

·方药研究·

本文引用:潘 坤,彭 俊,吴佳敏,张又玮,李建超,吴权龙,彭清华. 活血散结方含药血浆对视网膜色素上皮细胞毒性作用的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(2): 159-162.

## 活血散结方含药血浆对视网膜色素上皮细胞 毒性作用的研究

潘 坤,彭 俊,吴佳敏,张又玮,李建超,吴权龙,彭清华\*  
(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

**[摘要]** 目的 制备活血散结方含药血浆,并研究其不同浓度对视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞的毒性作用。方法 以成年健康家兔为对象,制备活血散结方含药血浆。将提取的兔原代 RPE 细胞分 9 个组,分别为:空白对照组、正常血浆组、5%含药血浆组、10%含药血浆组、20%含药血浆组、40%含药血浆组、60%含药血浆组、80%含药血浆组、100%含药血浆组,予以相对应浓度的含药血浆干预,CCK8 法检测含药血浆对兔 RPE 细胞毒作用。结果 活血散结方各浓度含药血浆对 RPE 细胞有抑制作用,其中 5%~20%含药血浆对 RPE 细胞有较弱的抑制作用,但与正常血浆比较,抑制率差异无统计学意义( $P>0.05$ );而 40%~100%含药血浆对 RPE 细胞生长有明显的抑制作用,与正常血浆比较,抑制率差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 活血散结方含药血浆对 RPE 细胞有一定的抑制作用,抑制程度与含药血浆浓度成量效关系,可以考虑选择 5%~20%含药血浆浓度作为后续实验研究的干预浓度。

**[关键词]** 活血散结方;视网膜色素上皮细胞;细胞毒性;含药血浆

**[中图分类号]** R285.5; R276.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.02.003

### A Study of the Toxic Effect of Huoxue Sanjie Decoction-Containing Plasma on Retinal Pigment Epithelium Cells

PAN Kun, PENG Jun, WU Jiamin, ZHANG Youwei, LI Jianchao, WU Quanlong, PENG Qinghua\*  
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare Huoxue Sanjie Decoction-containing plasma, and to study the toxic effect of different concentrations of the plasma on retinal pigment epithelium (RPE) cells. **Methods** Adult healthy rabbits were used to prepare Huoxue Sanjie Decoction-containing plasma. Rabbit primary cells were divided into nine groups: blank control group, normal plasma group, 5% drug-containing plasma group, 10% drug-containing plasma group, 20% drug-containing plasma group, 40% drug-containing plasma group, 60% drug-containing plasma group, 80% drug-containing plasma group, and 100% drug-containing plasma group. These groups were treated with respective concentrations of drug-containing plasma. CCK-8 assay was used to examine their cytotoxic effect on rabbit RPE cells. **Results** All concentrations of Huoxue Sanjie Decoction-containing plasma had an inhibitory effect on RPE cells. The 5%, 10%, and 20% drug-containing plasma had a weak inhibitory effect on RPE cells, which was not significantly different from the inhibitory effect of normal plasma ( $P>0.05$ ). However, the 40%, 60%, 80%, and 100% drug-containing plasma had an obvious inhibitory effect on RPE cell growth, and the inhibition rates were significantly from that of the normal plasma group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Huoxue Sanjie Decoction-containing plasma has a certain inhibitory effect on RPE cells, which is correlated with the concentration of drug-containing plasma. The 5%–10% concentration of drug-containing plasma can be considered as the intervention concentration in the following experimental studies.

**[Keywords]** Huoxue Sanjie Decoction; retinal pigment epithelium cell; cytotoxicity; drug-containing plasma

**[收稿日期]** 2018-03-28

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(71208301);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目;湖南省研究生科研创新项目(CX2016B377、CX2017B432);中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目;湖南省中医诊断学优势重点学科建设项目;湖南省中医五官科学重点学科建设项目;中医学国内一流建设学科资助项目;长沙市科技计划项目(kc1704005);中央财政支持地方高校建设项目。

