

芪参益气滴丸干预糖尿病大鼠虹膜微血管病变的作用机制研究

金 明 刘海丹 张有花

摘要 目的 采用激光共聚焦显微镜超速摄像技术和荧光白蛋白标记技术,动态观察芪参益气滴丸干预糖尿病大鼠虹膜微血管病变的作用机制。方法 链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立 1 型糖尿病大鼠模型,随机分为模型组、治疗组、对照组,并设正常组。治疗组灌服芪参益气药液,对照组灌服多贝斯液[1 g/(kg·d)],疗程 10 个月。利用激光共聚焦显微镜超速摄像动态观察虹膜微循环状态。结果 治疗组虹膜血流速度明显加快,虹膜血管内、外荧光密度降低,荧光渗漏面积及虹膜血管管径明显缩小,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 芪参益气滴丸在改善虹膜微血管流态方面的确有一定作用,可以促进血流加快,抑制血管异常扩张及改善虹膜微血管的通透性异常增高状态。

关键词 激光共聚焦显微镜超速摄像;微循环;虹膜;芪参益气滴丸

Study on Acting Mechanism of Shenqi Yiqi Drop Pill for Intervening Irido-microangiopathy in Diabetic Rats

JIN Ming, LIU Hai-dan, and ZHANG You-hua *Department of Ophthalmology, the China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)*

ABSTRACT **Objective** Use laser confocal microscopy overspeed camera technique and fluorescence albumin labeling to study the acting mechanism of Qishen Yiqi Drop Pill (QYDP) for intervening irido-microangiopathy (IMAP) in diabetic rats. **Methods** Rat model of diabetes mellitus type 1 (DM1) was established by intraperitoneal injection of streptozocin (STZ). The model rats were randomly divided into three groups, the treatment group, the model group and the control group. At the same time a normal control group was set up. The treatment group was medicated with QYDP (prepared into liquid form), and the control group with Duobeisi liquor (1g/kg per day) for 10 months. The dynamic state of iris microcirculation in rats was observed using laser confocal microscopy overspeed camera. **Results** Compared with the treatment group, blood flow in iris of model rats was slower significantly ($P < 0.01$); the fluorescence density and leakage area of inside and outside iris vessels, and the iris vascular diameter were significantly higher in the model group than those in the treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion** QYDP has definite effect in improving iris microcirculation, which can accelerate the blood flow, inhibit the abnormal expansion of vessels and improve the increased iris micro-vascular permeability.

KEYWORDS laser confocal microscopy overspeed camera; microcirculation; iris; Qishen Yiqi Drop Pill

糖尿病并发症不仅能引起糖尿病性视网膜病变,还可以引起糖尿病性虹膜病变^[1]。但目前国内有关糖尿病性虹膜微血管病变研究并不多见,原因是有色人种(黄种人)虹膜色素丰富,很难观察到虹膜微血管的动态变化。而动物 SD 大鼠虹膜无色素,可以清晰看到血管结构。特别是利用激光共聚焦显微镜超速摄像能够捕捉录制到虹膜血液流态和血流速度,这在眼部也是能窥到血管动态变化的部位。我们选择 SD 大鼠经腹腔注射链脲佐菌素(STZ)制作糖尿病模型,目的是观察由睫状血管系统提供虹膜营养的微血管结构

发生了哪些变化,对于揭示糖尿病性视网膜病变和虹膜微血管病变之间的关系具有重要的价值。

中医药在防治早期糖尿病眼部微血管病变方面具有一定的特色和优势。综观消渴目病的发病过程,中医病机为本虚标实、虚实夹杂。“本虚”体现于糖尿病早期阴虚燥热为主,中期气阴两虚居多,晚期演变为阴阳两虚;“标实”体现在气滞血瘀贯穿始终^[1]。因此,我们按照中医辨证思路,拟采用益气活血法,选用参芪益气滴丸观察药物对糖尿病大鼠虹膜微循环的改善作用,现报道如下。

材料与方法

1 材料

1.1 药物 多贝斯胶囊(calcium dobesilate cap-

作者单位:中日友好医院眼科(北京 100029)

通讯作者:金 明, Tel: 010-84205357, E-mail: jinming321@yahoo.

