

丹栀逍遥散加减对肝郁气滞型新生血管性青光眼的临床应用及机制探讨

段 颖 张淑清 于俊义

(河北省衡水市第四人民医院眼科,衡水,053000)

摘要 目的:观察丹栀逍遥散加减对肝郁气滞型新生血管性青光眼的临床疗效及其与 HIF-1/VEGF/Notch1 信号通路相关性探讨。方法:将 42 例肝郁气滞型新生血管性青光眼患者随机分成 2 组,治疗组给予丹栀逍遥散加减+降眼压药物口服,对照组予降眼压药物,观察 2 组治疗 4 周后眼压、视力、视野、新生血管回退情况等;应用 Western Blot 检测 2 组患者血清中 HIF-1 α 、VEGF、Notch1 蛋白表达情况。结果:2 组经不同方法治疗 4 周后眼压、视力、视野、新生血管情况比较有统计学意义($P < 0.05$),治疗组经丹栀逍遥散加减口服治疗与对照组比较,HIF-1 α 、VEGF、Notch1 的蛋白表达情况明显低于对照组,且有统计学意义($P < 0.05$)。结论:丹栀逍遥散加减治疗新生血管性青光眼可以有效控制眼压,提高视力、视野,促使新生血管消退,是一种安全有效的治疗方式,值得临床推广应用,其作用机制可能是通过调控 HIF-1/VEGF/Notch 信号通路来实现的。

关键词 丹栀逍遥散;肝郁气滞型;新生血管性青光眼;临床应用;HIF/VEGF/Notch;信号通路

Clinical Application of Danzhi Xiaoyao Powder in Treating Neovascular glaucoma of Qi Stagnation due to Depression of Liver and Its Mechanism

Duan Yin, Zhang Shuqing, Yu Junyi

(Ophthalmology Department, Fourth people's hospital, Hengshui 053000, China)

Abstract Objective: To observe clinical curative effect of Danzhi Xiaoyao Powder in the therapy of ganyu qizhi type of neovascular glaucoma(NVG) and deeply investigate the relationship between this effect and HIF-1/VEGF/Notch1 pathway. **Methods:** A total of 42 patients NVG were randomly divided into into 2 groups,21 patients in treatment group were treated with modified Danzhi Xiaoyao Powder and iop drugs,21 patients in control group were treated with only iop drugs. Observe the two groups after treatment of 4 weeks, intraocular pressure, visual, view and new blood vessels. The expression of HIF-1 α 、VEGF、Notch1 at the protein level was assessed by Western Blot. **Results:** Significant differences were observed in terms of intraocular pressure, visual, view and new blood vessels ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of HIF-1 α , VEGF, Notch1 level in the treatment group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Danzhi Xiaoyao Powder in the treatment of NVG may effectively control the intraocular pressure, improve eyesight and restrain new blood vessels. It is a safe and effective treatment, worthy of clinical popularization and application. Its mechanism may be related to the regulation of HIF-1/VEGF/Notch1 signaling pathway.

Key Words Danzhi xiaoyao Powder; Qi stagnation due to depression of liver pattern; NVG; HIF-1/VEGF/Notch1 signaling pathway; Clinical effect

中图分类号:R242;R246.82

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.07.034

新生血管性青光眼(Neovascular glaucoma, NVG)是纤维血管组织在房角增生,导致小梁网阻塞,周边虹膜前粘连和进行性房角关闭,进而眼压升高进而产生的一种继发性青光眼^[1]。近年来,伴随着眼后段广泛缺血性疾病,如糖尿病视网膜病变,视网膜静脉阻塞、高血压、高血脂等发病率的逐年增高,作为其主要并发症的 NVG 的患病率比例也呈上升趋势,并且是一种破坏性强、失明率高的眼病。目前认为 NVG 的发病机制是缺血缺氧刺激引起虹膜及房角

新生血管的产生,缺血缺氧刺激一方面引起新生血管促进因子释放,另一方面也活化血管抑制因子,当促进因子的作用大于抑制因子时,便有新生血管产生^[2]。而在众多的血管生长因子中,血管内皮生长因子(VEGF)在 NVG 的作用最引人注目。HIF-1 蛋白对机体缺血缺氧具有特异性感受,缺血动物模型证实 HIF-1 蛋白具有促进新生血管形成的作用^[3-4]。VEGF 作为 HIF-1 直接调控作用的靶基因之一,两者在缺血后血管新生过程中的关系密切。此外,大量

