

益气化痰通窍法对放射性视网膜损伤大鼠血管内皮的保护作用研究

冀建平, 程先华, 张淳, 廉丽华, 黄小东, 李志英

广州中医药大学第一附属医院眼科, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 探讨益气化痰通窍法对放射性视网膜损伤中血管内皮的保护作用。方法: 制作放射性视网膜损伤 SD 大鼠实验模型作为研究对象, 随机分为空白组、模型组、实验一组和实验二组。放射照射后实验一组每天腹腔注射黄芪注射液和盐酸川芎嗪注射液, 实验二组每天腹腔注射黄芪注射液、盐酸川芎嗪注射液和醒脑静注射液, 空白组和模型组每天腹腔注射等量生理盐水, 用药持续 6 周。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定各组放射照射前、照射后 1 天、2、4、6 周大鼠静脉血内皮素 -1 和血管性血友病因子的浓度, 观察并分析各组内皮素 -1 和血管性血友病因子的动态变化和组间差异。结果: 放射照射后模型组和实验组静脉血内皮素 -1 和血管性血友病因子的浓度明显升高, 于照射后 4 周达到高峰, 与空白组比较, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 实验一组和实验二组静脉血内皮素 -1 和血管性血友病因子的浓度显著降低, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$); 与实验一组比较, 实验二组静脉血内皮素 -1 浓度在照射后 4、6 周显著降低, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 而血管性血友病因子的浓度在照射后 2、4 周显著降低, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。结论: 益气化痰通窍药物能够显著降低放射性视网膜损伤模型鼠静脉血内皮素 -1 和血管性血友病因子的浓度, 从而减轻放射线对视网膜血管内皮的损伤。

[关键词] 放射性视网膜损伤; 益气化痰通窍法; 血管内皮; 内皮素 -1; 血管性血友病因子

[中图分类号] R818 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 08-0185-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.08.084

放射性视网膜损伤(Radiation-induced retinal damage)是由于放射线照射引起的严重视网膜病变, 多发生于头颈部肿瘤的放射治疗, 特别是鼻咽癌、鼻窦肿瘤及颅底肿瘤的放射治疗^[1-3], 是导致放射治疗后视功能减退的主要原因之一。既往对放射性视网膜损伤的病理研究认为, 除了对视网膜神经组织的直接损伤外, 放射线对视网膜血管的损伤, 特别是放射线引起血管内皮细胞的变性坏死及管腔狭窄闭塞等病理过程, 是引起视网膜功能障碍的另一重要因素^[4-5]。益气化痰通窍法是中医学临床上用于气滞血瘀、玄府闭塞患者的有效治疗方法, 对于以气滞血瘀为主要辨证类型的放射线视网膜病变患者有减轻损伤、改善视功能的疗效^[6-7]。为此, 笔者开展了应用益气化痰通窍法中药对放射线视网膜损伤大鼠模型损伤及治疗过程中视网膜血管内皮素 -1(ET-1)和血管性血友病因子(vWF)的动态变化观察研究, 探讨该方法对放射性视网膜损伤中血管内皮的保护作用。

1 对象和方法

1.1 实验动物及分组 选取 Sprague-Danley(SD)大鼠 24 只, 雌雄各半, 鼠龄 8 周, 体重约 230~280 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证书编号: SCXK(粤)2008-0020。随机分为 4 组, 每组 6 只: A 组为空白组, B 组

为模型组, C 组为实验一组, D 组为实验二组。

1.2 仪器与试剂 放射治疗仪选用 Varian 600 C 直线加速器(美国 Varian 公司)。实验大鼠采用 10%水合氯醛溶液(广州中医药大学第一附属医院药剂科配制)腹腔注射麻醉; 实验一、二组用药选用黄芪注射液(青春正大药业股份有限公司, 批号: Z33020197, 规格: 10 mL/支, 相当于原药材 20 g)、盐酸川芎嗪注射液(上海现代哈森药业有限公司, 批号: H20054485, 规格: 2 mL/40 mg/支)和醒脑静注射液(无锡济民可信山禾药业股份有限公司, 批号: Z32020563, 规格: 10 mL/支); 空白组及模型组选用氯化钠注射液(天津药业焦作有限公司, 批号: H20044024, 规格: 10 mL: 90 mg)。静脉血 ET-1 和血管性血友病因子的浓度测定选用大鼠 ET-1 ELISA 试剂盒(96T, 瑞士 Enzo 公司)和大鼠 vWF ELISA 试剂盒(96T, 美国 Fitzgerald 公司)。

