

活血散结中药复方含药血浆对 PDGF 干预下兔 RPE 细胞增殖的影响

吴权龙¹, 刘晓清², 彭俊¹, 张又玮², 潘坤², 李建超³, 彭清华²

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81774372); 湖南省中医药管理局科研项目(No. 201622); 湖南省研究生科研创新项目(No. CX2016B377, CX2017B432); 中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(No. 2017TP1018); 长沙市科技计划项目(No. kc1704005); 中央财政支持地方高校建设项目; 国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目; 湖南省中医五官科学重点学科建设项目

作者单位:¹(410208)中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院眼科学重点学科;²(410208)中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学中医眼科学重点学科;³(710021)中国陕西省西安市中医医院眼科

作者简介:吴权龙, 男, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合防治眼底病研究。

通讯作者:彭清华, 男, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼、眼底病。pqh410007@126.com

收稿日期: 2018-04-12 修回日期: 2018-08-08

Effects of plasma containing invigorating blood and dissipating masses Chinese medicine compound on proliferation of rabbit RPE cell by PDGF intervention

Quan-Long Wu¹, Xiao-Qing Liu², Jun Peng¹, You-Wei Zhang², Kun Pan², Jian-Chao Li³, Qing-Hua Peng²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81774372); Research Project of Hunan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (No. 201622); Research and Innovation Project for Graduate Students in Hunan (No. CX2016B377, CX2017B432); Hunan Provincial Key Laboratory Project for Preventing and Treating Ophthalmology and Otorhinolaryngology (No. 2017TP1018); Science and Technology Plan of Changsha City (No. kc1704005); The Central Finance Supporting Local University Construction Projects; Key Discipline Project of State Administration of Traditional Chinese Medicine of Ophthalmology of TCM; Key Discipline Project of Hunan Province of Otorhinolaryngology of TCM

¹Key Discipline of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China; ²Key Discipline of Chinese Medical Ophthalmology, The Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China; ³Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qing-Hua Peng. Key Discipline of Chinese

Medical Ophthalmology, The Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China. pqh410007@126.com

Received: 2018-04-12 Accepted: 2018-08-08

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of invigorating blood and dissipating masses traditional Chinese medicine compound drug-containing plasma on the proliferation of rabbit retinal pigment epithelium (RPE) cells treated with platelet derived growth factor (PDGF).

• **METHODS:** Primary cells of RPE cells were obtained by enzymatic digestion, and the primitive culture and subculture of RPE cells were proceeded; prepared blood plasma - contained traditional Chinese medicine compound drug - containing plasma; the fourth generation rabbit RPE cells were selected as the experimental cells by PDGF of low, medium and high doses (5 μg/L, 10 μg/L, 20 μg/L) for 48h. Suitable concentration was detected and selected in cells experiment by using CCK-8 method. Establishing rabbit model of RPE cell proliferation treated with PDGF. The experimental groups were blank control group (DMEM), normal plasma group, PDGF (10 μg/L) group, PDGF (10 μg/L) + AG1296 (10 μmol/L) group, PDGF (10 μg/L) + 10% drug-containing plasma, PDGF (10 μg/L) + 20% drug-containing plasma. Respectively, transwell method was used to determine the migration of rabbit RPE cells after 24h intervention in each group; CCK-8 was used to determine the cell viability OD value of rabbit RPE cells after 48h of intervention in each group.

• **RESULTS:** The plasma containing 10% and 20% concentration of invigorating blood and dissipating masses traditional Chinese medicine compound drug can effectively inhibit cell viability and cell migration of RPE cells treated with PDGF.

• **CONCLUSION:** We found the certain concentration of invigorating blood and dissipating masses traditional Chinese medicine compound drug can effectively inhibit cell viability and cell migration of RPE cells treated with PDGF, which may be an effective treatment for proliferative vitreoretinopathy and provide a new way to study the mechanism of proliferative vitreoretinopathy.

• **KEYWORDS:** invigorating blood and dissipating masses Chinese medicine compound; plasma containing drugs; retinal pigment epithelium cells; platelet-derived growth factor; cell viability; cell migration

Citation: Wu QL, Liu XQ, Peng J, *et al.* Effects of plasma containing invigorating blood and dissipating masses Chinese medicine compound on proliferation of rabbit RPE cell by PDGF intervention. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(9):1572-1577

摘要

目的:观察活血散结中药复方含药血浆对血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)干预下兔RPE细胞增殖的影响。

