

### 【实验研究】

## 阿魏酸对视网膜色素变性小鼠血浆内皮素-1 表达的影响

孙晓伟 殷晓贝 崔卉 李根林

SUN Xiao-Wei, YIN Xiao-Bei, CUI Hui, LI Gen-Lin

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是视网膜感光细胞和色素上皮细胞变性所致的一组具有复杂遗传和临床异质性的致盲眼病<sup>[1]</sup>。研究发现, RP 患者血浆内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 水平明显

升高,可能导致眼底血流下降,缺血缺氧加速了病变的发展<sup>[2]</sup>。目前,对于 RP 的治疗包括基因治疗、手术治疗和药物治疗。从安全、有效、可行的角度考虑,使用药物治疗促进视网膜神经细胞活性、维持眼

底血氧供应、延缓变性发展以保留视力是最佳选择。阿魏酸(ferulic acid)是源于中药当归和川芎的主要有效活性成分之一。阿魏酸及其衍生物是一类新的非肽类内皮素受体拮抗剂,能够调节内皮细胞功能,降低 ET-1 水平<sup>[3-4]</sup>。本研究旨在探索 RP 由轻到重的发展过程中,rd 小鼠血浆 ET-1 水平的动态表达情况,并用阿魏酸加以干预,探讨不同浓度阿魏酸对血浆 ET-1 浓度的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新出生的 rd 小鼠 90 只及 C57/BL6 小鼠 18 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,雌雄不限。由清华大学实验动物中心饲养。饲养条件:光照周期为 10 h/14 h 节律,环境温度约为 25 ℃。饲养级别:无特定病原体动物(SPF)级。

1.2 主要试剂和仪器 阿魏酸(中国食品药品检定研究院标准品);小鼠 ET-1 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);麻醉剂 avertin(清华大学动物实验中心提供);生理盐水(北京双鹤 500 mL 注射液)。小鼠灌胃针头(泪道冲洗针头部包裹树脂);低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 5415R);紫外分光光度计(日立公司 U-3900);眼科剪、平镊、齿镊(北京明仁医疗器械有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 将新出生的 rd 小鼠按照不同的阿魏酸给药浓度分成 4 组:0.25 g · L<sup>-1</sup>组、0.50 g · L<sup>-1</sup>组、0.75 g · L<sup>-1</sup>组、1.00 g · L<sup>-1</sup>组,每组再按照给药时间分为 2 周组、3 周组、4 周组,每组各 6 只,以上 12 组为药物处理组,均于出生后第 2 天开始灌胃,每天每 10 g 体质量给予不同浓度阿魏酸悬液 0.2 mL,按照分组分别灌胃 2 周、3 周和 4 周。取 2 周龄、3 周龄、4 周龄的 rd 小鼠各 6 只不作处理作为病变对照组,相同周龄的 C57/BL6 小鼠各 6 只作为正常对照组。

1.3.2 rd 小鼠血浆的制备 各组分别于相应时间点取小鼠眼眶血浆。用麻醉剂 avertin 对 rd 小鼠行腹腔注射(每 10 g 体质量 0.12 ~ 0.15 mL),待小鼠麻醉后,用眼科剪剪除其胡须,然后用体积分数 75% 医用酒精对其眼部周围毛发进行消毒处理,摘出眼球取血,将小鼠眼眶流出的血液滴入 1.5 mL Eppendorf 抗凝管,手指轻轻按压小鼠胸腔、腹腔以使血液排净。将抗凝管上下颠倒,使血混匀,4 ℃ 下 1000 r · min<sup>-1</sup>离心 20 min,吸取上清液分装保存于 -80 ℃ 深低温冰箱备用。

1.3.3 ET-1 浓度检测 参照小鼠 ET-1 ELISA 试剂盒说明书进行。使用软件“Curve Expert 1.3”,以 OD 值为纵坐标,标准品浓度为横坐标,制作标准曲线。用标准品的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式,将样本的 OD 值代入方程式,计算出样本浓度。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 17.0 进行统计学分