1.3 动物模型制备 将除空白组外, 其余各组大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉, 四肢及头部固定于简易固定板上, 将大鼠双耳连线置于照射野边缘, 对双耳前部区域进行照射, 每周 1 次, 共 3 次, 合计剂量为 30 Gy。照射参数: 放射模式: SSD, 放射距离: 100 cm, 射野大小: 9.0 cm × 25.0 cm, 照射深度: 1.7 cm, 等效深度: 1.7 cm, 跳数:

[收稿日期] 2014-04-20

[基金项目] 广东省科技计划项目 (编号: 2009B060700071)

[作者简介] 冀建平 (1974-), 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 中医药治疗视神经疾病、青光眼及角膜疾病。

496跳×2,总剂量:10 Gy。

1.4 给药方法和剂量 根据体表面积折算等效剂量换算大鼠的给药剂量:黄芪注射液 2.0 mL/kg;盐酸川芎嗪注射液 15 mg/kg;醒脑静注射液 2.5 mL/kg。根据大鼠体重计算药量,加生理盐水 4~5 mL(大鼠腹腔注射量 2 mL/100 g);模型组给予 4~5 mL 生理盐水。采用腹腔注射给药,空白组和模型组于放射照射完成后开始每天腹腔注射生理盐水;实验一组于照射完成后每天腹腔内注射黄芪注射液和盐酸川芎嗪注射液;实验二组于照射完成后每天腹腔内注射黄芪注射液、盐酸川芎嗪注射液和醒脑静注射液。各组用药频度均为 1 次/天,用药持续 6 周。

1.5 观察指标及统计方法 分别于放射照射前及放射照射后 1 天、2、4、6 周抽取尾静脉血,采用 ELISA 法测定各组各时点大鼠血液中 ET-1 和 vWF 的浓度,观察其动态变化,并分析组间差异和组内变化规律。实验数据采用 SPSS19.0 统计软

件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组内和组间比较采用 one-way ANOVA 分析及 Kruskal-Wallis H 检验。

2 结果

2.1 实验前后各组大鼠尾静脉血中血管 ET-1 的浓度比较 见表 1。放射照射前 4 组的基线浓度基本一致,各组间差异均无显著性意义($P > 0.05$);放射照射后模型组、实验一组和实验二组各时点静脉血血管 ET-1 浓度逐渐升高,并于照射后 4 周达到最高,与空白组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$);实验一组和实验二组放射照射后 2、4、6 周静脉血中血管内皮素-1 浓度,与模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$),而放射照射后 1 天,组间差异均无显著性意义($P > 0.05$);实验二组放射照射后 4、6 周静脉血血管 ET-1 浓度较实验一组低,差异均有显著性意义($P < 0.05$),而放射照射后 1 天和 2 周,差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

表 1 实验前后各组大鼠尾静脉血中血管 ET-1 的浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	照射前	照射后 1 天	照射后 2 周	照射后 4 周	照射后 6 周
空白组	6	22.65 ± 0.14	23.18 ± 0.19	23.68 ± 0.15	24.23 ± 0.12	23.58 ± 0.16
模型组	6	23.18 ± 0.11	27.98 ± 0.22	33.90 ± 0.11	65.25 ± 0.38	43.82 ± 0.09
实验一组	6	23.47 ± 0.11	28.54 ± 0.23	29.86 ± 0.38	48.35 ± 0.10	36.84 ± 0.19
实验二组	6	22.82 ± 0.16	29.22 ± 0.17	28.49 ± 0.11	44.28 ± 0.08	34.54 ± 0.31

空白组与各组照射后各时点比较,① $P < 0.01$;模型组与实验一组、实验二组照射后 2、4、6 周比较,② $P < 0.05$;实验一组与实验二组照射后 4、6 周比较,③ $P < 0.05$

2.2 实验前后各组大鼠尾静脉血中 vWF 的浓度比较 见表 2。放射照射前 4 组的基线浓度基本一致,各组间差异均无显著性意义($P > 0.05$);模型组、实验一和实验二组放射照射后各时点静脉血 vWF 浓度逐渐升高,并于照射后 4 周达到最高,与空白组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$);实验一组

