

刘志强,李亚坤,白玫,等. 基于 VEGF 途径探究丹参素对大鼠视网膜静脉阻塞及对视网膜功能的改善作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 52-60.

Liu ZQ, Li YK, Bai M, et al. Mechanism of Danshensu in retinal vein occlusion and retinal functions in rats *via* the VEGF pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 52-60.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.007

基于 VEGF 途径探究丹参素对大鼠视网膜静脉阻塞 及对视网膜功能的改善作用机制

刘志强*, 李亚坤, 白玫, 郭向东, 梁春利

(河北北方学院附属第二医院眼科, 河北 张家口 075100)

【摘要】 目的 探讨丹参素对视网膜静脉阻塞(RVO)大鼠的改善作用及可能机制。**方法** 随机选择 8 只 SPF 级雄性 SD 大鼠作为对照组, 剩余大鼠左眼利用孟加拉红联合激光光动力法诱导 BRVO 模型, 成模大鼠随机分为模型组、丹参素低(15 mg/kg)、中(30 mg/kg)、高剂量组(60 mg/kg), 每组各 8 只, 对照组及模型组大鼠每日经尾静脉注射等量生理盐水, 连续 21 d。荧光素眼底血管造影(FFA)技术观察视网膜静脉结构; 耳静脉微循环检测静脉血液流速; 全视野视网膜电图(fERG)评估视网膜功能; 光学相干断层扫描(OCT)测量视网膜层厚度; HE 染色观察视网膜组织学变化; RT-qPCR 技术检测 VEGF mRNA 相对表达量; Western blot 技术检测视网膜组织中缺氧诱导因子 1 α (HIF1 α)、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)、p-ERK1/2、黏着斑激酶(FAK)、p-FAK、VEGF 及色素上皮衍生因子(PEDF)蛋白表达情况。**结果** 给药前, 与对照组比较, 模型大鼠视网膜静脉血流中断、远端血管迂曲、扩张, 视网膜厚度增加, fERG a 波、b 波振幅降低, 耳静脉血液流速降低($P<0.05$); 给药后, 与对照组比较, 模型组及丹参素三个给药组大鼠视网膜静脉阻塞处再通, 视网膜厚度、fERG a 波、b 波振幅及耳静脉血液流速降低($P<0.05$), 视网膜存在不同程度损伤, 模型组大鼠视网膜结构不完整, 神经节细胞层(GCL)细胞数目减少, 外核层(ONL)感光细胞层几乎丧失, 视网膜组织中 VEGF mRNA 及蛋白和 HIF1 α 、p-ERK1/2、p-FAK 蛋白相对表达量升高, PEDF 蛋白相对表达量降低($P<0.05$); 与模型组比较, 丹参素三个给药组大鼠上述指标及因子表达水平均逆转($P<0.05$), 视网膜病理损伤逐渐减轻; 丹参素作用效果呈剂量依赖性($P<0.05$)。**结论** 丹参素可减轻 RVO 大鼠视网膜组织损伤, 促进阻塞静脉微循环恢复并改善视网膜功能, 其作用机制可能与抑制 VEGF 血管生成相关途径的激活有关。

【关键词】 丹参素; 视网膜静脉阻塞; 视网膜功能; 血管内皮生长因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0052-09

Mechanism of Danshensu in retinal vein occlusion and retinal functions in rats *via* the VEGF pathway

LIU Zhiqiang*, LI Yakun, BAI Mei, GUO Xiangdong, LIANG Chunli

(Ophthalmology Department of the Second Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075100, China)

【Abstract】 Objective To investigate the ameliorative effect and possible mechanism of Danshensu in retinal vein occlusion (RVO) rats. **Methods** Eight SPF grade male SD rats were randomly selected as the control group. The RVO

【基金项目】 张家口市重点研发计划项目(2021070D)。

【作者简介】 刘志强(1981—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 眼底疾病。E-mail: zhongli92658811477@163.com

model was induced by Bengal red combined with the laser photodynamic method in the left eye of the remaining rats. The model rats were randomly divided into model, Danshensu low (15 mg/kg), medium (30 mg/kg), and high dose group (60 mg/kg), with eight rats in each group. Rats in control and model groups were injected with the same amount of normal saline through the caudal vein every day for 21 days. Fundus fluorescein angiography was used to observe the retinal vein structure. The venous blood flow velocity was measured by ear vein microcirculation. A full field electroretinogram (ffERG) was used to evaluate retinal functions. The retinal layer thickness was measured by optical coherence tomography. Histological changes of the retina were observed by HE staining. The relative expression of VEGF mRNA was measured by RT-qPCR. Expression of hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α), extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2), p-ERK1/2, focal adhesion kinase (FAK), p-FAK, VEGF, and pigment epithelium-derived factor (PEDF) in retinal tissue was detected by Western blot. **Results** Before administration, compared with the control group, the retinal vein blood flow of model rats was interrupted, distal blood vessels were tortuous and dilated, the retinal thickness was increased, the amplitudes of ffERG a and b waves were decreased, and the blood flow velocity of the ear vein was decreased ($P < 0.05$). After administration, compared with the control group, retinal vein occlusion was recanalized, the retinal thickness, amplitudes of ffERG a and b waves, and blood flow velocity of the auricular vein were decreased ($P < 0.05$), and the retina was damaged by various degrees. The retinal structure of the model group was incomplete, the number of ganglion cell layer cells was decreased, the photoreceptor cell layer of the outer nuclear layer was almost lost, and relative expression of VEGF mRNA and HIF1 α , p-ERK1/2, and p-FAK proteins was increased in retinal tissue, while the relative expression of PEDF protein was decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the changes in the above indexes and factors in the three Danshensu treatment groups were reversed ($P < 0.05$) and pathological damage of the retina was gradually reduced. The effect of Danshensu was dependent on dose ($P < 0.05$). **Conclusions** Danshensu reduces retinal tissue injury, promotes recovery of blocked venous microcirculation, and improves retinal functions in RVO rats. Its mechanism may be related to inhibiting activation of VEGF-related angiogenesis pathways.