研究表明缺氧可以提高内皮细胞 Notch 信号通路的活性,同时上调 VEGF 等生长因子在损伤部位的表达,诱导内皮细胞形成新的血管组织,且认为 VEGF 通过 Notch 信号系统起作用^[5-7]。基于中医学认为肝郁气滞型是本病的常见证型之一,本文旨在研究丹栀逍遥散加味治疗肝郁气滞型 NVG 的临床疗效,并进一步探讨其机制。

1 资料与方法

1.1 实验材料 丹栀逍遥散,高速冷冻离心机(Thermo Fisher,美国),电泳槽(Bio-rad,美国),凝胶成像系统(Bio-rad,美国),Hank,S液、PMSF(碧云天,中国),SDS-PAGE 电泳胶(碧云天,中国),HIF-1 α 、VEGF、Notch1 及 β -actin 一抗和碱性磷酸酶标记山羊抗兔(CST 公司,美国)。

1.2 临床资料

1.2.1 一般资料 收集 2012 年 7 月至 2015 年 9 月来我院就诊的 42 例肝郁气滞型 NVG 患者(均签署参与本研究的知情同意书),采用随机数字表法将 42 名患者为治疗组(21 例)和对照组(21 例)。治疗组 21 例中男 14 例,女 7 例,平均年龄(54.1 ± 5.76)岁,发病后青光眼病程 2~13 个月;对照组 21 例中男 13 例,女 8 例,平均年龄(55.3 ± 6.13)岁,发病后青光眼病程 2~15 个月;2 组患者一般资料经统计学比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2.2 入选标准 全部患者经裂隙灯显微镜、前房角镜等检查证实虹膜出现新生血管,并伴有眼压升高,眼压 > 21 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa);虹膜新生血管;房角镜下房角关闭大于 180° ^[8]。未曾行任何手术及激光治疗的 NVG;自愿作为受试对象,签署知情同意书。原发病糖尿病视网膜病变 14 例,视网膜中央静脉阻塞 16 例,视网膜分支静脉阻塞 7 例,视网膜血管炎 5 例。排除标准:心、肝、脑、肾功能不全、肿瘤及 VEGF 有关的疾病者;妊娠及哺乳期妇女;严重精神疾病患者。中医诊断与辨证标准参照《中医眼科学》中肝郁气滞型绿风内障的诊断标准^[9]。

1.2.3 治疗方法 对照组采用降眼压药物治疗(噻吗心安眼水滴眼,1 滴,2 次/d;匹鲁卡品眼水滴眼,1 滴,5 次/d;口服尼目克司,25 mg,2 次/d)。治疗组在对照组治疗基础上加用丹栀逍遥散加减:牡丹皮、栀子、柴胡、当归、白芍、白术各 12 g,茯苓 15 g,吴茱萸 2 g,薄荷 9 g,黄连、甘草各 6 g,生姜 3 g。1 剂/d,每天早晚温服 2 次,连用 4 周。

1.2.4 观察疗效指标 术后观察并记录眼压、视

力、视野、新生血管回退情况。1)眼压:临床治愈:眼压恢复低于 2.74 kPa(21 mmHg);好转:眼压下降至 2.74~3.25 kPa(21~24 mmHg),加用降眼压药物可基本正常;未愈:眼压未降,眼部诸症及全身症状无改善。2)视力:临床治愈:视力恢复至发病前;好转:视力恢复部分但未至发病前;未愈:视力无改善。3)视野:临床治愈:视野恢复至发病前;好转:视野恢复部分但未至发病前;未愈:视野无改善。4)新生血管回退:新生血管全部回退;新生血管部分回退;新生血管未回退。