**[作者简介]** 潘 坤,男,硕士,研究方向:中西医结合诊治眼科疾病。

**[通讯作者]** \*彭清华,男,博士,二级教授,博士研究生导师, E-mail: pqh410007@126.com。

增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是孔源性视网膜脱离、糖尿病视网膜病变、玻璃体出血以及眼球后段穿通伤等眼底疾病的严重并发症,目前该病的发病率在逐年增加<sup>[1-3]</sup>。PVR的基本病理生理过程主要涉及细胞增生、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成和膜的收缩<sup>[4]</sup>。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞在PVR的发生和发展过程中起关键作用,是重要的介导细胞,也是目前建立PVR模型的主要细胞<sup>[5]</sup>。目前许多学者提出使用药物预防PVR的发展,主要目的在于抗增殖及炎症<sup>[6]</sup>,而这些药物例如秋水仙碱、5-氟尿嘧啶、地塞米松等,或处于实验临床阶段,或因其药物毒性、长期并发症等原因,真正应用于临床的很少,故尚无作为防治PVR的临床常规药物<sup>[7]</sup>。近年来,许多报道中药及其制剂防治PVR已取得不错疗效<sup>[8-12]</sup>。湖南中医药大学彭清华教授从中医学对PVR的认识及多年来的临床经验出发,在眼科水血同治的原则和基础上,提出活血散结方,已取得良好的疗效。本文将探讨不同浓度活血散结方含药血浆对兔RPE细胞活性的影响。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

成年健康无眼疾青紫蓝兔4只,雌雄不限,体质量1.5~2.0 kg,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。实验前常规眼科检查(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8只,雌雄兼用,体质量1.5~2.0 kg,由湖南中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号: SYXK(湘)2015-0004。常规喂养,控制室温20~26℃,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1周。

### 1.2 药物制备

活血散结方:由三七、丹参、海藻、昆布、鳖甲、地龙配伍组成,饮片由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。采用水煎法,分煎2次后混合药液浓缩至1.025 g/mL生药浓度,4℃以下保存。

### 1.3 试剂及仪器

1640培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清(FBS,杭州四季青公司);胰蛋白酶(美国GIBCO公司);D-Hank液(美国GIBCO公司);聚乙二醇辛基

苯基醚(Triton X 100,上海索莱宝公司);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(南京vazyme公司);羊抗兔Alexa Fluor 488(南京vazyme公司);细胞增殖与毒性检测试剂盒(七海生物公司)。CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司3111);倒置显微镜(德国Motic公司AE31);酶标仪(美国Bio-tek公司ELX800)。

## 2 方法

### 2.1 活血散结方含药血浆的制备

采用随机数字法将家兔分为活血散结方组、空白组,每组4只。根据人与家兔体表面积换算方法计算(人以60 kg体质量为标准,家兔以1.6 kg体质量为标准),按等效剂量换算法换算家兔活血散结方组的等效临床剂量为20.256 g/kg $\approx$ 20.3 g/kg。空白组灌服蒸馏水,均为每日20 mL/kg灌胃,分早晚两次灌服,连续灌胃5 d。采血前禁食禁水12 h,末次给药2 h后,无菌条件下腹主动脉取血,收集血液于含3.2%枸橼酸钠1:9真空采血管内,颠倒混匀后静置。在3 000 r/min条件下离心10 min,收集上清液即为含药血浆。0.22  $\mu$ m膜滤过分装,置于-70℃超低温冰箱保存。

### 2.2 兔原代RPE细胞的培养

采用酶消化法获取兔原代RPE细胞<sup>[13]</sup>。取青紫蓝兔耳缘静脉处空气栓塞法处死,无菌操作条件下摘除眼球,去净眼球表面筋膜,生理盐水充分冲洗,巩膜穿刺刀沿锯齿缘后2 mm处刺入,用显微剪环形剪开眼球前段,去除角膜、晶状体以及玻璃体,由视网膜周边至视乳头方向轻轻去除视网膜神经上皮层。将眼杯置于眼球托上,7-0线在四个方向缝合固定眼杯,PBS冲洗。滴加胰蛋白酶,放置细菌培养箱中消化30 min,加入含10%胎牛血清的培养基终止反应。用吸管轻轻吹打眼球内壁使RPE细胞脱落分散,收集眼杯中细胞悬液于离心管中。胰酶消化,离心,弃去上清液,加入10%胎牛培养基将细胞吹打分散,将RPE细胞调整为 $4\times 10^4\sim 5\times 10^4$ 个/mL细胞的密度,并接种于25 mL培养瓶,在37℃、5%CO<sub>2</sub>和相对湿度90%的培养箱中培养。细胞贴壁后每3天更换培养液,直到细胞融合。当细胞贴壁铺满大部分瓶底即可进行传代培养。