析,进行数据的正态性和方差齐性检验。若各组数据满足正态分布及方差齐性,采用单因素方差分析及组间两两 LSD-*t* 检验;如各组数据方差不齐,采用 Kruskal-Wallis *H* 秩和检验及组间两两 Tambane's T2 (*M*) 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

在不同时间点,病变对照组 rd 小鼠的血浆 ET-1 浓度均高于正常对照组,尤其灌胃 3 周、4 周时与正常对照组相比差异均有统计学意义(*P* = 0.024、0.010)。正常对照组 C57/BL6 小鼠 2 周龄、3 周龄和 4 周龄血浆 ET-1 水平呈现比较稳定的趋势;rd 小鼠随周龄增长血浆 ET-1 水平呈现持续上升的趋势(表 1)。

阿魏酸治疗 2 周,与病变对照组相比,0.50 g · L<sup>-1</sup>组、0.75 g · L<sup>-1</sup>组 ET-1 水平有所下降,但差异均无统计学意义(*P* = 0.287、0.140),0.25 g · L<sup>-1</sup>组、1.00 g · L<sup>-1</sup>组 ET-1 有所升高,但差异亦无统计学意义(*P* = 0.403、0.749);0.50 g · L<sup>-1</sup>组、0.75 g · L<sup>-1</sup>组 ET-1 水平与正常对照组基本持平(*P* = 0.913、0.750),0.25 g · L<sup>-1</sup>组、1.00 g · L<sup>-1</sup>组明显高于正常对照组,但差异无统计学意义(*P* = 0.059、0.140)。阿魏酸治疗 3 周,与病变对照组相比,0.25 g · L<sup>-1</sup>组、0.50 g · L<sup>-1</sup>组、0.75 g · L<sup>-1</sup>组 ET-1 水平均有所下降,其中 0.50 g · L<sup>-1</sup>组下降最为明显,差异有统计学意义(*P* = 0.034),1.00 g · L<sup>-1</sup>组稍高,差异无统计学意义(*P* = 0.790);0.25 g · L<sup>-1</sup>组、0.50 g · L<sup>-1</sup>组、0.75 g · L<sup>-1</sup>组 ET-1 水平稍高于正常对照组(*P* = 0.257、0.876、0.585),1.00 g · L<sup>-1</sup>治疗组明显高于正常对照组,差异有统计学意义(*P* = 0.013)。阿魏酸治疗 4 周,与病变对照组相比,0.25 g · L<sup>-1</sup>组、0.50 g · L<sup>-1</sup>组和 0.75 g · L<sup>-1</sup>组均明显下降,且差异均有统计学意义(*P* = 0.011、0.027、0.021),1.00 g · L<sup>-1</sup>组下降不明显(*P* = 0.433);与正常对照组相比,0.25 g · L<sup>-1</sup>组、0.50 g · L<sup>-1</sup>组和 0.75 g · L<sup>-1</sup>组 ET-1 水平升高,但差异无统计学意义(*P* = 0.348、0.147、0.178),1.00 g · L<sup>-1</sup>组明显升高,差异有统计学意义(*P* = 0.009,见表 1)。

表 1 各组小鼠血浆 ET-1 的表达情况  
Table 1 Serum concentration of ET-1 in rd mouse with ferulic acid treatment ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Group	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Normal control	53.628 ± 26.244	43.246 ± 17.332 <sup>#</sup>	52.762 ± 14.512 <sup>#</sup>
Diseased control	67.272 ± 13.200	74.730 ± 23.928 <sup>*</sup>	94.982 ± 22.630 <sup>*</sup>
0.25 g · L <sup>-1</sup> ferulic acid	70.962 ± 22.501	58.533 ± 21.592	64.066 ± 12.697 <sup>#</sup>
0.50 g · L <sup>-1</sup> ferulic acid	54.882 ± 14.152	45.333 ± 11.890 <sup>#</sup>	69.690 ± 16.527 <sup>#</sup>
0.75 g · L <sup>-1</sup> ferulic acid	49.952 ± 2.369	50.545 ± 17.791	68.449 ± 25.818 <sup>#</sup>
1.00 g · L <sup>-1</sup> ferulic acid	70.963 ± 21.658	78.283 ± 36.714 <sup>*</sup>	89.955 ± 13.427 <sup>*</sup>
<i>F</i>	1.830	2.574	3.636
<i>P</i>	0.137	0.047	0.012