com. cn

sules):主要成分为 2,5-二羟基苯磺酸钙-水合物,0.25 g/粒,宁夏康亚药业有限公司生产。芪参益气滴丸:为中药提纯浸膏,主要成分为黄芪 261 g 丹参 240 g 三七 42 g 降香 19 g,由天津天士力制药股份有限公司生产。

1.2 动物 SPF 级 6 周龄 SD 大鼠,雄性,体重 180~220 g,由维通利华实验动物研究所提供。

1.3 仪器 激光共聚焦显微镜(倒立):DM-IRB, Leica, 德国;彩色照相机:JK-TU53H, Toshiba, 日本;DVD 录影机:DVR-R25, Malata, 中国。

2 方法

2.1 动物模型的建立及分组 造模前大鼠禁食 18 h,按 65 mg/kg 体重大鼠左下腹腔内注射 STZ。正常组注射同等体积的柠檬酸缓冲液。72 h 后取尾静脉血,用快速血糖仪(罗康全活力型血糖仪)测量血糖,空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 者为 1 型糖尿病大鼠模型。造模后随机分为模型组、治疗组、对照组各 6 只,正常组 6 只。所有大鼠自由摄食饮水,实验周期 10 个月。造模 1 周后开始给药,治疗组灌服芪参益气药液、对照组灌服多贝斯药液。每日给药剂量均为 1 g/kg。

2.2 活体大鼠虹膜微循环观察 10% 水合氯醛按 3 mL/kg 体重腹腔注射麻醉大鼠。用开睑器撑开大鼠上下眼睑,充分暴露虹膜。从股静脉按 0.5 mL/100 g 注射荧光标记白蛋白,将暴露完全的虹膜置于装有彩色照相机的激光共聚焦显微镜下观察。观察到的图像输出到显示器上,并被 DVD 刻录保存^[2]。血流速度评分标准(表 1)参照《微循环方法学》^[3]。

表 1 血流速度评分标准

分级	流态	评分
线流	血流快,呈光滑的索条状,毫无颗粒感,形如塑料带	1
线粒流	血流快,呈光滑索条状,稍有颗粒感,形如绸带	2
粒线流	血流较快,连续成线,有明显颗粒感,形如布带	3
粒流	血流较慢,轴流、缘流混杂,如泥沙流,形如麻带	4
粒缓流	血流呈泥沙状,连续缓慢流动	5
粒摆流	血流呈泥沙状,前后摆动,仍能向前流动	6
停滞	血流停滞不动	7

2.3 图像分析 图像采集完成后,取大鼠每只眼全虹膜的上、下、左、右 4 个象限(等面积)的图像进行分析。

2.4 虹膜血管直径、血管密度、血管内外相对荧光密度及荧光渗漏面积的测量 应用 Kodak 公司的 Image Plus Pro 6.0 图像分析系统进行测量。血管直径取每个象限内所有血管直径的平均值;血管密度取每个象限内的血管根数与该象限面积的比值,每只眼虹膜的血管密度为 4 个象限比值的平均值;血管内外相

对荧光密度取每个象限血管内外荧光强度与相应象限瞳孔区荧光强度比值,每只眼虹膜血管内外相对荧光密度为 4 个象限荧光强度比值的平均值;荧光渗漏面积取每只大鼠每只眼全虹膜荧光渗漏面积的总和。

2.5 统计学方法 所得实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均值的差异性采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析。