方法:酶消化法获取RPE原代细胞,进行RPE细胞的原代培养和传代;制备活血散结中药复方含药血浆;选取第4代兔RPE细胞为实验细胞,PDGF低、中、高剂量(5、10、20 $\mu\text{g/L}$)干预48h后,CCK-8法检测并选取适宜细胞实验干预浓度;建立PDGF干预下RPE细胞增殖模型。实验分组为空白对照组(DMEM)、正常血浆组、PDGF(10 $\mu\text{g/L}$)组、PDGF(10 $\mu\text{g/L}$)+AG1296(10 $\mu\text{mol/L}$)组、PDGF(10 $\mu\text{g/L}$)+10%含药血浆组、PDGF(10 $\mu\text{g/L}$)+20%含药血浆组,分别加入相应处理因素干预24h后,Transwell法测定兔RPE细胞迁移力;而干预48h后,CCK-8法测定兔RPE细胞的细胞活力OD值。

结果:10%和20%浓度的活血散结中药复方含药血浆能有效抑制PDGF干预下RPE细胞的细胞活力、细胞迁移。

结论:活血散结中药复方含药血浆能够抑制PDGF干预下兔RPE细胞增殖,这可能是其有效治疗增殖性玻璃体视网膜病变的机制之一。

关键词:活血散结中药复方;含药血浆;视网膜色素上皮细胞;血小板源性生长因子;细胞活力;细胞迁移力

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.9.04

引用:吴权龙,刘晓清,彭俊,等.活血散结中药复方含药血浆对PDGF干预下兔RPE细胞增殖的影响.国际眼科杂志2018;18(9):1572-1577

0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是一种非血管性致盲性疾病,是造成孔源性视网膜脱离手术修复失败的主要原因^[1]。临床上孔源性视网膜脱离中PVR发生率约为5%~10%^[2-3]。众多的基础研究表明,该病的发生发展是多种细胞、细胞因子经多途径、多环节相互调节和相互作用的结果。PVR一旦形成,治疗上非常棘手。临床上,主要以手术为主。但手术有其局限性,只能去除病变的增生组织,而不能阻止和预防细胞的增生和发展,而药物治疗又很难奏效,各种抗增殖、抗代谢药物尚未应用于临床,还仅处于实验研究阶段。因此,探索中医药防治PVR形成具有重要的意义。彭清华教授^[4]结合多年的临证经验,在眼科水血同治的原则和基础上,采用由三七6g、丹参15g、昆布15g等药物组成的活血散结中药复方治疗PVR取得了较好疗效,但该方有效治疗PVR的具体药理作用机制尚不清楚。本实验拟利用体外细胞培养技术通过PDGF干预RPE细胞造模的方式,探索活血散结中药复方防治PVR药理学的具体作用机制,为PVR防治提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 兔视网膜色素上皮细胞体外培养:成

年健康无眼疾青紫蓝兔8只,雌雄不限,体质量1.5~2.0kg,由上海市松江区车墩实验动物良种场提供,动物许可证号: SXCK(沪)2012-0008。常规饲料喂养,控制室温18 $^{\circ}\text{C}$ ~26 $^{\circ}\text{C}$,保持空气流通及55%左右的相对湿度。实验前行常规眼科检查(裂隙灯、间接眼底镜),排除眼内外疾患方进入实验。含药血浆制备:成年健康家兔10只,雌雄不限,体质量1.5~2.0kg,由湖南中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号: SCXK(湘)2015-0004。常规饲料喂养,控制室温18 $^{\circ}\text{C}$ ~26 $^{\circ}\text{C}$,保持空气流通,相对湿度55%左右。实验前所有动物适应性饲养1wk。

1.1.2 实验药品和试剂 DMEM/F12(美国Hyclone公司)、胎牛血清(FBS,杭州四季青公司)、胰蛋白酶、D-Hanks液(美国Gibco公司)、多聚甲醛(PFA,南京试剂公司)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton \times 100)、羊血清、荧光封片剂(Fluoromount-G,上海索莱宝公司)、小鼠抗兔广谱细胞角蛋白、羊抗鼠Alexa Fluor 488(南京vazyme公司)、PBS缓冲液(湖南维尔公司)、水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司)、甲醇(色谱纯,赛默飞世尔公司)、磷酸(分析纯,赛默飞世尔公司)、细胞增殖与毒性检测试剂盒(七海生物)、96孔培养板(NEST)、PDGF-BB(美国Sigma公司)、AG1296(特异性的PDGF- α 受体酪氨酸激酶抑制剂,美国Selleck公司)、10%和20%的活血散结中药复方含药血浆、细胞培养常规用试剂(同细胞培养)、无血清培养基、10%血清培养基、PBS、0.02% EDTA、甲醇、Giemsa染液、PDGF-BB(Sigma)、AG1296(特异性的PDGF- α 受体酪氨酸激酶抑制剂, Selleck)等。活血散结中药复方:由三七、丹参、海藻、昆布、鳖甲、地龙组成,共61g,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供,所选药材为同一批次,采用水煎法,分煎两次后混合药液浓缩至1.025g/mL生药浓度,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.2 方法

