

· 药物研究 ·

# 环杷明对实验性脉络膜新生血管的抑制及对 Gli1 和 HIF-1 $\alpha$ 及 VEGF 表达的影响\*

何花,李贵刚,王志涛,何小阳

(华中科技大学同济医学院附属同济医院眼科,武汉 430030)

**[摘要]** 目的 探讨环杷明(cyclopamine)对实验性脉络膜新生血管的抑制机制。方法 利用倍频 532 nm 激光(140 mW,75  $\mu$ m,0.1 s)光凝方式建立 BN 大鼠的脉络膜新生血管(CNV)模型。光凝后立即将模型大鼠分为 4 组,分别为空白对照组、磷酸盐缓冲溶液(PBS)液组、环杷明 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>组和环杷明 4.0 mg·mL<sup>-1</sup>组。除空白对照组外,各组每只眼均从光凝当天开始至光凝后 13 d,每隔 1 d 分别行玻璃体腔内注射 PBS 5  $\mu$ L、2.5 mg·mL<sup>-1</sup>环杷明 5  $\mu$ L、4.0 mg·mL<sup>-1</sup>环杷明 5  $\mu$ L。激光光凝后 14 d 行荧光素眼底血管造影和吲哚菁绿眼底血管造影观察。取眼球标本分别行 FITC-右旋糖酐标记的脉络膜巩膜铺片和病理组织学观察,以检测各组处理对 CNV 面积和 CNV 中央厚度的影响。行 real-time PCR 检测各组处理对 Shh - Gli 信号级联反应和 HIF-1 $\alpha$ -VEGF 信号级联反应中 Gli1、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 表达的影响。结果 环杷明能显著减少实验性脉络膜新生血管的形成,并呈剂量依赖关系( $P<0.05$ );同时环杷明能明显下调 Gli1、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的 mRNA 表达水平( $P<0.05$ )。结论 Shh 信号通路的激活与 HIF-1 $\alpha$ -VEGF 信号通路共同参与了实验性脉络膜新生血管的形成。环杷明作为 Shh 信号通路阻断剂能成为新的抑制 CNV 形成的有效药物。

**[关键词]** 环杷明;脉络膜新生血管;Gli1;缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ;血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R988.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2010)08-0980-06

## Effects of Cyclopamine on Experimental Choroidal Neovascularization and Expression of Gli1, HIF-1 $\alpha$ and VEGF

HE Hua, LI Gui-gang, WANG Zhi-tao, HE Xiao-yang (Department of Ophthalmology, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT Objective** To investigate the efficacy and mechanism of cyclopamine on experimental choroidal neovascularization (CNV). **Methods** A Brown Norway rat model of CNV was induced by laser photocoagulation (140 mW, 75  $\mu$ m, 0.1 s) and rats were divided into blank control, PBS control and two cyclopamine treated groups (2.5 mg·mL<sup>-1</sup>, 4.0 mg·mL<sup>-1</sup>). Except for the blank control, rats were intravitreally injected with 5  $\mu$ L PBS, 2.5 mg·mL<sup>-1</sup> and 4.0 mg·mL<sup>-1</sup> of cyclopamine every other day, respectively, since the first day till day 13 of photocoagulation. On day 14, fluorescence fundus angiography and indocyanine green eyeground angiography were carried out. The eye samples were moved out to make choroidal flatmounts marked with FITC-dextran and histologic analysis. The Sonic hedgehog (Shh) Gli signal cascade reaction and mRNA expression level of Gli1, hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and VEGF in HIF-1 $\alpha$ -VEGF signal cascade reaction were further analyzed by real-time PCR. **Results** The laser-induced rat CNV was significantly inhibited by cyclopamine ( $P<0.05$ ), and which dose-dependently decreased the mRNA expression of Gli1, HIF-1 $\alpha$  and VEGF ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The activation of Sonic hedgehog signaling pathway and HIF-1 $\alpha$ -VEGF cascade are implicated in the development of experimental CNV. Cyclopamine as Sonic hedgehog signaling inhibitor could become a novel effective therapeutic medicine for blocking CNV formation.