结 果

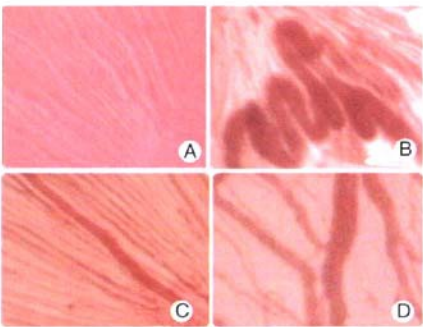
1 各组治疗前后虹膜血流速度积分比较(表 2) 与本组治疗前比较,正常组虹膜血流速度稳定,模型组虹膜血流速度明显降低,治疗组较模型组明显加快($P < 0.01$),对照组与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组治疗前后虹膜血管直径比较(表 2,图 1) 正常组虹膜血管管径均匀,模型组较正常组血管管径明显扩张,治疗组较模型组明显减低($P < 0.01$),对照组与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组治疗前后血流速度积分及虹膜血管直径比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	时间	血流速度积分(分)	虹膜血管直径(μm)
正常	12	治疗前	1.00 $\pm$ 0	14.82 $\pm$ 4.09
		治疗后	1.20 $\pm$ 0.24	15.34 $\pm$ 2.53
模型	12	治疗前	1.12 $\pm$ 0.25	15.49 $\pm$ 3.05
		治疗后	3.52 $\pm$ 0.33*	52.53 $\pm$ 14.34*
治疗	12	治疗前	1.02 $\pm$ 0.05	15.14 $\pm$ 5.19
		治疗后	2.47 $\pm$ 0.67 $^{\Delta}$	34.80 $\pm$ 10.87 $^{\Delta}$
对照	12	治疗前	1.07 $\pm$ 0.07	15.39 $\pm$ 3.91
		治疗后	3.25 $\pm$ 0.81*	45.58 $\pm$ 7.78*

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.01$



注:A 为正常组,大鼠虹膜血管管径均匀,未见明显扩张的血管;B 为模型组,大鼠虹膜血管粗细不均,可见明显扩张的虹膜血管;C 为治疗组,虹膜血管扩张程度较模型组减轻;D 为对照组虹膜血管(彩色照相 $\times 10$)

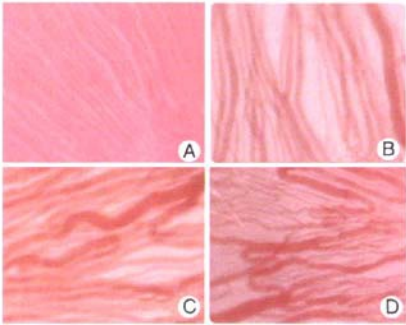
图 1 各组大鼠虹膜血管扩张程度比较

表 3 各组治疗前后虹膜微血管密度、血管内外相对荧光密度及荧光渗漏面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	时间	微血管密度 (根/mm)	血管内相对荧光 密度比值	血管外相对荧光 密度比值	荧光渗漏面积 (mm ²)
正常	12	治疗前	8.77 ± 1.07	0.46 ± 0.12	0.92 ± 0.02	0 ± 0
		治疗后	8.97 ± 1.30	0.52 ± 0.084	0.93 ± 0.026	0.08 ± 0.16
模型	12	治疗前	8.95 ± 0.37	0.54 ± 0.11	0.94 ± 0.02	0 ± 0
		治疗后	5.76 ± 0.64*	1.93 ± 0.26*	1.37 ± 0.17*	1.93 ± 0.26*
治疗	12	治疗前	8.83 ± 0.45	0.50 ± 0.09	0.93 ± 0.03	0 ± 0
		治疗后	6.69 ± 0.48	1.17 ± 0.26 ^{△△}	1.05 ± 0.15 [△]	0.24 ± 0.12 [△]
对照	12	治疗前	8.87 ± 1.09	0.51 ± 0.09	0.93 ± 0.04	0 ± 0
		治疗后	5.96 ± 0.61	1.96 ± 0.47	1.34 ± 0.31	0.48 ± 0.21

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

3 各组治疗前后虹膜微血管密度比较(表 3,图 2) 正常组虹膜血管密度粗细均匀,密度适中。模型组血管密度较正常组明显减低,治疗组、对照组与模型组虹膜血管密度比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为正常组,大鼠虹膜血管密度粗细均匀,密度适中,虹膜血管分布均匀;模型组(B)、治疗组(C)以及对照组(D)大鼠虹膜血管密度较正常组明显减低,且虹膜血管分布不均(彩色照相×10)