【Keywords】 Danshensu; retinal vein occlusion; retinal function; vascular endothelial growth factor

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

视网膜静脉阻塞 (retinal vein occlusion, RVO) 以视网膜静脉扩张、视网膜及视网膜下出血、黄斑水肿和不同程度的视网膜缺血为特征,是导致视力丧失的第二大常见血管原因^[1]。根据闭塞部位, RVO 主要分为中央 RVO (center RVO, CRVO) 和分支 RVO (branch RVO, BRVO), BRVO 通常发生在动静脉交叉处,而 CRVO 位于或靠近视神经筛板, BRVO 患病率约为 CRVO 的 5 倍^[2]。抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 已被用作继发于 BRVO 的黄斑水肿的护理标准,可抗血管新生和积液,显著改善视力,但其效果不是治愈性的^[3],故积极探索改善作用明显且副作用小的其他治疗策略对 RVO 预后具有重要意义。丹参素是丹参的主要活性亲水成分之一,可调节血管生成、扩张冠状动脉、抑制血小板聚集并改善微循环,在中药中用于人体多种缺血性相关疾病治疗^[4]。研究发现,通过调节 VEGF- α 加速视网膜血管微循环有利于减轻 BRVO 视网膜水肿并改善视网膜功能^[5],但关于丹参素是否可通过 VEGF 途径改善 BRVO 大鼠视网膜功能尚未见报道,故本实验拟通过构建 BRVO 大鼠模型,给予丹参素干预,通过观

察丹参素对视网膜结构及功能的影响,并探讨其可能参与机制,以期对 RVO 治疗策略制定及用药选择提供一定的参考资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 6 周龄雄性 SD 大鼠 45 只,体重为 (200 $\pm$ 10) g,购自长沙市天勤生物技术有限公司 [SCXK (湘) 2019-0014]。经裂隙灯检查,排除眼部疾患。恒温、恒湿环境下于河北北方学院生命科学研究中心 [SYXK (冀) 2019-0004] 普通饲养,12 h 光照/12 h 黑暗交替,给予充足水和普通饲料,适应性培养 1 周。研究方案经河北北方学院实验动物伦理委员会批准 (IACUC20200042),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

丹参素 (纯度 $\geq 98\%$) (SD8030) 购自北京索莱宝生物有限公司;孟加拉玫瑰红 (纯度 $\geq 95\%$) (632-69-9) 购自 Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司;兔抗 VEGF 多克隆抗体 (ab46154)、兔抗缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF1 α)

(ab216842)、兔抗细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2) (ab184699)、兔抗黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) (ab131435)、兔抗色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) (ab203033) 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 兔抗 p-ERK1/2 多克隆抗体 (bs-3016R) 购自北京博奥森生物科技有限公司; 兔抗 p-FAK 单克隆抗体 (sc-11765-R) 购自 SCBT 公司。

ISOCT 眼科超显微成像系统购自英国 Optoprobe 公司; ZL103 微循环检测仪购自四川佐诚科技有限公司; F-10 共焦激光扫描检眼镜购自日本尼德克公司; BX53 生物荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 系统购自美国 ABI 公司; Gel Doc XR+凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 造模、分组及给药

随机选取 8 只 SD 大鼠作为对照组, 剩余大鼠左眼利用孟加拉红联合激光光动力法诱导 BRVO 模型^[6]: 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 经尾静脉注射 2.5 mL 孟加拉玫瑰红 50 mg/kg, 3 min 后, 丁卡因滴眼液麻醉大鼠左眼, 随后覆盖盖玻片观察眼底(以右眼为对照), 选择离动脉较远的视网膜静脉进行激光照射, 照射点距离视神经 1.5~2.0 视盘直径 (papilla disc, PD), 激光参数: 532 nm 波长绿光, 能量 100 mW, 光斑直径 50 μm , 曝光时间 0.2 s, 激光点数 100 次, 见激光处静脉变细, 血流中断, 远端静脉扩张, 形成 1 PD 左右的血栓即提示造模成功, 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA) 技术观察视网膜静脉结构; 对照组 (Control) 仅尾静脉注射生理盐水, 不施以激光诱导。成模大鼠 34 只, 随机剔除 2 只, 剩余大鼠随机分为模型组 (Model)、丹参素低 (Danshensu-L)、中 (Danshensu-M)、高剂量组 (Danshensu-H), 每组各 8 只, 24 h 后给药。其中丹参素低、中、高剂量组^[7]大鼠每日经尾静脉分别注射丹参素 15 mg/kg、30 mg/kg、60 mg/kg, 对照组及模型组大鼠仅注射等量生理盐水, 连续 21 d。

1.3.2 FFA 技术观察给药前后视网膜静脉结构

给药前后, 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 复方托吡卡胺滴眼液 (5 mg/mL) 充分扩瞳, 腹腔注射 1 mL/kg 10% 荧光素钠注射液, 结膜颜色呈