1.2.1 兔视网膜色素上皮细胞的培养和鉴定

1.2.1.1 原代兔RPE细胞的培养 采用酶消化法获取RPE原代细胞^[5]。无菌条件下取出青紫蓝兔眼球,PBS冲洗3次。胰蛋白酶消化30min,加入10%胎牛血清的培养基终止反应。收集细胞悬液。将RPE细胞调整为(4~5) $\times 10^4$ /mL的密度,在含5% CO₂,湿度为90%,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。细胞贴壁后每3d更换培养液,直到细胞融合。

1.2.1.2 原代兔RPE细胞的传代 取原代生长的RPE细胞,用PBS液洗涤1~2次。加2mL胰酶消化,细胞脱壁分散后立即加少量完全培养基终止消化。在1000r/min条件下离心4min,弃去上清液,加1~2mL完全培养液后吹匀,按照(4~5) $\times 10^4$ /mL密度传代培养。

1.2.1.3 原代兔RPE细胞的鉴定 取对数生长期第2代细胞用Cytokeratin-8特异性抗体免疫荧光法^[6]在荧光显微镜下进行观察鉴定。

1.2.2 活血散结中药复方含药血浆的制备 采用随机数字法分为空白组、活血散结中药复方组,每组5只。活血散结中药复方组每日按4倍家兔临床等效临床剂量20mL/kg灌胃,分早晚2次灌服,连续灌胃5d。空白组灌服蒸馏水,每日20mL/kg灌胃,分早晚2次灌服,连续灌胃5d。末次给药2h后麻醉腹主动脉取血,在3000r/min条件下离心10min,收集上清液即为含药血浆。0.22 μm 过滤器分装,置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。

1.2.3 细胞增殖和毒性检测 选取第4代兔RPE细胞,分为:(1)空白对照组:DMEM;(2)正常血浆组:正常血浆;(3)5%、10%、20%、40%、60%、80%、100%共7个浓度含药血浆组:取血浆样本加入纯甲醇(体积比1:2),涡旋混合10min,12000r/min离心10min,取上清液,40℃氮气吹干,成冻干粉。用培养基分别溶解成7个浓度含药血浆。96孔板培养板培养,每组各设5个复孔。采用CCK-8法检测兔RPE细胞活力。取对数生长期兔RPE细胞,用培养基配成细胞悬液并调整细胞密度至50个/ μL ,每孔(96孔板培养板)加入100 μL ,铺板后用PBS填充边缘孔。置于培养箱,5% CO_2 ,37℃孵育,待细胞单层铺满孔底,加入用无血清培养基配制的不同浓度的含药血浆,每孔总体积为200 μL 。培养48h后。每孔加入10 μL CCK-8溶液。继续培养2h后,应用酶标仪检测450nm处的吸光值(OD)。记录结果,绘制图表,计算各组细胞增殖抑制率和 IC_{50} 。细胞增殖抑制率(%)=[1-(实验组OD值/正常血浆组OD值)] \times 100%。

1.2.4 选取适宜细胞实验干预浓度 选取第4代体外培养的兔RPE细胞,实验分为:(1)空白对照组:DMEM;(2)PDGF低剂量组:5 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB;(3)PDGF中剂量组:10 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB;(4)PDGF高剂量组:20 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB。收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,每孔(96孔培养板)加入100 μL ,铺板,使待测细胞密度至5000个/孔,边缘孔用PBS填充。设5个复孔/样本/浓度,5% CO_2 ,37℃孵育,至细胞单层铺满孔底,加入用无血清培养基配置的不同浓度梯度的药物,5% CO_2 ,37℃培养48h。每孔加入10 μL 试剂盒中CCK-8溶液,同步设调零孔。继续培养2h,用酶标仪检测450nm处的吸光值(OD)。

1.2.5 含药血浆对PDGF干预下兔RPE细胞活力的影响 选取第4代体外培养的兔RPE细胞,实验分为:(1)空白对照组:DMEM;(2)正常血浆组:正常血浆;(3)PDGF组:10 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB;(4)PDGF+AG1296组:10 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB+10 $\mu\text{mol/L}$ AG1296;(5)PDGF+10%含药血浆组:10 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB+10%活血散结合含药血浆;(6)PDGF+20%含药血浆组:10 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB+20%活血散结合含药血浆。收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,每孔(96孔培养板)加入100 μL ,铺板使待测细胞密度至5000个/孔,边缘孔用PBS填充。设5个复孔/样本/浓度。5% CO_2 ,37℃孵育,至细胞单层铺满孔底,加入用无血清培养基配制的不同浓度梯度的药物。5% CO_2 ,37℃培养48h。每孔加入10 μL 试剂盒中CCK-8溶液,同步设调零孔。继续培养2h。用酶标仪检测450nm处的吸光值(OD)。