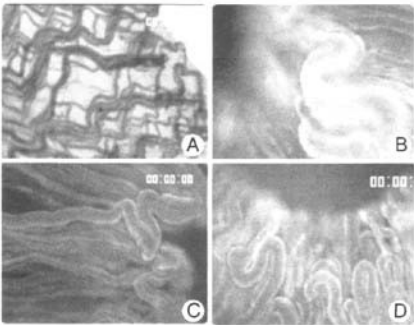
图 2 各组大鼠虹膜血管密度比较

4 各组虹膜微血管荧光充盈比较(表 3、图 3) 正常组虹膜血管内荧光素呈荧光增强不渗漏,模型组血管内壁荧光染色,治疗组荧光染色明显降低($P < 0.01$),对照组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5 各组虹膜微血管荧光渗漏面积比较(表 3,图 4) 正常组虹膜微血管管壁不渗漏荧光,模型组荧光渗漏面积明显高于正常组($P < 0.01$),治疗组荧光渗漏面积低于模型组($P < 0.05$),对照组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

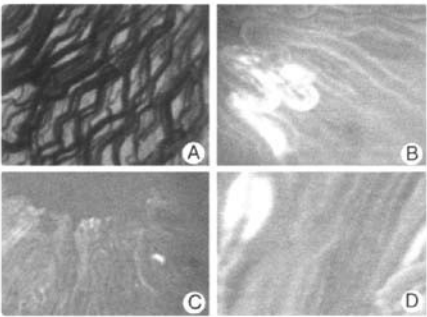
讨 论

1 虹膜微血管结构的显影状态与血管流速变化 糖尿病性虹膜微血管病变在国内的研究报道很少。其



注:A 为正常组,大鼠虹膜血管管壁光滑,未见荧光染色;B 为模型组,大鼠虹膜血管管壁荧光染色明显增强;与模型组比较,治疗组(C)与对照组(D)大鼠虹膜血管管壁荧光染色相对减弱(荧光照相×10)

图 3 各组大鼠虹膜血管管壁荧光染色比较



注:A 为正常组,大鼠虹膜血管管壁未见荧光渗漏区;B 为模型组,大鼠虹膜血管管壁可见大面积的荧光区;与模型组比较,治疗组(C)及对照组(D)虹膜血管管壁的荧光渗漏面积相对较小(荧光照相×10)

图 4 各组大鼠虹膜血管荧光渗漏面积比较

原因是国人有色人种虹膜色素丰富,遮蔽了虹膜微血管的形态。而国外对虹膜微血管形态的研究报道多于国内,因为白种人虹膜色素稀少,可以清晰观察到其微血管形态变化^[4]。所以,利用虹膜荧光造影图像(IFA)可以较清晰地看到虹膜表面血管形态,在虹膜基质层血管不能很好显影时,利用高分辨率的激光扫

描眼底镜(SLO)也弥补了虹膜基质层血管造影不能很好成像的不足^[5-7]。但我们研究的特色是采用造影剂既不是荧光素钠,也不是吲哚青绿造影剂,而是荧光标记白蛋白,可以更清晰地追踪到不同层面上血管、血球、管壁的结构变化,采用从股静脉按 0.5 mL/100g 体重注射荧光标记白蛋白的方式。因此,在造影剂的筛选和操作方法上都有一定的创新。

尽管国外研究虹膜微血管形态较为深入,但尚未见到能够拍摄到血管流速的图像。而我们所采用的激光共聚焦显微镜超速摄像仪,将其用于虹膜,在荧光蛋白显影下,清晰地拍摄到虹膜微血管的血流速度。结果显示:模型组 SD 大鼠虹膜微血管明显扩张,血液流速明显减慢,并可以看到血液成分在血管中缓慢流动的状态。目前尚未见过这方面的报道。

作为新型血管保护剂的多贝斯胶囊,是临床治疗糖尿病视网膜病变的有效药,可降低微血管壁通透性,降低血黏度,抑制前列腺素等活性物质对微血管的高通透作用,防止血栓形成,减少血管内膜的损伤^[8],所以选作阳性对照药。