### 2.3 兔原代RPE细胞的鉴定

Cytokeratin-8特异性抗体免疫荧光法<sup>[14]</sup>进行鉴

定。将四片玻璃片盖于24孔板,每孔加1 mL培养基,取上述“2.2”对数生长期第2代细胞约 $5 \times 10^4$ 个/mL细胞进行爬片,置培养箱过夜。待细胞铺平贴壁后,用4%PFA于室温固定30 min。取50  $\mu$ L破膜封闭液于防水膜上,盖于细胞上,室温放置1 h。取50  $\mu$ L小鼠抗兔广谱细胞角蛋白一抗滴于防水膜上,盖于细胞上,放置4  $^{\circ}$ C环境下过夜。将玻片取出用PBS冲洗。取羊抗兔二抗,滴50  $\mu$ L于防水膜上,盖于细胞上,室温放置2 h,操作过程注意避光并保持细胞湿润。2 h后将玻片用PBS冲洗,吸干多余水分,封片并于荧光显微镜下进行观察。

#### 2.4 CCK8法检测活血散结方含药血浆对兔RPE细胞的毒性作用

取96孔板培养板,平行接种9组:空白对照组、正常血浆组、5%含药血浆组、10%含药血浆组、20%含药血浆组、40%含药血浆组、60%含药血浆组、80%含药血浆组、100%含药血浆组,每组各设5个复孔。收集对数期RPE细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加入100  $\mu$ L,5%CO<sub>2</sub>,37  $^{\circ}$ C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的含药血浆,培养48 h。每孔加入10  $\mu$ L试剂盒中7sea-cell counting kit溶液,同步设调零孔,继续培养2 h。用酶标仪检测450 nm处的吸光值(OD),并计算。

细胞增殖抑制率=[1-(实验组OD值/空白组OD值)] $\times$ 100%。

#### 2.5 统计分析

采用SPSS 17.0统计学软件对所有数据资料进行统计学分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。行ANOVA单因素方差分析,样本间的两两比较用LSD检验或者Dunnett检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