1.2.6 含药血浆对PDGF干预下兔RPE细胞迁移的影响 选取第4代体外培养的兔RPE细胞。实验组分组同上,参照Albini等^[7]所用方法:所有细胞培养试剂和Transwell chamber放在37℃温育;待测细胞培养至对数生长期,消化细胞,用PBS和无血清培养基先后洗涤1次,用无血清培养基悬浮细胞,计数,调整细胞密度为 2×10^5 个/mL;在下室加入600~800 μL 含10%血清的培养基,上室加入100 μL 细胞悬液和根据分组加入相应干预因素,继续在孵箱培养24h;用镊子小心取出chamber,吸干上室液体,移到预先加入约800 μL 甲醇的孔中,室温固

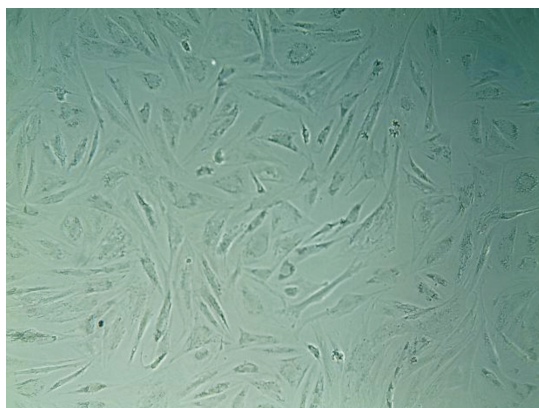


图1 原代贴壁RPE细胞($\times 100$)。

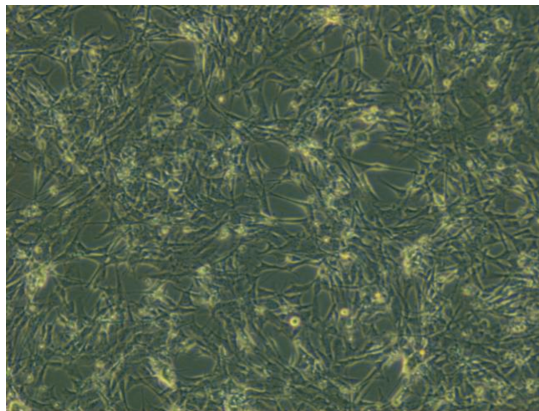


图2 RPE细胞免疫荧光染色($\times 100$)。

定30min;取出chamber,吸干上室固定液,移到预先加入约800 μL 苏木素染液的孔中,室温染色15~30min;轻轻用清水冲洗浸泡数次,取出chamber,吸去上室液体,用湿棉棒小心擦去上室底部膜表面上的细胞;用小镊子小心揭下膜,底面朝上晾干,移至载玻片上用中性树胶封片;显微镜下取5个随机视野计数,统计结果。

统计学分析:采用SPSS21.0统计学软件对所有数据资料进行统计学分析,计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD- t 检验(方差齐)或Tamhane检验(方差不齐),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代兔RPE细胞生长状况和鉴定 倒置显微镜下观察,培养的RPE原代细胞呈圆形,胞体透亮,胞浆内可见较多黑色素颗粒,可见清晰透明的单核细胞或双核细胞。接种24h后,细胞开始贴壁伸出伪足,逐渐变成扁平不规则多角形,分裂繁殖增快,生长活跃。5~7d细胞基本融合呈镶嵌状排列(图1)。传代细胞1h开始贴壁,24h大部分贴壁伸出伪足,胞浆内黑色素颜色和颗粒随着传代次数的增加而减少,传至第4代时明显减少。传至第6代时,胞体透亮肥大,胞浆内的色素已完全消失,细胞轮廓清楚,细胞核及核仁清晰可见。Cytokeratin-8特异性抗体免疫荧光法结果显示:荧光遍及胞质,细胞角蛋白染色呈强阳性(图2)。

2.2 活血散结中药复方含药血浆对兔RPE细胞增殖和毒性的影响 各组活血散结中药复方含药血浆干预RPE细胞48h后细胞增殖和毒性检测结果显示:含药血浆对RPE细胞均有不同程度的增殖抑制作用,且存在一定量效关系(正相关),其中5%~20%的活血散结中药复方