Note: Compared with normal control group, <sup>\*</sup> *P* < 0.05; Compared with diseased control group, <sup>#</sup> *P* < 0.05

3 讨论

rd 小鼠是常用的 RP 动物模型,属于常染色体隐

性遗传,因 Pde6b 基因发生无义突变,引起磷酸二酯酶  $\beta$  亚基的功能异常所致。既往研究发现,正常小鼠出生 2 周后,视网膜各层结构基本发育完全,随着时间的推移,各层结构日益完善;而 rd 小鼠出生后 2 周时外节段变薄,膜盘少见,内节结构不完整,外核层细胞层数明显减少;3 周时外节段基本消失,外核层只剩一层细胞,外丛状层变薄;4 周时内节段高度变形,外核层仅残存少许胞体,外丛状层极薄,部分区域已消失<sup>[5]</sup>。据此,本研究设置的 3 个时间点,即出生后 2 周、3 周、4 周,分别对应 rd 小鼠 RP 的早期、中期和晚期。

在退行性视网膜变性过程中,患者眼部血供常出现异常,RP 患者典型的体征就包括视网膜血管纤细,荧光血管造影也可发现脉络膜毛细血管萎缩。RP 患者也有血清 ET-1 浓度升高的现象,表现为血管舒缩功能障碍<sup>[6]</sup>,易手脚冰凉,视网膜和脉络膜血流速度明显下降<sup>[2]</sup>。Cellini 等<sup>[7]</sup>研究发现,RP 患者血浆 ET-1 水平约是正常人的 1.6 倍,且与眼动脉和睫状后长动脉的收缩期峰速血流速度呈负相关。Zhang 等<sup>[8]</sup>的研究发现,RP 患者视网膜脉络膜血流较正常人下降了  $52\% \pm 8\%$ 。国内亦有学者发现,RP 患者眼动脉、视网膜中央动脉和睫状动脉血流参数异常,提示眼部的血液供应和 RP 病理过程存在相关性<sup>[9]</sup>。Mi 等<sup>[10]</sup>研究发现,转基因小鼠 (TET-1 mice) 过表达 ET-1 致视网膜退行性变。

ET-1 主要由血管内皮产生,ET-1 通过结合不同类型的受体 ETA 或 ETB 发挥作用。ET-1 作用于心肌、血管平滑肌 ETA 受体可引起心脏和血管强烈收缩及重塑<sup>[11-12]</sup>。ETB 包括 ETB1 和 ETB2 两种不同亚型,ETB1 主要分布于内皮细胞,可促使内皮细胞释放 NO、PGI<sub>2</sub> 等物质,引起内皮依赖性血管舒张<sup>[13-14]</sup>;ETB2 分布于血管平滑肌细胞,可发挥收缩血管作用。正常情况下,ET-1 对于心血管的净效应取决于多种受体效应之间的平衡。

本研究发现,rd 小鼠随着病情的进展,其血浆 ET-1 水平持续上升。在各时间点,病变对照组的 ET-1 水平均高于正常对照组,提示 ET-1 水平与病情进展密切相关。视网膜大血管和脉络膜大、中血管层存在平滑肌层,ET-1 通过 ETA 受体发挥作用,血管明显收缩,ET-1 浓度持续维持在较高水平有可能造成血管结构重塑,血管纤细。脉络膜毛细血管无平滑肌层,主要由内皮细胞构成,在病变早期,ET-1 作用于 ETB1 受体释放 NO、PGI<sub>2</sub> 等扩血管物质,发挥一定代偿作用。病变后期,脉络膜视网膜血管的低灌注状态可能导致血管内皮损伤,最终导致脉络膜毛细血管层萎缩。

