 蛭螬组 3 d; H: 蛭螬组 7 d; I: 蛭螬组 14 d, 箭头示活化后逐渐转为静止的杆状小胶质细胞

图 2 复方血栓通组和蛭螬组不同时间小胶质细胞 CD68 的表达 (光学显微镜 $\times 400$)

表 2 各组 CD68 表达水平比较 ($n=2, \bar{x} \pm s$)

组别	眼数	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
空白组	4	194.06 \pm 9.37	196.26 \pm 10.78	191.12 \pm 2.44	197.72 \pm 4.29	194.96 \pm 3.21
模型组	4	142.80 \pm 8.69	85.90 \pm 5.01	114.36 \pm 10.21	144.86 \pm 6.24	164.08 \pm 5.59
复方血栓通组	4	146.16 \pm 8.26	108.56 \pm 8.41	128.54 \pm 9.63	168.48 \pm 8.24	182.56 \pm 4.88
蛭螬组	4	143.18 \pm 3.53	125.72 \pm 4.90	160.78 \pm 6.34	186.20 \pm 3.69	197.42 \pm 2.21

3 讨论

RVO 发病率高, 是仅次于糖尿病视网膜病变的第二大致盲性视网膜血管病, 其发生机制目前尚不明

了^[6-11]。蛭螬是金龟子的幼虫, 首次记载于《神农本草经》:“主恶血血瘀痹气, 破折血在胁下坚满痛, 月闭, 目中淫肤, 青翳白膜。”《晋书》中有此药治疗目疾的

记载:“吴中书郎战冲,母王氏失明,婢取蛭螭蒸熟与食,王以为美,冲还知之,抱母恸哭,母目即开。”《本草纲目》中记载此药味咸微温,有破血、行瘀、散结、通乳、解毒、消疮及明目的功能。现代药理研究认为蛭螭对 RVO 的缺血视网膜组织有保护作用,能够治疗 RVO 所致的视网膜病理损伤^[1-2]。

随着视网膜作为免疫赦免区概念的打破,越来越多的学者开始研究小胶质细胞在视网膜疾病中的活化及作用,尤其是小胶质细胞的活化在 RVO 的相关研究中取得了一定的进展^[12-14]。RVO 时,组织出现缺血缺氧改变,小胶质细胞会迅速活化并趋附在损伤组织周围。大量研究发现,视网膜上持续活化的小胶质细胞对视网膜神经元有损伤作用^[15-18]。视网膜小胶质细胞的免疫组织化学表达较多,不同表达因子的选择对实验有一定影响^[10, 19-20]。本研究选取针对兔的 CD68 作为指标,CD68 从形态上能很清楚地显示小胶质细胞形状的多样性。

本研究发现,蛭螭提取物与复方血栓通均可改善 RVO 后组织灌注情况,但蛭螭提取物较复方血栓通效果更好。对视网膜小胶质细胞活化的表达因子 CD68 的检测发现,复方血栓通和蛭螭提取物都使小胶质细胞的阳性表达随时间的延长而减弱,3 d 后蛭螭组比复方血栓通组的阳性表达减少,说明蛭螭提取物不仅能抑制 RVO 后小胶质细胞的活化,而且比单纯的活血化瘀药能更快地发挥对小胶质细胞的抑制作用,这应该与蛭螭提取物的免疫抑制作用有关。

参 考 文 献:

- [1] 邱晓星,彭清华,陈梅,等. 蛭螭提取物对兔脉络膜新生血管中 Ang1 和 PEDF 表达的影响 [J]. 国际眼科杂志, 2012, 12(11): 2053-2058.
- [2] 张波涛,彭清华,叶群如,等. 蛭螭提取物对兔视网膜静脉阻塞模型视网膜组织 ET-1 表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(09): 8-11.
- [3] 阳长明,侯世祥,罗英杰,等. 蛭螭滴眼液中氨基酸成分的测定 [J]. 湖南中医杂志, 2001, 32(1): 57-59.
- [4] 陈立军,王雨生.“二步法”激光诱导脉络膜视网膜静脉吻合术治疗兔视网膜中央静脉阻塞的视觉电生理变化 [J]. 眼科新进展, 2006, 26(4): 253.
- [5] 唐坤,李素芬. 视网膜分支静脉阻塞无灌注区范围,视野阈值与新生血管关系的研究 [J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(6): 15-16.
- [6] WOLF-SCHNURBUSCH U E. Retinal vein occlusion[M] New Delhi: Springer, 2017: 147-150.
- [7] GOLDENBERG D, LOEWENSTEIN A. Retinal vein occlusion[M]. Berlin: Karger Publishers, 2017: 32-41.
- [8] STARR M R, NORBY S M, SCOTT J P, et al. Acute retinal vein occlusion and cystic fibrosis[J]. International Journal of Retina and Vitreous, 2018, 4(1): 26.
- [9] PRAJAPATI V A, VASAVADA D, PATEL S M, et al. A study of evaluation of various risk factors of retinal vein occlusion[J]. International Journal of Research in Medical Sciences, 2017, 2(3): 1054-1057.
- [10] BUCCIARELLI P, PASSAMONTI S M, GIANNIELLO F, et al. Thrombophilic and cardiovascular risk factors for retinal vein occlusion[J]. European Journal of Internal Medicine, 2017, 44(2): 44-48.
- [11] WINEGARNER A, WAKABAYASHI T, HARA-UENO C, et al. Retinal microvasculature and visual acuity after intravitreal aflibercept in eyes with central retinal vein occlusion: an optical coherence tomography angiography study[J]. Retina, 2018, 38(10): 2067-2072.
- [12] 胡诞宁. 胚胎干细胞衍生的视网膜色素上皮细胞移植治疗眼病 [J]. 中华细胞与干细胞杂志, 2014, 4(2): 104-108.
- [13] GAO N N, SONG F Q, GE H Y. Research advances of miR-126 and ophthalmic diseases[J]. Int Eye Sci, 2017, 17(6): 1066-1068.
- [14] CHEN L S, XU G X. Therapeutic potential and influencing factors of mesenchymal stem cells on retinal diseases[J]. Int Eye Sci, 2015, 15(3): 459-463.
- [15] 赵亚飞,唐勇,王诗惠,等. 小胶质细胞 P2X4 受体:探索视网膜光损伤的新靶点 [J]. 中国中医眼科杂志, 2017, 27(1): 56-58.
- [16] 董子奕,彭清华,李建超,等. 兔视网膜中央静脉阻塞模型中小胶质细胞 CD40 和铁蛋白的表达 [J]. 眼科新进展, 2015, 35(2): 116-119.
- [17] ZHAO X, YANG Y, ZHANG W F. Pathogenesis research progress of high altitude retinopathy[J]. Int Eye Sci, 2018, 18(3): 461-465.
- [18] LIU B, JIANG J W, WILSON B C, et al. Systemic infusion of N aloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide[J]. J Pharm Exp Ther, 2000, 295(1): 125-132.
- [19] 李娟娟,李燕,汤志伟. 激活的小胶质细胞在大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型中的作用 [J]. 眼科新进展, 2015, 35(1): 9-14.
- [20] 王常观,柳小珍,马志中,等. 小神经胶质细胞对湿性年龄相关性黄斑变性患者脉络膜新生血管膜形成的作用 [J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2018, 40(1): 18-22.

(李科 编辑)