和实验二组放射照射后 2、4、6 周静脉血 vWF 浓度显著降低,与模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$);实验二组放射照射后 2、4 周静脉血 vWF 浓度降低较实验一组更显著,差异均有显著性意义($P < 0.05$);而照射后 1 天和 6 周,差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

表 2 实验前后各组大鼠尾静脉血中 vWF 的浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	照射前	照射后 1 天	照射后 2 周	照射后 4 周	照射后 6 周
空白组	6	62.82 ± 1.56	63.35 ± 2.06	64.12 ± 1.76	63.52 ± 2.02	63.48 ± 1.55
模型组	6	63.16 ± 2.21	88.32 ± 2.06	123.38 ± 1.36	191.40 ± 0.61	141.69 ± 0.82
实验一组	6	62.39 ± 3.10	86.52 ± 0.41	109.15 ± 0.61	174.38 ± 0.63	135.99 ± 0.51
实验二组	6	62.66 ± 2.99	82.68 ± 2.12	94.32 ± 0.71	161.37 ± 1.06	133.81 ± 0.61

空白组与各组照射后各时点比较,① $P < 0.01$;模型组与实验一组、实验二组照射后 2、4、6 周比较,② $P < 0.05$;实验一组与实验二组照射后 2、4 周比较,③ $P < 0.05$

3 讨论

3.1 血管损伤是放射性视网膜损伤的主要发病机制之一 放射性视网膜损伤是眼科常见的一种严重致盲性疾病,多为头颈及鼻咽部肿瘤放射线治疗的并发症,临床上根据病程分为急性和慢性两类^[9]。放射性视网膜损伤的发生与接受放射线治疗的靶器官位置、放射野的设置、总放射剂量和分割剂量、放射治

疗间隔时间、以及多程放疗等因素有关。放射性视网膜损伤发病机制主要有以下 3 种因素:一是放射线照射造成视神经和视网膜组织的直接损伤,包括视觉神经细胞、神经纤维和各种支持细胞的变性、水肿、凋亡或坏死。二是放射线照射损伤视网膜和视神经组织中血管及血管内皮细胞,导致血管壁、血管内皮及周细胞损害,引起渗出、水肿、血管栓塞、闭塞等病理

改变。三是放射线照射导致神经组织抗原性改变而引起的自身免疫反应。目前认为,多数患者是三种损害因素共同作用的结果,最终导致患眼视网膜视神经组织结构和功能受损,从而引起视力显著下降和视野缺损^[9]。而无论急性还是慢性放射性视神经视网膜损伤,血管损伤在放射线照射诱发的视网膜和视神经神经损伤中起着非常重要的作用^[10]。通过药物干预减少放射线对血管组织及血管内皮的损伤,可能能够明显减轻视网膜视神经组织的放射损害,从而起到对视神经功能的有效保护。

3.2 ET-1和vWF是血管损伤的重要指标 放射线照射导致血管内皮细胞肿胀、变性、脱落,血管管腔狭窄,严重可导致闭塞。动物实验和病理研究发现,放射线照射后血管损伤主要表现为血管内皮细胞损伤,以及血管管腔狭窄、毛细血管破裂和血栓形成等。血液中ET-1和vWF是由内皮细胞产生,放射线照射引起血管内皮细胞结构和功能的改变,随着照射剂量的增加其损害程度加重,而ET-1和vWF的分泌随着内皮细胞损伤程度的增加而增高,引起循环血液中二者含量明显增加,故测定血液中ET-1和vWF的含量,可间接反应内皮细胞的损伤情况,是反映血管内皮细胞损伤程度的可靠指标^[11-12]。本研究中,各组实验大鼠在放射线照射前血液中均维持相对稳定的ET-1和vWF浓度。照射后模型组与实验组静脉血中ET-1和vWF的含量较照射前明显增加,且随着时间的延长含量逐渐增加,至照射后4周达到最高峰。这一结果表明,放射线照射损伤了实验鼠视网膜视神经的血管内皮细胞,导致其分泌的ET-1和vWF明显增加,且照射后血管内皮细胞的损伤持续存在并逐渐加重,照射后第4周内皮细胞损伤最为严重,之后ET-1和vWF的含量开始下降,提示血管内皮细胞的损伤和自身修复的动态平衡发生改变,逐渐转向修复为主,实验组中大鼠尾静脉血中ET-1和vWF浓度的趋势与模型组一致。