黄色变化后, 利用共焦激光扫描检眼镜进行眼底观察并拍照。

1.3.3 耳静脉微循环检测评估静脉阻塞预后

给药前后, 使用微循环检测器检测耳部静脉血液流速。

1.3.4 全视野视网膜电图 (full field electroretinogram, fERG) 评估视网膜功能

给药结束后, 各组大鼠均接受黑暗适应 12 h 以上, 在昏暗、红灯环境下记录。戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 丁卡因滴眼液进行角膜麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液 (5 mg/mL) 充分扩瞳, 将氯化银轻放至角膜中心作为记录电极, 在颊部和尾部分别放置不锈钢电极针分别作为参考电极和接地电极。暗室中根据 ISCEV 指南, 测量并记录 ERG a 波和 b 波振幅。光刺激下, 开始有一个负波, 称 a 波, 后出现一个正的 b 波; a 波振幅指的是从基线到 b 波波谷谷底部的垂直距离, 单位为 μV ; b 波振幅指的是 a 波波谷到 b 波波峰的垂直距离, 单位为 μV 。

1.3.5 光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 测量给药前后视网膜层厚度

给药前后, 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 复方托吡卡胺滴眼液 (5 mg/mL) 扩瞳并进行 OCT 扫描, 加替沙星眼用凝胶用作偶联凝胶, 线性 OCT 扫描由一系列 1024 个单点 A 扫描组成, 利用视网膜成像系统和 ISOCT 显微镜成像系统从每只眼睛的 20 个位置捕获 OCT 图像, OCT 图像分析软件计算视网膜厚度。

1.3.6 HE 染色观察视网膜组织学变化

上述实验结束后, 对大鼠施行安乐死, 迅速摘除各组大鼠左眼球, 4% 多聚甲醛固定 48 h, 根据静脉阻塞部位制备 5 μm 厚度石蜡切片, 苏木精染色 5 min, 伊红液复染 30 s, 1% 盐酸乙醇分化 10 s, 流动自来水洗涤, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 晾干后中性树胶封片, 镜下观察光凝部位神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL)、内核层 (inner nuclear layer, INL) 和外核层 (outer nuclear layer, ONL) 变化并采集图片。

1.3.7 RT-qPCR 技术检测视网膜组织中 VEGF mRNA 相对表达量

TRIzol 试剂提取各组大鼠视网膜组织总 RNA, 测定其浓度及完整性合格后, 将 RNA 逆转录为 cDNA。送至上海生工合成。制备 RT-qPCR 反应体

系,2000 r/min 离心 5 min,避光,于实时荧光定量 PCR 仪内进行定量检测,反应条件为 95℃ 10 min,95℃ 15 s 和 60℃ 30 s 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法量化 mRNA 表达水平。引物序列由 Primer Premier 软件设计,引物序列如下:VEGF:上游引物:5'-CTGGCTTTACTGCTGTACCTCCACC-3'、下游引物:5'-GGCACACAGGACGGCTTGAA-3';GAPDH:上游引物:5'-CCATTCTTCCACCTTTGATGCT-3'、下游引物:5'-TGTTGCTGTAGCATATTCATTGT-3'。

1.3.8 Western blot 检测视网膜组织相关蛋白表达
各组大鼠视网膜组织经 RIPA 裂解液匀浆裂解,4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min 取上清,BCA 法测定蛋白浓度,统一浓度后加热变性蛋白,SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,后转膜蛋白至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温孵育 2 h,与一抗(1:1000)4℃ 下孵育过夜,后将膜与 HRP 偶联二抗(1:10000)稀释室温孵育 1 h,增强化学发光剂用于蛋白可视化。Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 灰度值比值表示蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

Excel 建表后,用 SPSS 25.0 软件进行组间数据显著性检验,采用单因素 ANOVA 检验耳静脉血液流速、fERG a 波与 b 波振幅、视网膜层厚度、因子