1.3 标本采集和检测方法及内容 1)血清采集:入院时第 2 天清晨静息空腹状态下,抽取实验对象肘静脉血 20 mL,肝素抗凝后与等量 Hank,S 液对倍稀释充分混匀到 40 mL,按照淋巴细胞分离液:抗凝血稀释液 1:1 的比例,在 15 mL 离心管中加入约 6 mL 淋巴细胞分离液,24~26 $^\circ\text{C}$ 水平离心 2 000 r/min $\times$ 20 min;离心后管内分为五层,血浆和 Hank,S 液、单个核细胞(白色云雾层狭窄带)、分离液、粒细胞、红细胞;用毛细滴管插到云雾,吸取单个核细胞,置入另一离心管中,加入 5 倍以上体积的 Hank,S 液,1 500 r/min $\times$ 10 min,洗涤细胞两次;末次离心后,弃上清,加入含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640,重悬细胞。根据用蛋白酶抑制剂(PMSF)法提取总蛋白。2)根据 DAB 方法对所提蛋白液进行浓度测定后于 100 $^\circ\text{C}$ 金属浴中变性。3)每泳道上样量为 50 μg 蛋白;电泳(4%浓缩胶,12%分离胶,120 V,50 mA,1.5 h)结束后将凝胶取出,用聚偏氟乙烯(PVDF)膜转印,50 V,100 mA,2 h。5%脱脂奶粉液的封闭 2 h,TBS 清洗,分别加入稀释的抗 HIF-1 α 、VEGF、Notch1 和 β -actin 抗体(1:1 000),4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,TBS 清洗,加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG,1:2 000)室温 2 h,TBS 清洗。将滤膜放于显色液中显色后显影,图像由生物分析系统(Bio-Rad 公司,Model Gel Doc 2000,美国)分析处理。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理,计量资料的用 t 检验,计数资料的用 χ^2 检验,相关性分析采用单因素方差分析。所有数据均采用($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

由表 1 可知,2 组经不同方法治疗 4 周后眼压、视力、视野、新生血管情况比较有统计学意义, $P < 0.05$;由图 1 可知,治疗组经丹栀逍遥散加减口服治疗 4 周后与对照组比较,HIF-1 α 、VEGF、Notch1 的蛋白表达情况明显低于对照组,且有统计学意义, $P < 0.05$ 。

表 1 2 组眼压、视力、视野、新生血管情况情况分析对比

组别	眼压			视力			视野			新生血管		
	治愈	好转	未愈	治愈	好转	未愈	治愈	好转	未愈	完全回退	部分回退	未回退
治疗组	14	5	2	13	7	1	15	5	1	11	7	3
对照组	10	6	5	11	5	5	11	7	3	8	7	6

2 组治疗后眼压、视力、视野、新生血管情况比较: χ^2 分别为 7.29、11.98、8.77、3.65,差异有统计学意义($P<0.05$)。

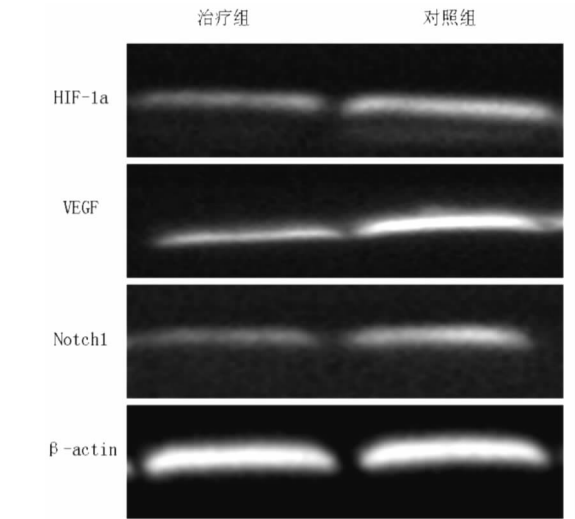


图 1 2 组 HIF-1a、VEGF、Notch1 的蛋白表达情况

表 2 2 组 HIF-1a、VEGF、Notch1 的蛋白相对表达强度

组别	HIF-1a	VEGF	Notch1
治疗组	0.29 ± 0.035 *	0.38 ± 0.041 *	0.31 ± 0.039 *
对照组	0.64 ± 0.112	0.83 ± 0.023	0.62 ± 0.0184