**KEY WORDS** Cyclopamine; Choroidal neovascularization; Gli1; Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ; Vascular endothelial growth factor

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是年龄相关性黄斑变性等多种眼底疾病不可逆性视力丧失的主要原因<sup>[1]</sup>,其临床治疗效果欠佳,大多数患者视力预后不良且易复发,深入研究 CNV 的发病机制和提供新的药物治疗方法是目前眼科的研究热点。在脉络膜新生血管形成过程中存在脉络膜血液循环的缺血改变和低氧状态的产生<sup>[2-3]</sup>,与低氧病理反应密切相关的缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor

1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )——血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路已被证实在 CNV 的形成中起着重要的作用<sup>[4]</sup>。新的研究发现 Sonic hedgehog (Shh) 信号通路是缺血或低氧损伤组织中血管新生的重要调节环节<sup>[5-7]</sup>,且 Shh 信号通路(Shh-Ptch-Gli1 通路)调控血管新生的机制与 HIF-1 $\alpha$ -VEGF 信号通路有关<sup>[8]</sup>。那么 Shh-Ptch-Gli1 通路和 HIF-1 $\alpha$ -VEGF 信号级联反应是否共同参与了 CNV 的

形成过程? 环杷明作为 Shh 信号通路特异性的阻断剂, 是否对 CNV 的形成具有抑制作用? 目前这些方面的研究报道较少。

本研究的目的是评估 Shh 信号通路阻断剂——环杷明(cyclopamine)对激光诱导的实验性大鼠脉络膜新生血管的抑制作用, 并进一步观察环杷明对 Glil、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达的影响, 从而探讨在 CNV 形成过程中 Shh-Ptch-Glil 信号通路和 HIF-1 $\alpha$ -VEGF 信号通路两者之间的关系及作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 成年雄性 BN 大鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 体质量 200 ~ 250 g。环杷明购于美国 Sigma 公司。FITC-右旋糖酐购于美国 Sigma 公司。荧光素钠(广西梧州制药有限公司), 吲哚菁绿(辽阳第三制药厂), Trizol(美国 Invitrogen 公司), 反转录试剂盒(美国 Gibco 公司), 染料 SYBR Green PCR Master Mix(日本 TOYOBO 公司), 倍频 532 nm 激光器(法国光钛公司), 眼底血管造影仪(德国海德堡公司), 激光共聚焦扫描显微镜(日本 OLYMPUS FV500 型号), 紫外分光光度计(HITACHI 公司), 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI7500 real-time PCR system)。

## 1.2 方法

**1.2.1 CNV 动物模型的建立** 38 只 BN 大鼠中随机选取 36 只 BN 大鼠 72 眼均通过激光光凝方式建立 CNV 模型, 取未经激光光凝造模及任何药物治疗的 2 只正常 BN 大鼠作为眼底血管造影和组织病理学染色的正常对照。经 1% 戊巴比妥钠(45 mg · kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液充分散瞳后, 通过裂隙灯和眼底三面镜将倍频 532 nm 激光导入大鼠眼内。避开大血管, 每眼距视盘 2 ~ 3 PD 围绕视盘在视网膜血管之间光凝 10 个点, 激光功率 140 mw, 光凝斑直径 75  $\mu$ m, 光凝时间 0.1 s。以光凝后有气泡产生为度, 表示已击破 Bruch 膜。