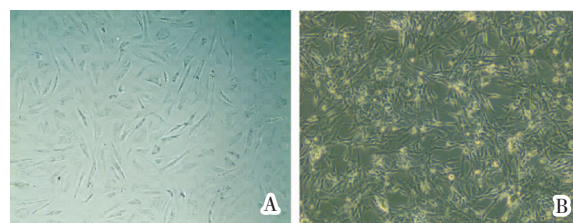
### 3 结果

#### 3.1 兔RPE细胞鉴定

如图1所示,Cytokeratin-8特异性抗体免疫荧光法结果显示:荧光显微镜下观察RPE细胞,荧光遍及胞质,细胞角蛋白染色呈强阳性。

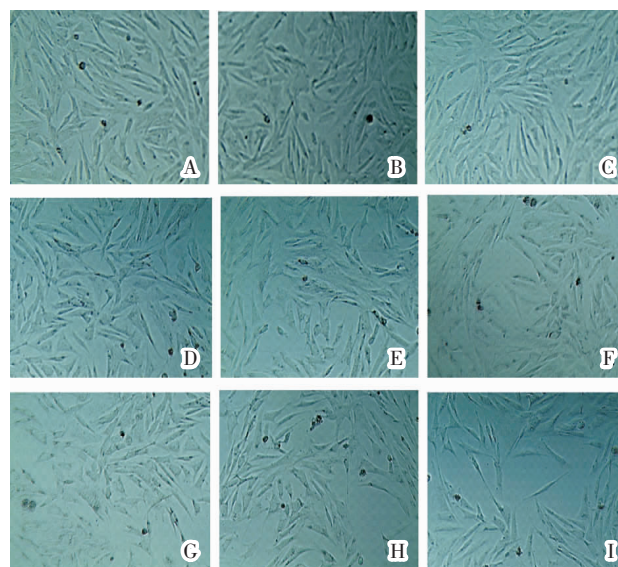
#### 3.2 含药血浆对RPE细胞生长情况的影响

倒置显微镜下观察细胞形态,如图2所示,空白对照组与正常血浆组细胞分布较为密集,实验各组中5%~20%含药血浆组细胞与正常组相比,细胞密度无明显减小;而40%~100%含药血浆各组细胞活性受到一定的抑制,细胞密度减小,并呈一定的量效关系。



注:A.原代贴壁RPE细胞;B.RPR细胞免疫荧光染色

图1 兔原代RPE细胞鉴定显微图( $\times 100$ )



注:A.空白对照组;B.正常血浆组;C.5%含药血浆组;D.10%含药血浆组;E.20%含药血浆组;F.40%含药血浆组;G.60%含药血浆组;H.80%含药血浆组;I.100%含药血浆组

图2 不同浓度的含药血浆对RPE细胞的影响光镜图( $\times 100$ )

#### 3.3 CCK8法检测活血散结方含药血浆对兔RPE细胞的毒性作用

如表1所示,含药血浆干预RPE细胞48 h后细胞毒性检测结果显示为5%~20%的含药血浆组细胞活力OD值与正常组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),40%~100%的含药血浆各组细胞活力OD值与正常血浆组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 各组含药血浆干预RPE细胞48 h后细胞活力检测结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	OD值	抑制率/%
空白对照组	0.758 $\pm$ 0.021	-
正常血浆组	0.751 $\pm$ 0.044	-
5%含药血浆组	0.750 $\pm$ 0.019	0.16
10%含药血浆组	0.748 $\pm$ 0.010	0.35
20%含药血浆组	0.737 $\pm$ 0.048	1.92
40%含药血浆组	0.669 $\pm$ 0.030 <sup>△</sup>	10.95
60%含药血浆组	0.590 $\pm$ 0.018 <sup>△</sup>	21.46
80%含药血浆组	0.422 $\pm$ 0.007 <sup>△</sup>	43.75
100%含药血浆组	0.377 $\pm$ 0.007 <sup>△</sup>	49.85

注:与正常血浆组比较, $\Delta P < 0.05$



## 4 讨论

中医学文献对PVR无相应病名的记载,缺乏对其病机的阐述,因其为有形之物,类似中医学“积聚”范畴,又因PVR各阶段症状差异,可归属于“暴盲”“云雾移睛”和“视瞻昏渺”范畴<sup>[15]</sup>。目前研究认为该病与“癥瘕”的病理病机相似<sup>[16]</sup>,与肝肾脾三脏密切相关<sup>[17]</sup>,同时彭清华教授还提出外伤PVR的病机为血水互结<sup>[18]</sup>。活血散结方由三七、丹参、鳖甲、地龙、昆布、海藻等中草药组成,方中三七化瘀止血活血,丹参活血祛瘀,入肝经血分,二药合用活血化瘀,共为君药;鳖甲软坚散结,入肝肾两经,与君药合用加强活血化瘀散结之功,为方中臣药;地龙通行经络,清热利水,昆布、海藻消痰软坚,利水消肿,入肝肾两经,三药合用助化痰软坚,利水散结之功。全方共奏活血化瘀、软坚散结之功,使眼内瘀血痰结之有形之物利散,改善眼底情况提高患者视功能。近年来研究发现活血散结方中中药多具有抗凝、抗纤维、抑制细胞异常增殖的作用<sup>[10,19]</sup>。