表1 不同浓度活血散结含药血浆对兔 RPE 细胞增殖和毒性的影响

组别	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)
空白对照组	0.758±0.021	-
正常血浆组	0.751±0.044	-
5% 含药血浆组	0.750±0.019 ^a	0.16
10% 含药血浆组	0.748±0.010 ^a	0.35
20% 含药血浆组	0.737±0.048 ^a	1.92
40% 含药血浆组	0.669±0.030 ^c	10.95
60% 含药血浆组	0.590±0.018 ^c	21.46
80% 含药血浆组	0.422±0.007 ^c	43.75
100% 含药血浆组	0.377±0.007 ^c	49.85
<i>F</i>	190.006	
<i>P</i>	<0.001	

注:^a $P>0.05$,^c $P<0.05$ vs 正常血浆组。

表2 PDGF 对兔 RPE 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量	OD 值
空白对照组	DMEM	0.653±0.008
PDGF 低剂量组	PDGF(5 μ g/L)	0.734±0.015 ^a
PDGF 中剂量组	PDGF(10 μ g/L)	0.770±0.011 ^{a,c}
PDGF 高剂量组	PDGF(20 μ g/L)	0.784±0.008 ^{a,c}
<i>F</i>		158.513
<i>P</i>		<0.001

注:^a $P<0.05$ vs 空白对照组;^c $P<0.05$ vs PDGF 低剂量组。

含药血浆对细胞有较弱的抑制作用,与正常血浆组比较,细胞活力 OD 值差异无统计学意义($P>0.05$),而 40%~100% 的活血散结中药复方含药血浆对细胞的抑制作用则更为明显,与正常血浆组比较,细胞活力 OD 值差异有统计学意义($P<0.05$);20% 以下含药血浆对 RPE 细胞的增殖抑制率低于 1.92%,计算活血散结中药复方含药血浆 IC₅₀ 为 95.65%,表明此次制备的活血散结中药复方含药血浆虽然对 RPE 细胞有一定的增殖抑制作用,但毒性较低,20% 及以下浓度活血散结中药复方含药血浆对 RPE 细胞无明显细胞毒性。综合以上结果考虑选取 10% 和 20% 的活血散结中药复方含药血浆作为下一步实验的干预浓度(表 1)。

2.3 PDGF 对兔 RPE 细胞增殖的影响 不同剂量的 PDGF 对 RPE 细胞活力均具有一定的增强作用,且存在一定的量效关系(正相关),与空白对照组比较,细胞活力 OD 值差异均有统计学意义($P<0.01$);其中中剂量、高剂量 PDGF 组均比低剂量 PDGF 组作用更强,细胞活力 OD 值差异均有统计学意义($P<0.01$);而中剂量与高剂量 PDGF 组作用相当,细胞活力 OD 值差异无统计学意义($P=0.057$)。综上,选取 10 μ g/L PDGF-BB 作为下一步实验的干预浓度(表 2)。

2.4 活血散结中药复方对 PDGF 干预下兔 RPE 细胞活力的影响 PDGF 对 RPE 细胞活力有一定的增强作用,与正常血浆组比较差异有统计学意义($P<0.01$);AG1296 作为 PDGF 受体抑制剂能降低 RPE 细胞的活力,与 PDGF 组比较差异有统计学意义($P<0.01$);而 10% 和 20% 的活血散结中药复方含药血浆亦能降低 RPE 细胞的活力,与 PDGF 组比较差异均有统计学意义($P<$

0.01),而与 AG1296 抑制剂作用均相当($P>0.05$),但两个浓度的活血散结中药复方含药血浆组间差异无统计学意义($P>0.05$,表 3,图 3)。

2.5 活血散结中药复方对 PDGF 干预下兔 RPE 细胞迁移的影响 PDGF 对 RPE 细胞迁移有明显促进作用,与正常血浆组比较差异有统计学意义($P<0.01$);AG1296 对 RPE 细胞迁移有明显抑制作用,与 PDGF 组比较差异有统计学意义($P<0.01$);而 10% 和 20% 的活血散结中药复方含药血浆亦能抑制 RPE 细胞的迁移,与 PDGF 组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),但与 AG1296 抑制剂作用相当($P>0.05$),且两个浓度的活血散结中药复方含药血浆作用亦相当,组间差异无统计学意义($P>0.05$,表 4,图 4)。

3 讨论

PVR 中医可归属于“暴盲”和“视瞻昏渺”范畴^[8],视网膜中医称“视衣”归属于“瞳神”,可根据发病部位将 PVR 归属于瞳神疾病范畴。中医认为肝、胆、脾、肾脏腑功能失调,眼外伤均可致视衣失养。肝胆气滞致瘀血内停,多属气血瘀滞,脾肾失调致阴虚痰结多属痰湿内聚,而后期二者多胶结阻滞致神膏衰损,痰结血瘀,终致有形之物形成而致 PVR。方中三七化痰止血活血,丹参活血祛瘀,入肝经血分,二药合用活血化瘀,共为君药;昆布消痰软坚,利水消肿,入肝、胃、肾经。全方诸药共奏活血化瘀、软坚散结之功,使眼内瘀血痰结之有形之物消散,改善眼底情况,提高患者视功能。