3.3 益气化痰通窍法可有效保护血管内皮细胞 现代中药药理研究证实,川芎嗪注射液能够减轻血管内皮细胞凋亡,促进细胞生成和血管内皮修复,抑制血管内皮细胞释放内皮素,并具有扩张血管,降低血管阻力,增加血流量,改善微循环的功效^[13-14]。黄芪注射液具有清除体内自由基,减轻缺血、缺氧及放射线对细胞的损伤作用,并通过扩张血管和改善微血管而改善微循环^[15];川芎嗪和黄芪注射液合用能够发挥协同作用,对于扩张血管、改善微循环和局部微环境、增加组织灌注量、减轻血管内皮细胞损伤、促进血管内皮修复,以及增加SOD和t-PA活性等方面具有协同作用^[16]。醒脑静注射液源于安宫牛黄丸组方,是比较成熟的通窍类中成药。研究认为,醒脑静注射液能提高血浆和神经组织中一氧化氮水平、改善毛细血管通透性、减轻组织渗出和水肿、减少内皮素合成和释放、抑制炎症细胞因子介导的炎症反应,具有增强神经元耐受缺血缺氧的能力、对于神经元和胶质细胞有明确的保护调节作用^[17-18]。

既往研究认为,黄芪和川芎嗪注射液联合应用具有协同作用,能够清除体内自由基、减轻炎症反应,可以起到改善血瘀证的病理生理变化,保护血管内皮细胞的功能。本研究中,实验一组联合应用黄芪注射液和盐酸川芎嗪注射液,该组实验大鼠尾静脉血中ET-1和vWF浓度随着时间的延长逐渐升高,其变化趋势与模型组一致,说明黄芪注射液联合盐酸川芎嗪注射液腹腔注射不能阻断放射线对血管内皮细胞造成损伤。但与模型组比较,在放射照射后2、4、6周血液中ET-1和vWF浓度明显较低,提示黄芪和川芎嗪注射液联合应用能够减轻放射线对血管内皮细胞的损伤,从而减轻放射线对实验鼠视网膜视神经组织和功能的损害。

实验二组放射照射后大鼠静脉血ET-1和vWF浓度显著升高,并于放射照射后4周达到高峰,与模型组的变化趋势相一致,但各时点浓度值显著降低,结果显示黄芪注射液、盐酸川芎嗪注射液和醒脑静注射液三者联合用药也不能完全阻断放射线对模型鼠视网膜视神经血管内皮细胞造成的损伤,但三药联合应用能减轻放射线照射对模型鼠血管内皮细胞的损伤。与实验一组比较,实验二组静脉血ET-1的浓度在照射后4、6周较低,差异均有显著性意义($P < 0.05$);而1天、2周的组间差异均无显著性意义($P > 0.05$)。静脉血vWF的浓度在照射后2、4周较低,组间差异均有显著性意义($P < 0.05$);而1天、6周的组间差异均无显著性意义($P > 0.05$)。这一结果显示醒脑静注射液、黄芪注射液、盐酸川芎嗪注射液三药联用较黄芪注射液和盐酸川芎嗪注射液二联用药具有更强的减轻和保护实验鼠视网膜视神经血管内皮细胞的作用,但加用醒脑静注射液对视神经血管内皮细胞受损后分泌ET-1和vWF的影响具有时间差异性。

综上所述,选用以黄芪注射液、盐酸川芎嗪注射液和醒脑静注射液为代表的益气化痰通窍药物能够显著减轻和保护放射性视网膜病变大鼠视网膜内皮细胞的损伤,并且三药联合应用优于黄芪注射液和盐酸川芎嗪注射液的二联应用方案,为临床上放射性视网膜视神经病变患者的药物选择提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Mihalcea O, Arnold AC. Side effect of head and neck radiotherapy: optic neuropathy[J]. Ophthalmologia, 2008, 52(1): 36-40.
- [2] Danesh-Meyer HV. Radiation-induced optic neuropathy[J]. J Clin Neurosci, 2008, 15(2): 95-100.
- [3] 邵之江,张德秀,史传衣.放射性视神经病变的临床分析[J].临床眼科杂志,2010,18(4):361-364.
- [4] 王伟,张秀兰,魏世辉.放射性视网膜病变的研究现状[J].中华眼科杂志,2012,48(12):1132-1135.
- [5] 杨晖,王伟,胡慧玲,等.放射性视神经病变临床分析[J].中华眼科杂志,2011,47(12):1071-1075.