mRNA 及蛋白相对表达量,数据统计结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

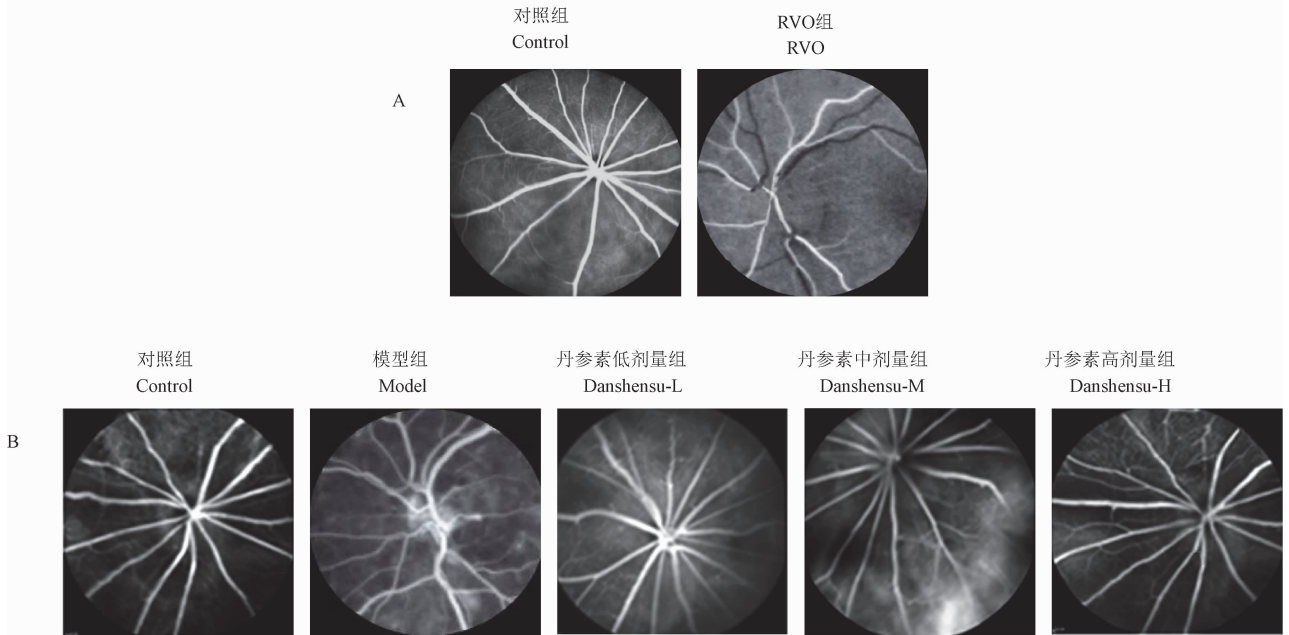
2 结果

2.1 各组大鼠给药前后视网膜静脉结构

FFA 显示,给药前,与对照组大鼠视网膜血管网络比较,RVO 组大鼠视网膜见有明显静脉血流阻塞,静脉血管远端迂曲、扩张并伴有出血;给药治疗 21 d 后,与对照组比较,模型组大鼠视网膜阻塞处血流再通,侧支循环丰富,远处末端血管较细,弯曲且不规则,并见有荧光渗漏;与模型组比较,丹参素低、中、高剂量组大鼠视网膜静脉循环恢复,形状逐渐规则,侧支血管新生逐渐减少。见图 1。

2.2 各组大鼠给药后耳静脉微循环情况

给药前,与对照组比较,模型大鼠耳静脉血液流速降低($P<0.05$)。给药后,与对照组比较,模型组及丹参素 3 个给药组大鼠耳静脉血液流速降低($P<0.05$);与模型组比较,丹参素 3 个给药组大鼠耳静脉血液流速升高($P<0.05$),提示静脉阻塞微循环有所改善;丹参素低、中、高剂量组耳静脉血液流速依次升高($P<0.05$),提示丹参素改善静脉微循环作用呈剂量依赖性。与给药前比较,给药后模型组及丹参素 3 个给药组大鼠耳静脉血液流速均升高($P<0.05$)。见表 1。



注:A:治疗前;B:治疗后。

图 1 给药前后大鼠 FFA 所示视网膜结构特征

Note. A, Before treatment. B, After treatment.

Figure 1 Retinal structural features of rats as shown by FFA before and after administration

2.3 各组大鼠给药前后 fERG a 波、b 波振幅

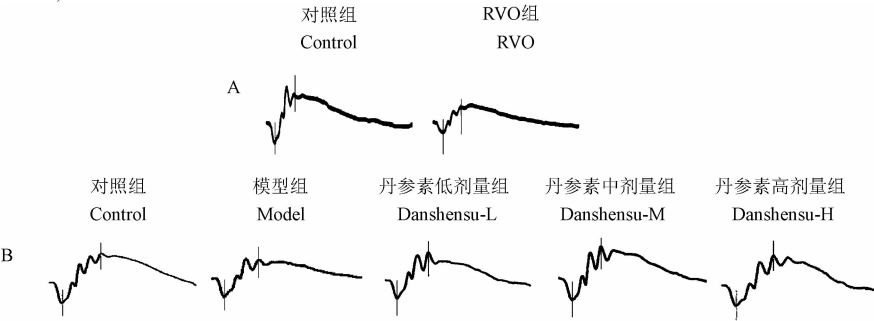
给药前,与对照组比较,模型大鼠 fERG a 波、b 波振幅降低($P<0.05$)。给药后,与对照组比较,模型组及丹参素 3 个给药组大鼠 fERG a 波、b 波振幅降低($P<0.05$),提示视网膜功能障碍;与模型组比较,丹参素 3 个给药组大鼠 fERG a 波、b 波振幅

升高($P<0.05$),提示丹参素可改善视网膜功能障碍;丹参素低、中、高剂量组大鼠 fERG a 波、b 波振幅依次升高($P<0.05$),提示丹参素改善视网膜功能障碍作用呈剂量依赖性。与给药前比较,给药后模型组及丹参素 3 个给药组大鼠 fERG a 波、b 波振幅均升高($P<0.05$)。见图 2,表 2。

表 1 给药前后大鼠耳静脉血液流速比较($\bar{x}\pm s, n=8, \mu\text{m/s}$)
Table 1 Comparison of blood flow velocity of rat ear vein before and after administration

组别 Group	给药前 Before treatment	给药后 After treatment	<i>t</i>	<i>P</i>
对照组 Control	538.38±14.32	539.90±9.78	0.248	0.808
模型组 Model	245.14±5.93 [*]	311.06±7.87 [*]	18.921	0.000
丹参素低剂量组 Danshensu-L	246.33±6.30 [*]	357.54±7.03 ^{*#}	33.321	0.000
丹参素中剂量组 Danshensu-M	246.75±9.88 [*]	414.32±5.63 ^{*##}	41.680	0.000
丹参素高剂量组 Danshensu-H	242.28±9.65 [*]	492.03±10.98 ^{*##}	48.324	0.000

注:与对照组比较, ^{*} $P<0.05$;与模型组比较, [#] $P<0.05$;与丹参素低剂量组比较, ^{*} $P<0.05$;与丹参素中剂量组比较, [⊙] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$. Compared with Danshensu-L group, ^{*} $P<0.05$. Compared with Danshensu-M, [⊙] $P<0.05$.



注:A:治疗前;B:治疗后。

图 2 大鼠视网膜给药前后 ERG

Note. A, Before treatment. B, After treatment.