**1.2.2 动物分组及给药** 激光光凝后经眼底检查无严重眼底出血和玻璃体出血的 36 只(72 眼)BN 大鼠随机分为 4 组, 分别为空白对照组、磷酸盐缓冲溶液

(PBS)液组、环杷明 2.5 mg · mL<sup>-1</sup>组和环杷明 4.0 mg · mL<sup>-1</sup>组, 每组 9 只。除空白对照组外, 各组每只眼均从光凝当天开始至光凝后 13 d, 每隔 1 d 分别行玻璃体腔内注射 PBS 液 5  $\mu$ L、2.5 mg · mL<sup>-1</sup>环杷明 5  $\mu$ L、4.0 mg · mL<sup>-1</sup>环杷明 5  $\mu$ L。玻璃体腔注射给药方法参见文献[9], 具体为: 先行前房穿刺, 放出房水少许, 再距角膜缘后 1 mm, 用严格消毒的微量进样器行玻璃体腔内缓慢注药, 注意避免急性高眼压、视网膜中央动脉栓塞和晶状体的损伤, 注射完毕后未见液体从注射口反流。

**1.2.3 荧光素眼底血管造影(FFA)和吲哚菁绿血管造影(ICGA)检查** 激光光凝后 14 d 各组大鼠均行 FFA 和 ICGA 检查。同“1.2.1”项方法麻醉、散瞳, 腹腔内同时推注 10% 荧光素钠 1 mL · kg<sup>-1</sup>和 8 mg · mL<sup>-1</sup>吲哚菁绿 2 mL · kg<sup>-1</sup>后, 立即通过德国海德堡眼底血管造影仪连续观察。观察时间为 30 min, 观察时间点分别为腹腔注药后 2, 5, 15, 30 min。每个观察时间点均在距 FFA 检查 1 min 后行 ICGA 检查。

**1.2.4 RPE-脉络膜-巩膜铺片上 CNV 面积的测定** 造模后 14 d, 经 FFA 和 ICGA 检查后, 各组随机取 4 只 BN 大鼠(8 只眼)行 CNV 面积测量, 依据文献[10]进行操作。即麻醉大鼠后快速分离暴露两侧颈总动脉, 近心端结扎, 双侧颈总动脉远心端同时注入肝素钠 0.9% 氯化钠溶液 10 mL, 再立即血管灌注 50 mg · mL<sup>-1</sup>异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(FITC-dextran, 相对分子质量 2 $\times$ 10<sup>6</sup>)2 mL, 夹闭远心端动静脉。立即摘除眼球避光保存固定于 4% 多聚甲醛溶液中 10 min, 去除眼前节, 揭除神经视网膜层, 获视网膜色素上皮层(RPE)-脉络膜-巩膜复合体标本, 做 4 条放射状切开后将 RPE 面向上放置在载玻片上。利用激光共聚焦扫描显微镜对铺片标本进行观察和测量 CNV 面积。以 480 nm 激光激发样品, 收集 505 nm 荧光信号。图像记录软件为 Laser Scanning Microscope Fluoview Version 4.3, 面积测量软件为 Image-Pro Plus 5.0。

**1.2.5 组织切片中 CNV 中央厚度的测量** 造模后 14 d, 各组随机取 2 只 BN 大鼠(4 只眼)经过量麻醉处死后立即摘除眼球, 置于 4% 多聚甲醛固定液中室温过夜, 梯度乙醇脱水、石蜡包埋、平行于角膜至视盘的矢状位连续 4  $\mu$ m 切片。选取有光凝斑者苏木精-伊红(HE)染色后光镜观察, 具体观察方法参见文献[10]。即在证实有 CNV 形成的光凝斑的连续切片中随机取 6 张切片观察并测量。以 CNV 区域内色素上皮层至视网膜内最高点的最大距离记为 CNV 的中央厚度。图像由 HMIAS-2000 全自动医学彩色图像分析系统记

[收稿日期] 2010-01-13 [修回日期] 2010-02-20

[基金项目] \* 国家自然科学基金资助项目(基金编号: 30901640), 教育部新教师基金项目(基金编号: 20090142120068), 湖北省自然科学基金项目(基金编号: 2008CDB155)