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

NVG 是一种病情重且极难治性的继发性青光眼,其致盲率高达 92.4%^[10]。随着分子生物学和免疫学的飞速发展,眼部新生血管的相关研究已成为国内外眼科专家的热点研究,其中,以研究观察 HIF-1、VEGF 的表达情况及机制最为多见。组织缺血缺氧后 HIF-1 作为血管新生的核心调控因子对血管新生具有重要作用,主要通过以下机制发挥作用:1)上调 VEGF 受体、配体以及 NO,使血管通透性增加为血管形成作好准备;2)降解细胞外基质同时增加金属蛋白水解酶活性为细胞的存活提供环境;3)通过 VEGF 和整合素使血管内皮细胞由血管芽腔形成血管网;4)最后通过血管生成素、血小板衍生生长因子等作用于基质细胞,使新生血管进一步成为成熟血管^[11-12]。VEGF 是目前所发现的功能最强、最直接的血管形成促进因子,被公认为血管生成过程中的中心调节者^[13]。有研究表明,NVG 的发病

与视网膜内 VEGF 表达增加,眼内 VEGF 浓度增高密切相关^[14]。赵君^[15]等研究发现,大鼠角膜碱烧伤后的预后与异常增生的微血管有关,VEGF、HIF-1 二者间的动态平衡的失调促进角膜组织中的微血管形成。Notch 受体介导的信号转导途径参与了新生血管的形成。Hainaud 等^[16]研究发现在小鼠胚胎模型中注射 VEGF 的激活剂使 VEGF 的表达上调,VEGF 的表达上调引起 Notch 信号通路相关信号分子的活化,促进血管生成;此研究表明 Notch 信号通路是 VEGF 的下游靶点,两者共调控新生血管的形成与成熟过程,在血管新生方面发挥重要作用。

中医学对青光眼已有深刻的认识,认为青光眼属“绿风内障”和“青风内障”范畴,是由肝气郁滞、脾湿生痰、肝胆火炽、阴虚阳亢等致气血失和所致。近代医家认为本病多由内伤七情所致。七情所伤,最易伤气,气伤影响及血,使气血同时受病,上乱清道,蒙蔽空窍而发病。丹梔逍遥散出自《内科摘要方》,主要用于治疗肝气郁结、肝血不足、虚热内生的病症。方中以柴胡做为君,疏肝解郁,使肝气调达;白芍性酸苦微寒,养血敛阴,柔肝缓急。当归味辛散,养血和血,乃血中气药。当归与白芍同用,补肝体而调肝用,使血和则肝和,血充则肝柔共为臣药。木郁则土衰,肝病易传脾,故以白术、茯苓、甘草健脾益气,共为佐药。再加用牡丹皮清血中之伏火,梔子清肝热、泻火除烦、导热下行。诸药合用,共奏疏肝解郁、健脾凉血之效,成为治疗青光眼肝郁证型的有效方剂^[17]。

本文通过对比治疗发现 2 组不同方法治疗 4 周后,治疗组经丹梔逍遥散加减口服治疗与对照组比较,眼压、视力、视野、新生血管情况比较有统计学意义。2 组血清提取单核细胞检测 HIF-1a、VEGF、Notch1 的蛋白表达情况,结果显示,治疗组的 HIF-1a、VEGF、Notch1 的蛋白表达明显低于对照组,且有统计学意义。综述表明丹梔逍遥散加减治疗 NVG 可以有效控制眼压,提高视力、视野,促使新生血管消退,是一种安全有效的治疗方式,值得临床推广应用,其作用机制可能是通过调控 HIF/VEGF/Notch 信号通路来抑制血管新生的过程,但具体调控机制