Figure 2 ERG of rat retina before and after administration

表 2 给药前后大鼠 fERG a 波、b 波振幅比较($\bar{x}\pm s, n=8, \mu\text{V}$)
Table 2 Comparison of a wave and b wave amplitudes of fERG in rats before and after administration

组别 Group	波形 Wave	给药前 Before treatment	给药后 After treatment	<i>t</i>	<i>P</i>
对照组 Control	a	158.27±6.42	161.84±7.16	1.05	0.312
	b	387.19±19.20	394.10±18.10	0.741	0.471
模型组 Model	a	69.02±4.99 [*]	82.05±3.87 [*]	5.836	0.000
	b	125.19±6.32 [*]	140.24±8.96 [*]	3.882	0.000
丹参素低剂量组 Danshensu-L	a	64.48±5.73 [*]	99.09±6.24 ^{*#}	11.555	0.000
	b	122.95±8.01 [*]	186.39±15.42 ^{*#}	10.326	0.000
丹参素中剂量组 Danshensu-M	a	67.97±3.60 [*]	126.16±6.11 ^{*##}	23.208	0.000
	b	118.42±7.96 [*]	254.72±18.72 ^{*##}	18.925	0.000
丹参素高剂量组 Danshensu-H	a	69.47±4.34 [*]	141.06±7.84 ^{*##}	22.596	0.000
	b	119.61±9.62 [*]	312.27±13.61 ^{*##}	32.696	0.000

注:与对照组比较, ^{*} $P<0.05$;与模型组比较, [#] $P<0.05$;与丹参素低剂量组比较, ^{*} $P<0.05$;与丹参素中剂量组比较, [⊙] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$. Compared with Danshensu-L group, ^{*} $P<0.05$. Compared with Danshensu-M, [⊙] $P<0.05$.

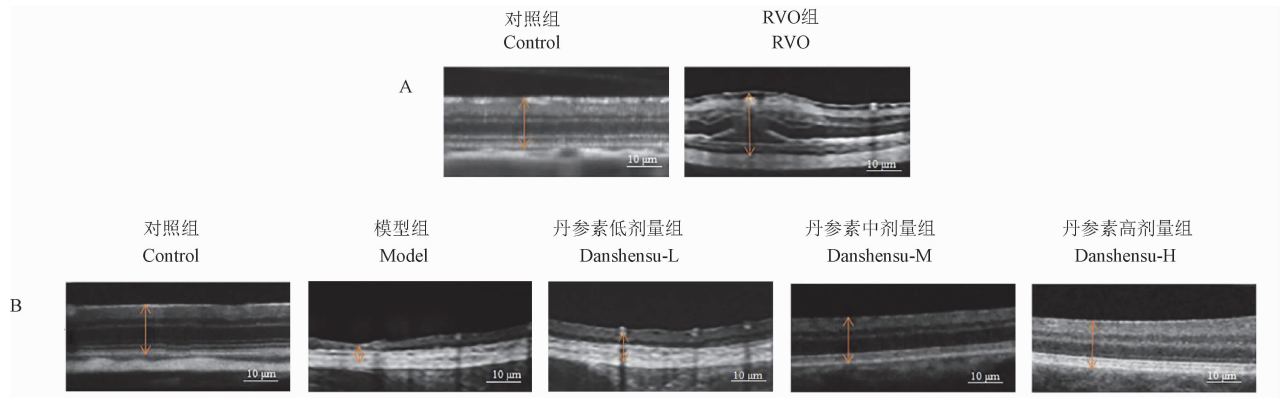
2.4 各组大鼠给药前后视网膜层厚度

给药前,与对照组比较,模型大鼠视网膜层厚度增加($P<0.05$),提示视网膜水肿。给药后,与对照组比较,模型组及丹参素 3 个给药组大鼠视网膜厚度均降低($P<0.05$),提示视网膜组织发生结构性病理损伤;与模型组比较,丹参素 3 个给药组大鼠视网膜厚度增加($P<0.05$);丹参素低、中、高剂量组大鼠视网膜厚度依次增加($P<0.05$),提示丹参素给药可减轻视网膜组织结构损伤。与给药前比较,给药

后模型组及丹参素 3 个给药组大鼠视网膜厚度均降低($P<0.05$)。见图 3,表 3。

2.5 视网膜组织学变化

HE 染色结果显示,与对照组比较,模型组大鼠视网膜结构不完整,GCL 细胞核数目减少,ONL 感光细胞层几乎丧失;与模型组比较,丹参素低、中、高剂量组大鼠视网膜结构逐渐恢复完整性,损伤逐渐减轻,GCL 细胞逐渐增加,ONL 逐渐增厚,INL 结构变化不显著。见图 4。



注:A:治疗前;B:治疗后。

图 3 给药前后大鼠视网膜 OCT 图

Note. A, Before treatment. B, After treatment.

Figure 3 OCT of rat retina before and after administration

表 3 给药前后大鼠视网膜层厚度比较($\bar{x}\pm s, n=8, \mu\text{m}$)

Table 3 Comparison of retinal layer thickness of rats before and after administration

组别 Group	给药前 Before treatment	给药后 After treatment	<i>t</i>	<i>P</i>
对照组 Control	206.14±3.61	206.90±3.83	0.408	0.689
模型组 Model	271.72±5.57 [*]	92.50±6.42 [*]	58.704	0.000
丹参素低剂量组 Danshensu-L	268.77±5.56 [*]	113.53±5.67 ^{*#}	55.292	0.000
丹参素中剂量组 Danshensu-M	270.17±8.69 [*]	149.44±8.58 ^{*##}	27.962	0.000
丹参素高剂量组 Danshensu-H	268.42±8.53 [*]	178.51±9.70 ^{*##[⊙]}	19.712	0.000

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与丹参素低剂量组比较,^{**} $P<0.05$;与丹参素中剂量组比较,[⊙] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$. Compared with Danshensu-L group, ^{**} $P<0.05$. Compared with Danshensu-M, [⊙] $P<0.05$.