[作者简介] 何花(1975 - ), 女, 湖北嘉鱼人, 主治医师, 博士, 主要从事眼科脉络膜新生血管的基础研究和眼科临床工作。电话: 027-83663333, E-mail: helotus626@sina.com。

录保存,测量软件为 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统。

**1.2.6 Real-time PCR 分析 Glil、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的 mRNA 表达水平** 造模后 14 d,各组随机选取 3 只 BN 大鼠 6 只眼,显微镜下去除眼前节,小心去除神经视网膜层,获视网膜色素上皮层(RPE)-脉络膜-巩膜复合体标本。利用 Trizol 一步法提取各组总 RNA,用紫外分光光度计测定 RNA 浓度纯度及含量。 $A_{260}$  与  $A_{280}$  比值在 1.8~2.0 之间,基本无蛋白质污染。RNA 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳后,28 与 18s 条带清晰集中,比值>2,表明 RNA 样品未降解。取 2  $\mu$ g 总 RNA 按反转录试剂盒说明书操作,将总 RNA 反转录成相应的 cDNA。

Primer premier 5.0 软件设计各目的基因的上下游引物序列。Glil 上游引物 5'-GTGGCAACAGG-ACGGAACTT-3',下游引物序列为 5'-CGACTGTG-AGACCCTATACCC-3'; HIF-1 $\alpha$  上游引物为 5'-TCAAGT-CAGCAACGTGGAAG-3',HIF-1 $\alpha$  下游引物为 5'-TATCGAGGCTGTGTCGACTG-3'; VEGF 上游引物序列为 5'-AGAAAGCCCATGAAGTGCTGT-3',VEGF 下游引物序列为 5'-ACTCCAGGGC-TTCATCATTG-3';  $\beta$ -actin 上游引物序列为 5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3', $\beta$ -actin 下游引物序列为 5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'。

Real-time PCR 反应混合液 20  $\mu$ L 体系包括:第一链 cDNA. 1  $\mu$ L, SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ L,引物 1  $\mu$ L,灭菌双蒸水 8  $\mu$ L。基因扩增条件:95  $^{\circ}$ C 变性 60 s,60  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 40 个循环。每次 PCR 扩增都要采用没有模板的阴性对照。采用 ABI7500 实时荧光 PCR 仪配套软件 RQ study 模块分析荧光数据。以  $\beta$ -actin 为内参照标准,计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值,作为目的基因与内参基因的相对 mRNA 表达量。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析。实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。CNV 面积与 CNV 中央厚度的数据统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。两组间目的基因 mRNA 表达水平的比较统计分析采用 Mann-whitney *U* test (nonparametric)。 $P<0.05$  表示差异有显著性。

**2 结果**

**2.1 FFA 和 ICGA 观察** 腹腔注入荧光素和吲哚菁绿后约 2 min 眼底血管开始显影。正常 BN 大鼠视网膜血管充盈呈放射状,脉络膜血管网状充盈并融合成弥漫的背景荧光,无荧光素渗漏。光凝后 14 d,FFA 和

ICGA 显示光凝斑中 CNV 阳性部位为动脉早期呈现血管性强荧光,且造影后期荧光素持续增强扩散的高荧光区。ICGA 和 FFA 显示的 CNV 阳性部位基本一致,但 ICGA 出现的 CNV 轮廓较 FFA 清晰(见图 1)。光凝后 14 d,空白对照组、PBS 液组、环杷明 2.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  组和环杷明 4.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  组中 CNV 呈阳性的光凝斑分别占 72.8%,76.1%,66.1% 和 58.3%。