研究表明^[9],PDGF 在 PVR 发病中扮演了至关重要的角色,参与了 RPE 细胞的增殖与迁移。司艳芳等^[10]发现 α -SMA 在 PVR 增生膜中广泛表达,其表达量与 PVR 病变程度有关,而 PDGF 可以促进 α -SMA 的表达,这提示 PDGF 在 PVR 发病中有重要作用。同时还发现 PDGF 可通过 ERK/p38/P13K 促进人视网膜色素上皮细胞的增殖、迁移^[11]。彭燕一等^[12]也通过实验发现 PDGF- α 受体反义寡核苷酸能够抑制实验性 PVR 的发生发展,提示 PDGF- α 受体参与了 PVR 发生发展的病理过程。秦贤杰等^[13]发现 PDGFR- α shRNA 能抑制 hRPE 细胞的增殖并诱导其凋亡。孟竹^[14]发现,PDGF- α 受体 mRNA 的 RNA 干扰能有效抑制 PVR 的形成,且在一定的浓度范围内随着浓度的增高抑制作用增强。中医药复方是临床中医治病用药的主要方式,在治疗疾病上具有多靶点、多方位的功效。

活血散结法基于眼科水血同治的基础上提出,前期研究表明^[15-18]活血利水之散血明目片能够有效降低外伤性兔 PVR 的玻璃体中 bFGF、EGF 及 ICM-1 的浓度,从而有效降低增殖细胞的过度增殖,一定程度上抑制了 PVR 的发生与发展。有研究表明^[19],血浆药理学的半体内实验及体外细胞实验是目前中药复方的分子药理机制流行的可取的有效研究方式。本实验采取血浆药理学方法^[20]研究了活血散结中药复方对体外 PDGF 干预下 RPE 细胞增殖的影响。制备的活血散结中药复方不同浓度的含药血浆浓度对 RPE 细胞有不同程度的增殖抑制作用,并存在一定的量效关系(正相关),毒性较低,实验结果表明 20% 及其以下浓度活血散结中药复方含药血浆对 RPE 细胞无明显细胞毒性,从而作为本细胞实验研究的适宜浓度。本实验研究结果显示,PDGF 能增强体外培养兔 RPE 细胞活力,促进 RPE 细胞增殖,且存在一定的

表3 活血散结合药血浆对PDGF干预下RPE细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量	OD值
空白对照组	DMEM	0.719±0.017
正常血浆组	正常血浆	0.717±0.012
PDGF组	PDGF(10μg/L)	0.755±0.027 ^b
PDGF+AG1296组	PDGF(10μg/L)+AG1296(10μmol/L)	0.699±0.016 ^d
PDGF+10%含药血浆组	PDGF(10μg/L)+活血散结合药血浆(10%)	0.717±0.014 ^d
PDGF+20%含药血浆组	PDGF(10μg/L)+活血散结合药血浆(20%)	0.713±0.006 ^d
<i>F</i>		6.296
<i>P</i>		0.001