- [6] 张淳,李志英,李景恒.益气活血开窍明目中药治验视野缺损2例[J].中外医疗,2008(24):86.
- [7] 贺燕,戴宏伟,姬林,等.活血化瘀中药对脑出血大鼠神经功能和脑组织形态及血流灌注的影响[J].临床神经病学杂志,2010,23(5):363-366.
- [8] 黄静,周平.放射性视神经病变研究进展[J].医学综述,2006,12(5):291-293.
- [9] Levy RL, Miller NR. Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced optic neuropathy[J]. Ann Acad Med Singapore, 2006, 35(3): 151-157.
- [10] Delanian S, Lefaix JL, Pradat PF. Radiation-induced neuropathy in cancer survivors [J]. Radiother Oncol, 2012, 105(3): 273-282.
- [11] Sen U, Tyagi N, Patibandla PK, et al. Fibrinogen-induced endothelin-1 production from endothelial cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(4): 840-847.
- [12] 吴志美,许亮亮,王伟鹏.Hcy、vWF在糖尿病视网膜病变患者中的水平及关系[J].牡丹江医学院学报,2010,31(5):30-31.
- [13] 吴沂旒,郝进.川芎嗪对视网膜保护作用机制的研究及临床应用[J].中国中医眼科杂志,2012,22(1):72-75.
- [14] 王世龙,林原,唐泽耀.川芎嗪在各类神经系统损伤中的保护作用及其机制研究进展[J].中国药理学通报,2010,26(4):438-442.
- [15] 任重,李鸿章.黄芪注射液药理作用及临床应用概述[J].中医研究,2009,22(10):62-64.
- [16] 郑文龙,楼正家,李廷谦,等.黄芪和川芎嗪对慢性阻塞性肺疾病血瘀证血浆内皮素-1及内毒素水平的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(3):142-145.
- [17] 黄川峰.醒脑静注射液对脑缺血再灌注损伤小鼠血清IL-6和TNF- α 水平影响[J].中国实用医药,2012,7(35):244-245.
- [18] 徐元虎.醒脑静注射液的药理药效学研究与应用现状[J].现代中西医结合杂志,2010,19(4):507-510.

(责任编辑:黎国昌)

清热利胆解毒方对铜负荷大鼠学习记忆行为的影响

方向, 金珊, 鲍远程, 陈怀珍

安徽中医药大学第一附属医院脑病中心, 安徽 合肥 230031

[摘要] 目的: 观察清热利胆解毒方对铜负荷饮食大鼠空间学习记忆行为的影响。方法: 100只雄性大鼠适应性喂养1周后, 随机分为空白对照组, 模型对照组, 清热利胆解毒方组, 清热利胆解毒方加青霉胺组, 青霉胺组。每组20只。正常对照组喂食普通饲料, 其余各组予含硫酸铜1g/kg的粉状饲料和含量为0.185%硫酸铜的去离子水喂养, 第7周开始药物治疗, 第8周后采用Morris水迷宫实验测试大鼠学习记忆能力。结果: 平均潜伏期模型对照组较空白对照组明显延长 ($P < 0.01$), 清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较空白对照组延长 ($P < 0.05$); 清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较模型对照组平均潜伏期显著减少 ($P < 0.01$)。穿越原平台位置次数模型对照组较空白对照组明显减少 ($P < 0.01$), 清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较空白对照组减少 ($P < 0.05$); 清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较模型对照组平均潜伏期显著减少 ($P < 0.01$)。结论: 清热利胆解毒方可以改善铜负荷大鼠的学习记忆障碍。

[关键词] 清热利胆解毒方; 肝豆状核变性; 学习记忆; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 08-0188-02

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.08.085

[收稿日期] 2013-03-14

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (编号: 81102592); 安徽省高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2013Z170)

[作者简介] 方向 (1976-), 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合神经病学。