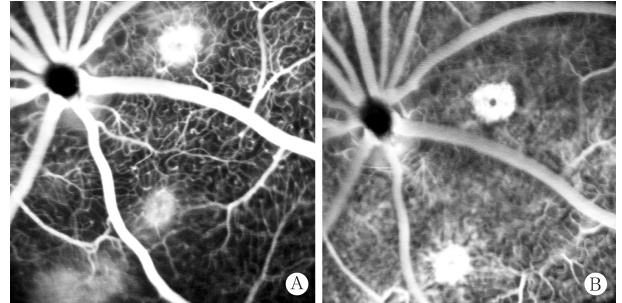


图 1 光凝后 14 d FFA 检查和 ICGA 检查光凝斑处 CNV 情况 A. FFA 检查示光凝斑处 CNV 的荧光素渗漏;B. ICGA 检查示 CNV 充盈成高荧光

**Fig.1 The condition of CNV was shown in FFA and ICGA on day 14 after laser photocoagulation**

A. Fluorescein leakage surround the laser spot was shown in FFA ;B. Hyperfluorescence at the same CNV lesion was observed in ICGA

**2.2 RPE-脉络膜-巩膜铺片上各组 CNV 面积的比较**

激光共聚焦扫描显微镜下见脉络膜新生血管来源于光凝斑中心深部的脉络膜血管,相对于周围的脉络膜血管呈现出高荧光网。实验结果显示,光凝后 14 d,环杷明 2.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  组和环杷明 4.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  组 RPE-脉络膜-巩膜铺片中 CNV 平均面积较空白对照组明显减少(见图 2),同时较 PBS 液处理组的 CNV 平均面积亦有明显减少,差异均具有显著性。且环杷明两种浓度组组间的 CNV 平均面积比较,其差异亦有显著性( $P<0.05$ )。PBS 液组的 CNV 平均面积与空白对照组比较无显著性差异。各组 CNV 面积的具体测量值见表 1。

**2.3 各组 CNV 中央厚度的比较**

光镜下正常 BN 大鼠视网膜机脉络膜各层组织结构清晰,Bruch 膜完整。光凝后 14 d,PBS 液组光斑区光镜下可见视网膜结构破坏,CNV 突破 Bruch 膜伸向视网膜下,伴有大量成纤维细胞增生,色素上皮样细胞迁移增殖。环杷明 2.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  组和环杷明 4.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  组分别与空白对照组和 PBS 液处理组比较,其脉络膜新生血管膜均明显变薄,新生血管减少,差异均具有显著性,且环杷明两种浓度组 CNV 中央厚度的组间差异有显著性意



义。PBS 液组的 CNV 中央厚度与空白对照组比较, 差异无显著性。见表 1, 见图 3。

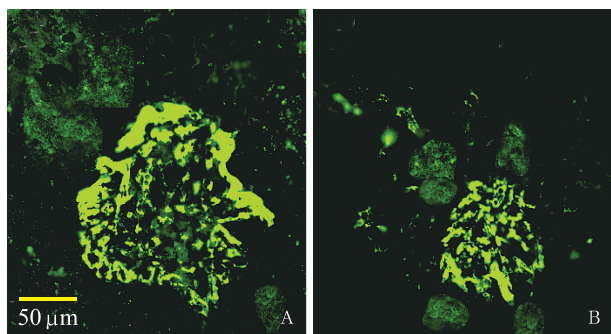


图 2 光凝后 14 d, RPE-脉络膜-巩膜铺片光凝斑处的 CNV 在 FITC-右旋糖酐标记荧光显像中呈网状高荧光  
A. 空白对照组; B. 环杷明 2.5 mg · mL<sup>-1</sup> 浓度组

Fig. 2 Representative image of CNV in flat mounts 14 days after laser injury. Neovascular plexus labeled by FITC-dextran showed hyperfluorescence network

A. Blank control group; B. 2.5 mg · mL<sup>-1</sup> Cyclopamine - treated group. The bar in (A) is 50 μm

2.4 各组 Gli1、HIF-1α、VEGF 的 mRNA 表达水平用空白对照组样本内的各目的基因与内参 β-actin 的相对表达量标准化, 得出空白对照组样本内各目的基因的相对 mRNA 表达量为 1 时, PBS 液处理组、环杷明 2.5 mg · mL<sup>-1</sup> 浓度组与环杷明 4.0 mg · mL<sup>-1</sup> 浓度组样本中各目的基因的 mRNA 相对表达量, 见图 4。