2 糖尿病可以引起睫状血管系统的供血障碍 虹膜基质血管分为虹膜动脉大环和虹膜动脉小环。虹膜动脉大环由睫状后长动脉和睫状前动脉分支吻合而成,发出大部分虹膜放射状血管;虹膜血管小环位于瞳孔缘外 1.5 mm 瞳孔缘处,大部分虹膜动脉在瞳孔缘分支成毛细血管后折回形成静脉。虹膜静脉彼此吻合,在虹膜根部进入睫状肌与睫状突静脉吻合^[9,10]。在持续高血糖的刺激下,可引起视网膜血管和肾血管的损害,糖尿病性视网膜微血管最为常见。而结果显示,眼动脉的两个分支可以相继受累,既影响了视网膜中央动脉系统障碍,也影响了睫状动脉系统灌注不良,显示虹膜微血管发生了扩张、迂曲性变化、通透性增强,管壁荧光染色等。其机制为虹膜组织缺血缺氧,毛细血管代偿性扩张;其超微病理学水平的特点是毛细血管基底膜变厚,并有与之相关的全身血管的通透性增加^[11]。

3 益气活血法可以改善虹膜微循环状态 芪参益气滴丸主要由黄芪、丹参、降香、三七组成。其药理学研究作用为:增加血流量,减轻缺血性损害,降低血小板聚集及血液黏滞度,清除自由基,改善微循环,促进发生障碍的微循环血流速度加快。本结果表明:治疗组血流速度较模型组明显加快,血管通透性异常增加较模型组低,血管异常扩张较模型明显减轻。

综上所述,采用从股静脉注射荧光标记白蛋白,利用激光共聚焦显微镜超速摄像仪,可以捕捉到虹膜微血管的血液流动速度和结构变化,显示芪参益气滴丸在

改善微循环、增加单位血流量、改善缺血状态、促进发生障碍的微循环血流速度加快、抑制静脉血管的异常扩张、降低血管内皮损伤引起的血管壁通透性异常增高等方面有较好的疗效。其作用机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 张承芬,张惠蓉. 糖尿病的眼部并发症及治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:81-81.
Zhang CF, Zhang HR. Diabetes' ocular complication and treatment [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003:81.
- [2] Han JY, Horie Y, Li D, et al. Attenuating effect of myokuryu on mesenteric microcirculatory disorders induced by ischemia and reperfusion [J]. Clin Hemorheol Microcirc 2006;34(1-2):145-150.
- [3] 田牛主编. 微循环方法学[M]. 北京:原子能出版社,1987:32.
Tian N, ed. Microcirculation methodology. Beijing: Atomic Energy Press, 1987:32.
- [4] 崔颖,罗光伟. 虹膜血管造影的临床应用研究[J]. 国际眼科纵览,2006,30(4):277-281.
Cui Y, Luo CW. Iris angiography[J]. Inter Rev Ophthalmol, 2006,30(4):277-281.
- [5] Terasaki H, Miyake Y, Mori M, et al. Fluorescein angiography of extreme peripheral retina and rubeosisirisidisin proliferative diabeticretinopathy [J]. Retina, 1999, 19(4):302-308.
- [6] Matsubara T, Uyama M, Fukushima I, et al. Histological proof of indocyanine green angiography-healthy eyes [J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1999,103(7):497-505.
- [7] Yoshikawa K, Takahashi Y, Ohson T, et al. Fluorescein iris angiography and anterior segment fluorophotometry in patients with Behcet's disease [J]. Jpn J Ophthalmol, 1987, 31(3):425-432.
- [8] 邓辉,金明,苑维,等. 复方丹参滴丸治疗早期糖尿病视网膜病变的临床观察[J]. 中国中医眼科杂志,2005,15(2):72-74.
Deng H, Jin M, Yuan W, et al. Clinical observation of compound prescription salvia miltiorrhiza drop pill treating early diabetic retinopathy [J]. J Tradit Chin Ophthalmol, 2005,15(2):72-74.
- [9] Ino-ue M, Azumi A, Shirabe H, et al. Iridopathy in eyes with proliferative diabetic retinopathy: detection of early stage of rubeosis iridis [J]. Ophthalmologica, 1998;212(1):15-18.
- [10] Bandello F, Brancato R, Lattanzio R, et al. Relation between iridopathy and retinopathy in diabetes [J]. Br J Ophthalmol, 1994,78(7):542-545.
- [11] 王海燕,主编. 内科学[M]. 北京:北京大学出版社,2005:1101.
Wang HY, ed. Internal medicine. Beijing: Peking University Press, 2005:1101.

(收稿:2009-09-23 修回:2009-11-15)