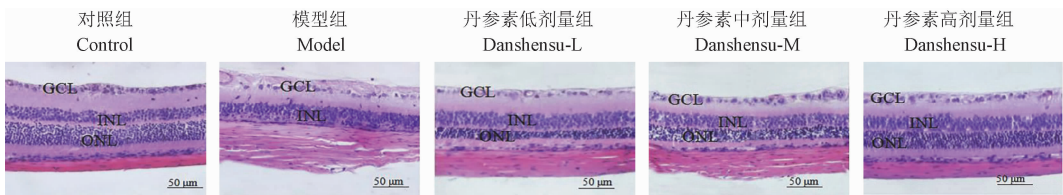


图 4 大鼠视网膜切片 HE 染色结果

Figure 4 HE staining results of rat retinal sections

2.6 视网膜组织中 VEGF mRNA 相对表达量

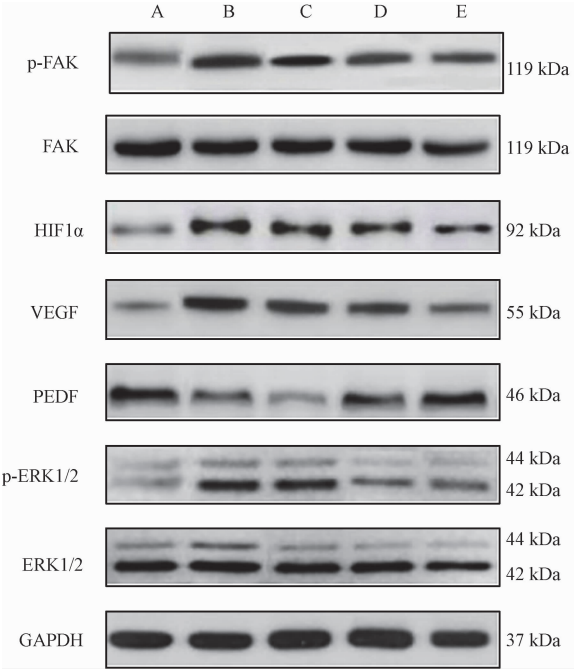
与对照组 (1.00 ± 0.01) 比较, 模型组 (3.36 ± 0.15) 和丹参素低 (2.85 ± 0.10)、中 (1.93 ± 0.06)、高 (1.34 ± 0.07) 3 个给药组大鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 相对表达量升高 ($P < 0.05$), 提示血管生成增加; 与模型组比较, 丹参素 3 个给药组大鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$), 提示丹参素给药可减少血管生成; 丹参素低、中、高剂量组大鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 相对表达量依次降低 ($P < 0.05$)。

2.7 视网膜组织中 VEGF 途径相关蛋白表达

组间视网膜组织中 ERK1/2 及 FAK 总蛋白相对表达量无显著性差异 ($P > 0.05$); 与对照组比较, 模型组及丹参素 3 个给药组大鼠视网膜组织中 HIF1 α 、p-ERK1/2、p-FAK 及 VEGF 蛋白相对表达量升高, PEDF 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丹参素 3 个给药组大鼠视网膜组织中 HIF1 α 、p-ERK1/2、p-FAK 及 VEGF 蛋白相对表达量降低, PEDF 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$); 丹参素低、中、高剂量组大鼠视网膜组织中 HIF1 α 、p-ERK1/2、p-FAK 及 VEGF 蛋白相对表达量依次降低, PEDF 蛋白相对表达量依次升高 ($P < 0.05$)。见图 5, 表 4。

3 讨论

静脉循环阻塞可使毛细血管腔内压力升高, 引发视网膜出血和液体渗漏, 导致视网膜灌注减少发生缺血缺氧性损伤进而导致 VEGF 上调^[8], VEGF 是视网膜和脉络膜新生血管形成的主要刺激物, 其过度生成伴随着组织细胞缺氧, 且可进一步增加血



注: A: 对照组; B: 模型组; C: 丹参素低剂量组; D: 丹参素中剂量组; E: 丹参素高剂量组。

图 5 视网膜组织中相关蛋白 Western blot 条带图
Note. A, Control group. B, Model group. C, Danshensu-L. D, Danshensu-M. E, Danshensu-H.

Figure 5 Western blot bands of related proteins in retinal tissue

管通透性, 引起黄斑水肿进而影响视力^[9], 抗 VEGF 相关药物的探索已成为目前 RVO 治疗的重点研究方向。

丹参是最常用的活血化瘀中药之一, 丹参素为其主要活性成分, 研究发现, 丹参素可改善脑血管发生病理性改变时引起的脑出血、脑梗塞及脑血流量灌注不足^[10]。本研究为探讨丹参素对 BRVO 进

表 4 给药后大鼠视网膜组织中 VEGF 途径相关蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Comparison of VEGF pathway related protein expression in rat retina after administration

组别 Group	HIF1 α	ERK1/2	p-ERK1/2	FAK	p-FAK	VEGF	PEDF
对照组 Control group	0.08 $\pm$ 0.01	0.71 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.01	0.87 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.03
模型组 Model group	0.33 $\pm$ 0.03 *	0.72 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.02 *	0.86 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.03 *	0.48 $\pm$ 0.01 *	0.13 $\pm$ 0.02 *
丹参素低剂量组 Danshensu-L	0.27 $\pm$ 0.03 * #	0.69 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.02 * #	0.85 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.04 * #	0.42 $\pm$ 0.02 * #	0.19 $\pm$ 0.01 * #
丹参素中剂量组 Danshensu-M	0.21 $\pm$ 0.02 * # ※	0.71 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.02 * # ※	0.85 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03 * # ※	0.31 $\pm$ 0.02 * # ※	0.26 $\pm$ 0.01 * # ※
丹参素高剂量组 Danshensu-H	0.16 $\pm$ 0.02 * # ※ ⊙	0.69 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.02 * # ※ ⊙	0.84 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.03 * # ※ ⊙	0.18 $\pm$ 0.02 * # ※ ⊙	0.43 $\pm$ 0.02 * # ※ ⊙

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与丹参素低剂量组比较, ※ $P < 0.05$; 与丹参素中剂量组比较, ⊙ $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with Danshensu-L group, ※ $P < 0.05$. Compared with Danshensu-M, ⊙ $P < 0.05$.