### 3 讨论

Shh 信号通路调控血管新生主要通过 Shh-Ptch-Smo-Gli1 级联反应实现的。Sonic hedgehog 效应细胞膜上有两种受体, 即 Ptch 和 Smo。在缺少 Shh 时, Ptch 和 Smo 相互作用来抑制下游信号传导; 当 Shh 存在时, Shh 连接到 Ptch 和 Smo 的复合物受体上, Ptch 和 Smo 解离,

活化的 Smo 将信号传到细胞内, 激活细胞内的转录因子, 即 Gli 基因家族, 激活的 Gli 进而转录激活下游靶基因。Gli1 被认为是 Shh 信号通路中目的基因激活的标记物<sup>[11-13]</sup>。研究已证实, Shh 信号通路在血管新生特别在缺血或低氧损伤组织的血管新生中发挥着重要作用, 缺血后肢新生血管模型、小鼠伤口愈合模型和角膜新生血管模型中均可检测到 Shh 信号通路的表达<sup>[5,6,14]</sup>。

表 1 光凝后 14 d 各组 RPE-脉络膜-巩膜铺片中 CNV 面积和病理组织切片中 CNV 中央厚度

Tab. 1 Areas of CNV and thickness of CNV 14 days after laser photocoagulation

组别	CNV 面积/ 10 <sup>3</sup> · (μm <sup>2</sup> )	CNV 厚度/ μm
环杷明		
2.5 mg · mL <sup>-1</sup> 组	11.65 ± 2.98 <sup>*1*2</sup>	26.51 ± 3.07 <sup>*1*2</sup>
4.0 mg · mL <sup>-1</sup> 组	5.04 ± 1.42 <sup>*1*2*3</sup>	14.73 ± 2.68 <sup>*1*2*3</sup>
PBS 组	20.23 ± 3.57	39.82 ± 3.77
空白对照组	21.34 ± 4.21	42.94 ± 2.26

与空白对照组比较, <sup>\*1</sup>P < 0.05; 与 PBS 组比较, <sup>\*2</sup>P < 0.05; 与环杷明 2.5 mg · mL<sup>-1</sup> 组比较, <sup>\*3</sup>P < 0.05

Compared with the blank control group, <sup>\*1</sup>P < 0.05; compared with PBS-treated group, <sup>\*2</sup>P < 0.05; compared with 2.5 mg · mL<sup>-1</sup> cyclopamine-treated group, <sup>\*3</sup>P < 0.05

环杷明是一种来源于藜芦属植物的甾体生物碱。它能与 Shh 信号通路中的 Smo 结合, 改变 Smo 的空间构象, 失去活性的 Smo 进而抑制 Shh 信号通路下游的信号传导<sup>[15]</sup>。在大鼠碱烧伤所致的角膜新生血管模型和小鼠病理性视网膜血管新生模型的研究中<sup>[14,16]</sup>, 环杷明作为 Shh 信号通路特异性的阻断剂, 均证实有明显抑制新生血管形成的作用, 且 Shh 信号通路在正常成体处于失活状态, 故环杷明对机体其他部位不会