有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Simha A, Braganza A, Abraham L, et al. Anti-vascular endothelial-growth factor for neovascular glaucoma[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013, 10; CD007920.
- [2] Casey R, Li WW. Factom controlling ocular angiogenesis[J]. Am J Ophthalmology, 1997, 124: 521-529.
- [3] Vineent KA, Shyu KG, Luo Y, et al. Angiogenes is induced in a rabbit model of hindlimb isehemia by naked DNA eneoding an HIF-1 alPh/VP16 hybrid transcription factor[J]. Ciroulation, 2000, 102: 2255-2261.
- [4] Elson DA, Thurston G, Huang LE, et al. Induction of hyPervascularity without leak-age or inflammation in transgenic mice over-expressing hypoxiainducible factor-l alpha[J]. Genes Dev, 2001, 15(19): 2520-2532.
- [5] Diez H, Fisehe A, Winkler A, et al. Hypoxia-mediated aetivation of Dll4-notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate[J]. Experimental Cell Research, 2007, 313: 1-9.
- [6] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in caneer and other diseases[J]. Nature, 2000, 407: 249-257.
- [7] Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Beimange AL, et al. Endothelial signaling by the Notch ligand Delta-like 4 restriets angiogenesis[J]. DeveloPment, 2007, 134(5): 839-844.
- [8] 赵家良. 眼科疾病临床诊疗规范教程[S]. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 120-129.
- [9] 廖品正. 中医眼科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 104-107.
- [10] 马进, 陈大本, 张辉. 新生血管性青光眼手术探讨[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2002, 22(2): 145-147.
- [11] Pugh CW, Patchliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hyPoxia; role of the HIF system[J]. Nat. Med, 2003, 9(6): 677-684.
- [12] Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Protein kinases and the hyPoxia-indueible factor-1, two switches inangiogenesis[J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(7): 531-541.
- [13] 赵世红. 血管内皮生长因子及其受体与眼内新生血管性疾病[J]. 眼科研究, 2003, 21(1): 103-106.
- [14] 高永峰. 血管内皮生长因子与视网膜缺血性病变[J]. 国外医学眼科学分册, 1997, 19(22): 213-217.
- [15] 赵君, 向东方. 大鼠角膜碱烧伤与微血管生成对预后的影响[J]. 中华眼科杂志, 2010, 18(7): 99-102.
- [16] Patricia Hainaud, Jean-Olivier Contreres, Villemain A, et al. The Role of the Vascular Endothelial Growth Factor-Delta-like 4 Ligand/Notch4-Ephrin B2 cascade in Tumor Vessel Remodeling and Endothelial Cell Functions [J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8501-8510.
- [17] 王斌, 吕颂谊. 丹梔逍遥散加味治疗肝郁气滞型青光眼 60 例临床观察[J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(4): 263.
- (2016-01-04 收稿 责任编辑: 徐颖)
- (上接第 1281 页)
- [9] 赵颖波. 桥本氏甲状腺炎 35 例临床诊治分析[J]. 中国实用医药杂志, 2013, 8(4): 97-99.
- [10] 李先莉, 徐健, 吴让兵. 左甲状腺素对桥本氏甲状腺炎患者辅助性 T 淋巴细胞的影响[J]. 中国药房, 2016, 25(12): 216-218.
- [11] Khairy GA, Al-Saif A. Incidental parathyroidectomy during thyroid resection; incidence, risk factors, and outcome[J]. Ann Saudi Med, 2011, 31(3): 274-278.
- [12] 颜关珠, 王曙, 缪婕, 等. 硒在桥本甲状腺炎中的作用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2008, 24(2): 194-195.
- [13] 陶峥辉. 丹参、黄芪注射液的药理作用及临床应用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 8(9): 108.
- [14] 姜琛璐, 汤承, 骞宇, 等. 黄芪多糖免疫调节作用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 24(11): 327-332.
- [15] 刘印华, 赵志强, 李树义, 等. 黄芪多糖对免疫功能影响的体内实验研究[J]. 河北医药, 2015, 19(4): 485-487.
- [16] 柏冬志, 东方, 唐文婷, 等. 黄芪多糖药理作用的研究进展[J]. 黑龙江医学, 2014, 16(1): 60-62.
- [17] 叶蓓, 叶少玲. 许芝银教授治疗桥本氏甲状腺炎经验[J]. 四川中医, 2012, 30(12): 16-17.
- [18] 孔令梅. 黄芪的免疫调节作用[J]. 内蒙古医学杂志, 2007, 39(1): 73-74.
- [19] Liu QY, Yao YM, Zhang SW, et al. Astragalus polysaccharides regulate T cell mediated immunity via CD11c(high)CD45RB(low)DCs invitro[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3): 457-464.
- [20] 杨琳, 陈述英. 黄芪对儿童过敏性鼻炎哮喘综合征的免疫调节作用及临床疗效[J]. 中国小儿急救医学, 2015, 29(6): 4253-4255.
- (2015-11-16 收稿 责任编辑: 徐颖)