有研究表明,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药理机制有效的研究方式<sup>[20]</sup>。本研究采取血浆药理学方法<sup>[21]</sup>,不同浓度活血散结方含药血浆干预RPE细胞48h后检测细胞毒性。倒置显微镜下观察细胞形态,发现5%~20%含药血浆干预的RPE细胞密度变化不大,而40%~100%含药血浆干预下的RPE细胞受到一定的抑制,细胞密度下降;CCK8法检测显示含药血浆对RPE细胞均有不同程度的抑制作用,且存在一定量效关系(正相关),其中5%~20%含药血浆对细胞有较弱的抑制作用,与正常血浆组比较,抑制率差异无统计学意义( $P>0.05$ );而40%~100%含药血浆对细胞生长有明显的抑制作用,与正常血浆比较,抑制率差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。综合考虑,活血散结方含药血浆可以一定程度抑制RPE细胞,可选择抑制率较低的5%~20%含药血浆浓度作为后续研究的干预浓度,进一步探讨PVR发生、发展过程中RPE细胞的作用机制。

## 参考文献

[1] 薛晓辉. VEGF和bFGF在增生性玻璃体视网膜病变患者玻璃体

中的表达及意义[J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(6): 707-708, 719.

- [2] 董尼娜. 干扰素- $\gamma$ 联合曲安奈德防治兔增生性玻璃体视网膜病变的实验研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [3] 陶勇, 姜燕荣, 高新晓. 外伤性视网膜脱离眼发生严重增生性玻璃体视网膜病变的危险因素研究[J]. 眼科新进展, 2009, 29(8): 594-596.
- [4] 孙蕾. 靶向PDGF-A RNA干涉抑制增生性玻璃体视网膜病变中RPE细胞增殖的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [5] 李兰根, 王伟, 张玉凤, 等. 视网膜色素上皮细胞氧化应激过程中SirT1/STAT3的相互作用[J]. 眼科新进展, 2017, 37(12): 1-3.
- [6] 路永珩, 郑轶. 增生性玻璃体视网膜病变发病机制与治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(13): 2548-2552.
- [7] 焦明菲, 颜华. 增生性玻璃体视网膜病变的药物治疗[J]. 眼科研究, 2010, 28(4): 381-384.
- [8] 陈吉, 彭清华, 邢雁飞, 等. 散血明目片对外伤性增生性玻璃体视网膜病变兔眼玻璃体结缔组织生长因子的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2006, 16(4): 224-227.
- [9] 张亚妮. 散结明目片对兔视网膜保护及抗增殖作用的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2010.
- [10] 彭清华, 刘婷, 彭俊, 等. 益气养阴活血利水中药复方对兔视网膜脱离后视网膜组织中ATP含量的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(7): 28-30.
- [11] 肖华, 范钦华. 中药干预对防治增生性玻璃体视网膜病变的基础研究[J]. 四川中医, 2013, 31(11): 156-158.
- [12] 王文丽. 海昆化瘀片调控RPE诱导的增生性玻璃体视网膜病变TGF- $\beta$ 表达的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [13] XU G X, YANG J, SUN T S, et al. Primary culture of human retinal pigment epithelium in vitro[J]. International Journal of Ophthalmology, 2004, 4(1): 12-15.
- [14] 胡健艳, 陈雪, 陈辉, 等. 兔视网膜色素上皮细胞培养和鉴定[J]. 南通大学学报, 2005, 25(3): 171-173.
- [15] 彭清华, 彭俊. 暴盲病名沿革及分化[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(9): 1812-1813.
- [16] 王文丽, 叶河江, 张晓婷, 等. 从眼内癥瘕论治增生性玻璃体视网膜病变[J]. 四川中医, 2013, 31(4): 33-34.
- [17] 吴要华. 化瘀散结片对DispaseI诱导的试验性增生性玻璃体视网膜病变müller细胞的影响[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [18] 付美林, 彭清华, 陈吉, 等. 活血利水法对兔外伤性PVR增殖膜上EGFmRNA表达的影响[J]. 国际眼科杂志, 2012, 12(1): 25-29.
- [19] 余肖. 三七对防治外伤性增生性玻璃体视网膜病变的实验研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [20] 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[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(12): 62-64.
- [21] 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[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.

(本文编辑 杨 瑛)