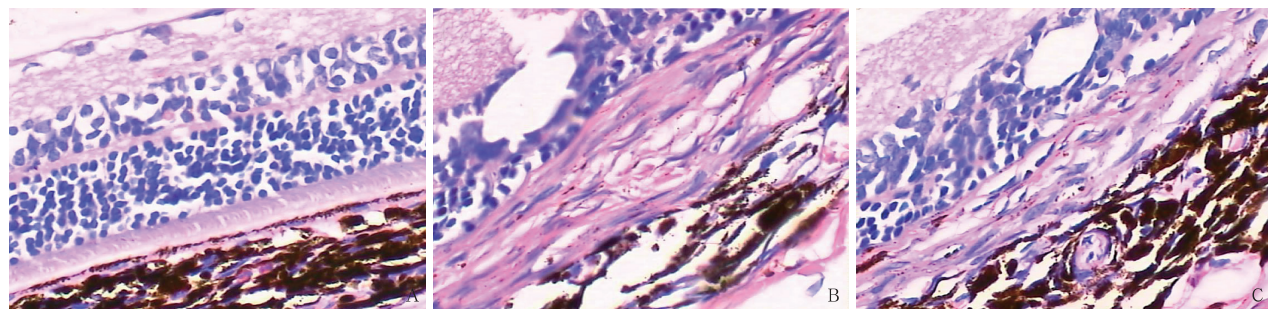


图 3 各组 CNV 中央厚度的光镜图 (HE×400)

A. 正常 BN 大鼠视网膜、脉络膜组织结构清晰完整; B. 光凝后 14 d, 空白对照组光凝斑处视网膜 RPE 层及 Bruch 膜破裂, CNV 形成, 并可见成纤维细胞和色素上皮样细胞; C. 光凝后 14 d, 2.5 mg · mL<sup>-1</sup> 环杷明浓度组 CNV 膜厚度明显变薄

Fig. 3 Morphology Changes of thickness of CNV (H&E stain, ×400)

A. Representative images of normal retina-RPE-choroid; B. RPE and Bruch's membrane were disrupted in subretinal space in blank control group 14 days after laser photocoagulation, while CNV, RPE-like cells and fibroblasts were seen concomitantly; C. Compared with blank control rats, the thickness of CNV was reduced significantly in 2.5 mg · mL<sup>-1</sup> cyclopamine-treated rats

产生不良反应。

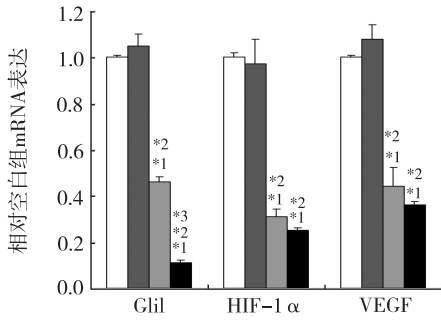


图4 各组给药处理对实验性大鼠 CNV 组织中 Gli1、HIF-1α、VEGF mRNA 表达的影响

□ 空白对照组                      ■ PBS组  
 ■ 环杷明2.5 mg · mL<sup>-1</sup>组        ■ 环杷明4.0 mg · mL<sup>-1</sup>组

与空白对照组比较, \*<sup>1</sup>P<0.05; 与 PBS 组比较, \*<sup>2</sup>P<0.05; 与环杷明 2.5 mg · mL<sup>-1</sup>组比较, \*<sup>3</sup>P<0.05

Fig. 4 Effects of cyclopamine on the mRNA expression of Gli1, HIF-1α, and VEGF in CNV on day 14 after laser injury

□ Blank control group;                      ■ PBS-treated group  
 ■ 2.5 mg · mL<sup>-1</sup>Cyclopamine-treated group;  
 ■ 4.0 mg · mL<sup>-1</sup>Cyclopamine-treated group

Compared with blank control group, \*<sup>1</sup>P<0.05; compared with PBS-treated group, \*<sup>2</sup>P<0.05; compared with 2.5 mg · mL<sup>-1</sup> cyclopamine-treated group, \*<sup>3</sup>P<0.05