阿魏酸是一种非肽类内皮素受体拮抗剂,在心

血管疾病、肾病、脑血管疾病中研究较多,具有明显的降压和保护肾功能的作用<sup>[15-16]</sup>。本研究发现,RP 动物模型 rd 小鼠在病变过程中,血浆 ET-1 水平明显升高,可能与 RP 的发生、发展有关,经过不同浓度阿魏酸干预后,各个时间点 rd 小鼠血浆 ET-1 水平多有不同程度下降。其中,0.50 g · L<sup>-1</sup> 组、0.75 g · L<sup>-1</sup> 组 rd 小鼠血浆 ET-1 变化趋势与正常对照组最为接近,干预效果较好,有望为 RP 的治疗提供新的思路。阿魏酸虽然能有效降低血浆 ET-1 水平,但是否能够因此改善视网膜脉络膜微循环和视功能尚需进一步研究,如通过脉络膜血管铸型联合扫描电镜观察脉络膜微血管网、小鼠电生理检查等。

## 参考文献

- 1 Grunwald JE, Maguire AM, Dupont J. Retinal hemodynamics in retinitis pigmentosa [J]. *Am J Ophthalmol*, 1996, 122 (4): 502-508.
- 2 Beutelspacher SC, Serbecic N, Barash H, Burgansky-Eliash Z, Grinvald A, Krastel H, et al. Retinal blood flow velocity measured by retinal function imaging in retinitis pigmentosa [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249 (12): 1855-1858.
- 3 赵东平, 杨文钰, 陈兴福. 阿魏酸的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (8): 1839-1841.
- 4 王琦, 柳兢, 姚霁航. 阿魏酸钠对不稳定型心绞痛患者血清内皮素和一氧化氮的影响及临床疗效观察 [J]. 中国全科医学, 2007, 10 (8): 623-625.
- 5 段欣荣, 李根林, 李辽青. 快速退变性视网膜变性感光细胞超微结构变化分析 [J]. 眼科新进展, 2007, 27 (8): 568-572.
- 6 Liang SY, Lee LR. Retinitis pigmentosa associated with hypomagnesemia [J]. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2010, 38 (6): 645-647.
- 7 Cellini M, Strobbe E, Gizzi C, Campos EC. ET-1 plasma levels and ocular blood flow in retinitis pigmentosa [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88 (6): 630-635.
- 8 Zhang Y, Harrison JM, Nateras OS, Chalfin S, Duong TQ. Decreased retinal-choroidal blood flow in retinitis pigmentosa as measured by MRI [J]. *Doc Ophthalmol*, 2013, 126 (3): 187-197.
- 9 何婷, 李孟达, 殷晓贝, 孙晓伟, 王兰, 杨文利, 等. 原发性视网膜色素变性患者脉络膜和视网膜血流的异常变化 [J]. 中华眼科杂志, 2014, 50 (7): 518-522.
- 10 Mi XS, Zhang X, Feng Q, Lo AC, Chung SK, So KF. Progressive retinal degeneration in transgenic mice with overexpression of endothelin-1 in vascular endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (8): 4842-4851.
- 11 Shetty SS, Okada T, Webb RL, Delgrande D, Lappe RW. Functionally distinct endothelin B receptors in vascular endothelium and smooth muscle [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 191 (2): 459-464.
- 12 Davenport AP. International union of pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature [J]. *Pharmacol Rev*, 2002, 54 (2): 219-226.
- 13 Namiki A, Hirata Y, Ishikawa M, Moroi M, Aikawa J, Machii K. Endothelin-1- and endothelin-3-induced vasorelaxation via common generation of endothelium-derived nitric oxide [J]. *Life Sci*, 1992, 50 (10): 677-682.
- 14 Ushio-Fukai M, Nishimura J, Aoki H, Kobayashi S, Kanaide H. Endothelin-1 inhibits and enhances contraction of porcine coronary arterial strips with an intact endothelium [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 184 (1): 518-524.
- 15 王晓君, 黄文增, 张步延. 联服川芎素、培哚普利与单服培哚普利对高血压患者血管内皮功能和血压的影响 [J]. 中华高血压杂志, 2006, 14 (12): 993-996.
- 16 周万洪, 曹灵. 阿魏酸钠在肾脏疾病中的应用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8 (8): 495-496.