注:^b $P<0.01$ vs 正常血浆组;^d $P<0.01$ vs PDGF组。

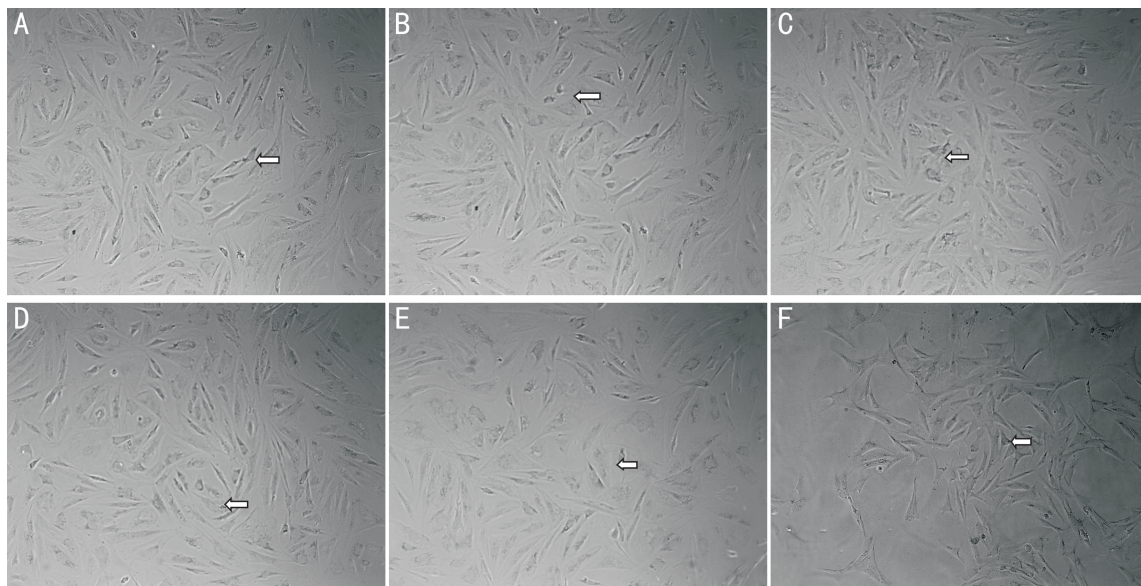


图3 活血散结合药血浆对PDGF干预下RPE细胞活力的影响($\times 100$) A:空白对照组;B:正常血浆组;C:PDGF组;D:PDGF+AG1296组;E:PDGF+10%含药血浆组;F:PDGF+20%含药血浆组。

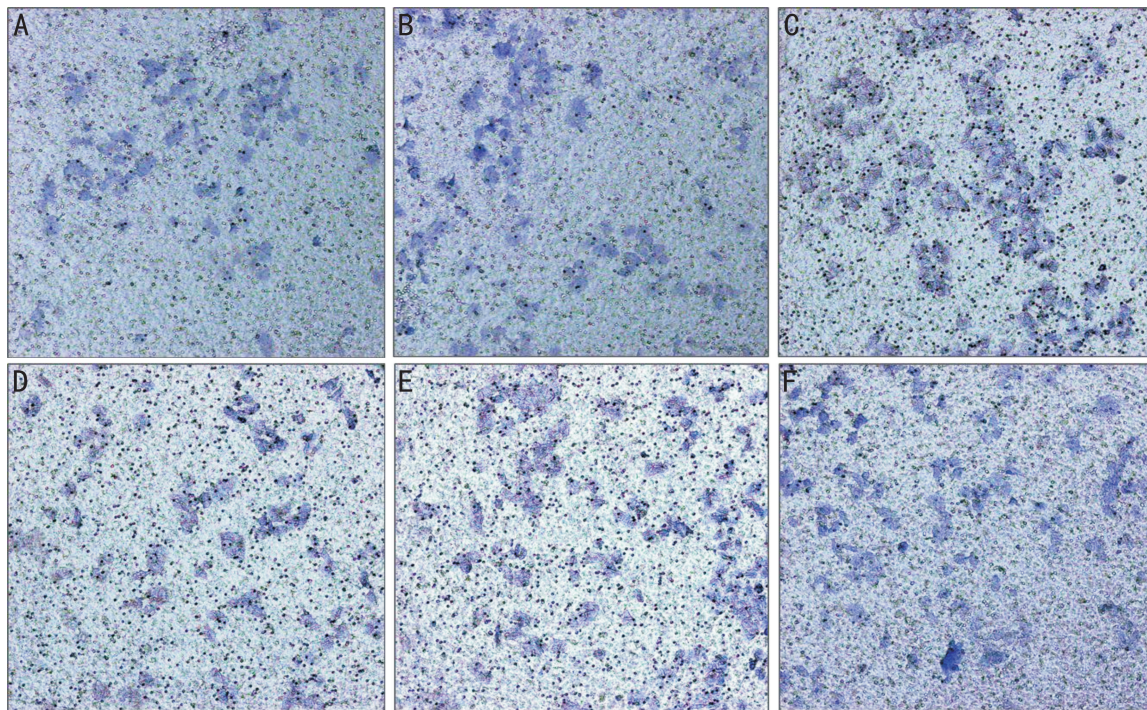


图4 活血散结合药血浆对PDGF干预下RPE细胞迁移的影响($\times 100$) A:空白对照组;B:正常血浆组;C:PDGF组;D:PDGF+AG1296组;E:PDGF+10%含药血浆组;F:PDGF+20%含药血浆组。

表 4 活血散结合药血浆对 PDGF 干预下 RPE 细胞迁移的影响

($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量	迁移至下室的细胞数
空白对照组	DMEM	9.60±1.95
正常血浆组	正常血浆	9.40±1.95
PDGF 组	PDGF(10μg/L)	31.80±2.77 ^b
PDGF+AG1296 组	PDGF(10μg/L)+AG1296(10μmol/L)	12.40±1.67 ^{a,d}
PDGF+10% 含药血浆组	PDGF(10μg/L)+活血散结合药血浆(10%)	15.00±1.87 ^{b,d}
PDGF+20% 含药血浆组	PDGF(10μg/L)+活血散结合药血浆(20%)	14.80±1.92 ^{b,d}
<i>F</i>		82.544
<i>P</i>		<0.001

注:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ vs 正常血浆组;^d $P<0.01$ vs PDGF 组。

量效关系,浓度越高作用相对较强,与正常血浆组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),但高(20μg/L)、中剂量(10μg/L)PDGF 差异无统计学意义。因此本研究后续相关实验选取了中剂量(10μg/L)PDGF 作为干预 RPE 细胞的浓度。而后续研究结果显示 PDGF 能促进兔 RPE 细胞增殖及迁移,并增强 RPE 细胞的活力。从而认为 PDGF 可通过影响 RPE 细胞增殖调节机制促进 RPE 细胞过度增生分裂,促使 PVR 的形成。本实验研究结果还显示,10% 和 20% 活血散结中药复方含药血浆均能降低 PDGF 干预下兔 RPE 细胞的活力,抑制 PDGF 干预下兔 RPE 细胞迁移,与 PDGF 组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),表明 10% 和 20% 活血散结中药复方含药血浆均有抑制 PDGF 干预下兔 RPE 细胞的增殖、迁移的作用,两浓度含药血浆以上作用均与 AG1296 相当($P>0.05$),但 10% 和 20% 活血散结中药复方含药血浆以上作用亦相当($P>0.05$)。

综上,活血散结中药复方含药血浆具有抑制 PDGF 干预下兔 RPE 细胞增殖,这可能是其有效治疗增殖性玻璃体视网膜病变的机制之一。但从哪些细胞分子和信号通路影响增殖还需做更深的研究。

参考文献

- 1 Pennock S, Haddock LJ, Mukai S, et al. Vascular endothelial growth factor acts primarily via platelet-derived growth factor receptor α to promote proliferative vitreoretinopathy. *Am J Pathol* 2014;184(11):3052-3068
- 2 Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Refin Eye Res* 1998;17(1):77-98
- 3 Paster JC. Proliferative vitreoretinopathy; an overview. *Surv Ophthalmol* 1998;43(1):3-18
- 4 彭清华. 眼科活血利水法的基础研究. 湖南中医药大学学报 2009;29(5):14-18
- 5 Xu GX, Yang J, Sun TS, et al. Primary culture of human retinal pigment epithelium *in vitro*. *Int J Ophthalmol* 2004;4(1):12-15

6 胡健艳,陈雪,陈辉,等. 兔视网膜色素上皮细胞培养和鉴定. 南通大学学报 2005;25(3):171-173

7 Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, et al. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987;47(12):3239-3245

8 彭清华,彭俊. 暴盲病名沿革及分化. 中华中医药学刊 2010;28(9):1812-1813

9 Lei H, Rheaume MA, Kazlauskas A. Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* 2009;90(3):376-381

10 司艳芳,王君,关娟,等. 血小板来源的生长因子通过 ERK/p38/PI3K 促进人视网膜色素上皮细胞的增殖、迁移. 现代生物医学进展 2012;12(34):6628-6632

11 司艳芳,王君,关娟,等. α -平滑肌肌动蛋白在 PVR 增生膜中的表达以及 PDGF 对其在人 RPE 细胞中表达的影响. 眼科新进展 2012;32(11):1010-1013

12 彭燕一,蒋娇娇. PDGF- α 受体反义寡核苷酸对增殖性玻璃体视网膜病变的影响. 实用医学杂志 2014;30(4):518-522

13 秦贤杰,彭燕一,秦程. 靶向 PDGF 受体- α 的 RNA 干扰对 RPE 细胞增殖和凋亡的影响. 安徽医科大学学报 2016;51(2):180-184

14 孟竹. 靶向 PDGFR- α mRNA 的 RNA 干扰抑制实验性增生性玻璃体视网膜病变. 桂林医学院 2016

15 魏为,彭清华,唐罗生,等. 散血明目片对兔 tPVR 玻璃体中生长因子和细胞间粘附分子浓度的影响. 眼科新进展 2006;26(1):7-11

16 彭清华,魏为,李建超. 活血利水法对外伤性实验性 PVR 模型兔玻璃体中 ICAM-1 浓度的影响. 辽宁中医杂志 2005;32(3):184-186

17 彭清华,魏为,李建超. 活血利水法对外伤性实验性 PVR 模型兔玻璃体中生长因子浓度影响的研究. 湖南中医学院学报 2004;24(6):34-37

18 魏为,彭清华. 活血利水法对兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变的抑制作用. 中国中医眼科杂志 2004;14(4):20-23

19 林泽苗,钟佳贤,李青南. 中药血清药理学和血浆药理学应用比较研究. 亚太传统医药 2016;12(12):62-64

20 刘林. 中药含药血浆与血清有效成分比较及血浆药理学方法研究. 湖南中医药大学 2016