展及视网膜功能的影响及可能作用机制,利用光敏剂孟加拉玫瑰红静脉注射联合激光光动力形成血栓方法制备 BRVO 大鼠模型,见模型大鼠视网膜静脉血中断、充盈延迟、远端静脉迂曲、扩张,耳静脉血液流速降低,视网膜层厚度增加,ffERG a 波及 b 波振幅降低,表明模型大鼠视网膜发生静脉阻塞、微循环障碍、水肿且视力受损,提示成功造模;通过丹参素治疗后,见大鼠视网膜静脉循环恢复,视力障碍减轻且侧支血管减少,提示丹参素可能通过抑制血管新生并促进静脉阻塞微循环恢复改善 BRVO 大鼠视网膜的静脉阻塞。

ffERG 代表视网膜对闪光的电响应,可定性和定量地评估视网膜功能^[11]。a 波测量视网膜感光器响应,b 波起源于双极细胞及 Müller 细胞,反映了视网膜 INL 细胞的电活动^[12],a 波及 b 波振幅降低提示视网膜功能障碍^[13]。OCT 成像可显示各种眼病和神经系统疾病的结构变化^[14],视网膜内层紊乱可用于预测 BRVO 预后^[15]。ONL 由感光视锥细胞和视杆细胞组成,为评估视网膜功能的生物标志物,且可能是视网膜敏感性的最佳结构预测指标;INL 有助于光信号转导,GCL 由网膜神经节细胞组成,可将视网膜处理后的视觉信息编码为神经冲动传输到脑细胞^[16-17]。研究发现,静脉阻塞早期(1~3 d)可见视网膜水肿,厚度增加,后期(14 d、30 d)视网膜层厚度降低,ONL 层感光细胞丢失^[18],视网膜厚度的降低往往伴随 a 波和 b 波振幅的下降^[19]。本研究结果显示,21 d 后,模型组大鼠视网膜层厚度降低,ONL 层几乎不可见,GCL 层细胞核稀疏,且视网膜结构不完整,提示视网膜厚度降低可能是由于 ONL 层感光细胞凋亡或丢失导致,且视网膜的视觉功能可能存在一定损伤;经丹参素治疗后,视网膜厚度、ONL 层及 GCL 层细胞数目增加,a 波和 b 波振幅升高,提示丹参素可能通过减少 RVO 晚期 ONL 感光细胞缺失,减轻视网膜结构病理损伤,抵抗视网膜细胞电活动下降,从而发挥对 BRVO 大鼠视网膜视觉功能的改善作用。

所有缺血缺氧性视网膜血管疾病的共同状态为 VEGF 的合成诱导,VEGF 的过表达是视网膜新生血管形成和血管渗漏的主要原因,可加重视网膜病理损伤及视觉障碍^[20]。VEGF 表达受多种因素调节,据报道,HIF1 α 对氧浓度高度敏感,发生缺氧刺激时,HIF1 α 进入细胞核,与 HIF1 β 形成二聚体,在缺血缺氧条件下参与 VEGF 介导的血管生成^[21],

实验性 BRVO 可导致缺氧和内部血-视网膜屏障破坏,同时伴随 HIF1 α 、VEGF 的表达增加^[22]。VEGF、p-ERK、p-FAK 已被有力证明可促进视网膜血管生成^[23]。研究发现,使用小分子破坏 FAK 和桩蛋白相互作用可减少受刺激的视网膜内皮细胞迁移和 VEGF 表达^[24],FAK 是一种非受体酪氨酸激酶,其自磷酸化可激活 ERK 通路分子,ERK1/2 通过可促进 VEGF 信号传导和血管生成^[25],VEGF 也可通过磷酸化 ERK1/2 可促进血管生成^[26],抑制 p-ERK、p-FAK 和 VEGF 串扰被认为是一种抗视网膜血管生成的策略。PEDF 为重要的抗血管生成因子,在视网膜中主要由视网膜色素上皮表达,对光感受器和视网膜神经元细胞存活和新生血管的抗病理侵袭具有调节作用^[27]。研究发现,丹参素可降低兔血管增生性视网膜病变过程中 VEGF 含量,改善局部缺氧环境^[28],本研究结果显示,经丹参素治疗后,BRVO 大鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 及蛋白相对表达水平降低,同时 HIF1 α 、p-FAK 及 p-ERK 蛋白相对表达量降低,PEDF 蛋白相对表达量升高,提示丹参素可能通过抑制 BRVO 大鼠视网膜 VEGF 血管生成途径激活,抑制血管生成,减轻视网膜结构病理损伤及血管通透性,促进微循环恢复,进而改善视网膜功能。

综上所述,丹参素可改善大鼠 RVO 及视网膜功能,其作用机制可能与抑制 VEGF 相关途径激活,抑制血管生成并促进缺血缺氧条件下视网膜微循环恢复有关。

参考文献:

- [1] Jonas JB, Monés J, Glacet-Bernard A, et al. Retinal vein occlusions [J]. Dev Ophthalmol, 2017, 58: 139-167.
- [2] Song P, Xu Y, Zha M, et al. Global epidemiology of retinal vein occlusion: a systematic review and meta-analysis of prevalence, incidence, and risk factors [J]. J Glob Health, 2019, 9 (1): 010427.
- [3] Spooner K, Hong T, Fraser-Bell S, et al. Current outcomes of anti-VEGF therapy in the treatment of macular edema secondary to central retinal vein occlusions: a systematic review and meta-analysis [J]. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2019, 8 (3): 236-246.
- [4] Wei ZZ, Chen D, Liu LP, et al. Enhanced neurogenesis and collateralogenesis by sodium danshensu treatment after focal cerebral ischemia in mice [J]. Cell Transplant, 2018, 27 (4): 622-636.
- [5] Long P, Yan W, Liu J, et al. Therapeutic effect of traditional Chinese medicine on a rat model of branch retinal vein occlusion

- [J]. J Ophthalmol, 2019, 2019: 9521379.
- [6] 吕小利, 邹红, 黎蕾, 等. 加味桃红四物汤灌胃治疗视网膜静脉阻塞大鼠的实验研究 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(8): 81-88.
- [7] 史云, 顾秀峰, 李玉明, 等. 丹参素通过抑制 miR-199a-5p 对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(6): 1104-1111.
- [8] Osaka R, Nakano Y, Takasago Y, et al. Retinal oximetry in branch retinal vein occlusion [J]. Acta Ophthalmol, 2019, 97(6): e896-e901.
- [9] Campa C, Alivernini G, Bolletta E, et al. Anti-VEGF therapy for retinal vein occlusions [J]. Curr Drug Targets, 2016, 17(3): 328-336.
- [10] 钱思远. 丹参素通过改善脑微循环障碍减轻血管性痴呆小鼠的神经元损伤 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [11] Katagiri S, Nishina S, Yokoi T, et al. Retinal structure and function in eyes with optic nerve hypoplasia [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42480.
- [12] Molnar AEC, Andréasson SO, Larsson EKB, et al. Reduction of rod and cone function in 6.5-year-old children born extremely preterm [J]. JAMA Ophthalmol, 2017, 135(8): 854-861.
- [13] Matsushima T, Yoshikawa Y, Shimura A, et al. Electrophysiological monitoring of focal and entire retinal function during treatment with intravitreal methotrexate for intraocular lymphoma [J]. Case Rep Ophthalmol, 2021, 12(1): 277-282.
- [14] Montazerin M, Sajjadifar Z, Khalili PE, et al. Livelayer: a semi-automatic software program for segmentation of layers and diabetic macular edema in optical coherence tomography images [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 13794.
- [15] Park HM, Kim YH, Lee BR, et al. Topographic patterns of retinal edema in eyes with branch retinal vein occlusion and their association with macular edema recurrence [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 23249.
- [16] Marques J, Marta A, Baptista PM, et al. Retinal sensitivity and structural changes after focal photocoagulation for diabetic macular edema: a multisectorial comparison [J]. Ophthalmic Res, 2021, 64(6): 960-966.
- [17] Cho HM, Jo YD, Choung SY. Protective effects of *Spirulina maxima* against blue light-induced retinal damages in A2E-laden ARPE-19 cells and Balb/c mice [J]. Nutrients, 2022, 14(3): 401.
- [18] Long P, Yan W, He M, et al. Protective effects of hydrogen gas in a rat model of branch retinal vein occlusion via decreasing VEGF- α expression [J]. BMC Ophthalmol, 2019, 19(1): 112.
- [19] He M, Long P, Guo L, et al. Fushiming capsule attenuates diabetic rat retina damage via antioxidation and anti-inflammation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 5376439.
- [20] Nguyen QD, Heier JS, Do DV, et al. The Tie2 signaling pathway in retinal vascular diseases: a novel therapeutic target in the eye [J]. Int J Retina Vitreous, 2020, 6: 48.
- [21] Xiang Y, Yao X, Wang X, et al. Houshiheisan promotes angiogenesis via HIF-1 α /VEGF and SDF-1/CXCR4 pathways: *in vivo* and *in vitro* [J]. Biosci Rep, 2019, 39(10): BSR20191006.
- [22] Ebnetter A, Kokona D, Schneider N, et al. Microglia activation and recruitment of circulating macrophages during ischemic experimental branch retinal vein occlusion [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(2): 944-953.
- [23] Long L, Li Y, Yu S, et al. Scutellarin prevents angiogenesis in diabetic retinopathy by downregulating VEGF/ERK/FAK/src pathway signaling [J]. J Diabetes Res, 2019, 2019: 4875421.
- [24] Toutounchian JJ, Pagadala J, Miller DD, et al. Novel small molecule JP-153 targets the src-FAK-paxillin signaling complex to inhibit VEGF-induced retinal angiogenesis [J]. Mol Pharmacol, 2017, 91(1): 1-13.
- [25] Quan JH, Ismail HAH, Cha GH, et al. VEGF production is regulated by the AKT/ERK1/2 signaling pathway and controls the proliferation of *Toxoplasma gondii* in ARPE-19 cells [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 184.
- [26] Dong Y, Wu G, Zhu T, et al. VEGF promotes cartilage angiogenesis by phospho-ERK1/2 activation of Dll4 signaling in temporomandibular joint osteoarthritis caused by chronic sleep disturbance in Wistar rats [J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 17849-17861.
- [27] Elahy M, Baidur-Hudson S, Cruzat VF, et al. Mechanisms of PEDF-mediated protection against reactive oxygen species damage in diabetic retinopathy and neuropathy [J]. J Endocrinol, 2014, 222(3): R129-R139.
- [28] Tian XM, Wang R, Zhang BK, et al. Impact of *Lycium Barbarum* Polysaccharide and Danshensu on vascular endothelial growth factor in the process of retinal neovascularization of rabbit [J]. Int J Ophthalmol, 2013, 6(1): 59-61.

[收稿日期] 2022-04-20