本实验结果显示,环杷明可抑制激光诱导的实验性脉络膜新生血管的形成,但具体调控机制尚待阐明。激光诱导产生的大鼠 CNV 模型,与人类年龄相关性黄斑变性等 CNV 病变具有相似的细胞成分和病理过程,从而可模拟人类年龄相关性黄斑变性的 CNV 进行实验研究。现已被广泛用于评估抗新生血管治疗方法的有效性,及探明血管新生相关基因、蛋白的作用机制<sup>[10,17]</sup>。近年来已有研究显示,与低氧反应有关的 HIF-1α-VEGF 信号通路的激活参与了实验性脉络膜新生血管的形成<sup>[4,18]</sup>,这也进一步佐证脉络膜血液循环的缺血改变和低氧状态是诱发 CNV 的重要因素之一。本实验的结果还表明在缺氧损伤组织的血管新生中起关键作用的 Shh 信号通路同样参与了实验性脉络膜新生血管的形成,且调控机制与起核心作用的 HIF-1α-VEGF 信号通路有关。可拮抗内源性 Shh 从而抑制血管新生的环杷明在下调实验性脉络膜新生血管组织中 Gli1 表达的同时,也下调了 HIF-1α 和 VEGF 的表达水平,这提示 Shh-Gli1 可能作为 HIF-1α-VEGF 级联反应的上游信号,与 HIF-1α-VEGF 通路共同参与了实验性 CNV 的形成。国外的相关研究<sup>[8]</sup>也证实 Shh 信号通路的阻断药环杷明能明显减少低氧状态下大鼠心肌细胞 (H9C2) 的 Ptch1、IGF-2、HIF-1α 和 VEGF mRNA 表达

水平,本实验的观察结果与国外研究结果相符。

综上所述,环杷明作为 Shh 信号通路的阻断剂能明显抑制激光诱导的实验性脉络膜新生血管的形成,下调 Gli1、HIF-1α 和 VEGF 的表达可能是其重要的作用机制之一。环杷明有望作为新的新生血管抑制剂在治疗 CNV 中发挥作用。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.08.002

[参考文献]

[1] FRIEDMAN D S, O'COLMAIN B J, MUNOZ B, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States [J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122 (4) :564-572.

[2] STARITA C, HUSSAIN A A, PAGLIARINI S, et al. Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease [J]. *Exp Eye Res*, 1996, 62 (5) :565-572.

[3] FEIGL B. Age-related maculopathy in the light of ischaemia [J]. *Clin Exp Optom*, 2007, 90 (4) :263-271.

[4] YANG X M, WANG Y S, ZHANG J, et al. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1alpha and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (4) :1873-1879.

[5] POLA R, LING L E, SILVER M. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors [J]. *Nat Med*, 2001, 7 (6) :706-711.

[6] ASAI J, TAKENAKA H, KUSANO K F, et al. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling [J]. *Circulation*, 2006, 113 (20) :2413-2424.

[7] POLA R, LING L E, APRAHAMIAN TR, et al. Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia [J]. *Circulation*, 2003, 108 (4) :479-485.

[8] HWANG J M, WENG Y J, LIN J A, et al. Hypoxia-induced compensatory effect as related to Shh and HIF-1alpha in ischemia embryo rat heart [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 311 (1-2) :179-187.

[9] GAO H, QIAO X, GAO R, et al. Intravitreal triamcinolone does not alter basal vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat retina [J]. *Vision Res*, 2004, 44 (4) :349-356.

[10] 何花, 张虹, 王志涛, 等. RGDS 肽对实验性脉络膜新生血管的抑制作用 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42 (9) :825-831.

[11] KALDRON D. Transducing the hedgehog signal [J]. *Cell*, 2000, 103 (3) :371.

- [12] KARLSTROM R O, TYURINA O V, KAWAKAMI A, *et al.* Genetic analysis of zebrafish *Glil* and *gli2* reveals divergent requirements for *gli* genes in vertebrate development [J]. *Development*, 2003, 130(8): 1549–1564.
- [13] KUBO M, NAKAMURA M, TASAKI A, *et al.* Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(17): 6071–6074.
- [14] KYOKO F, TAKESHI M, SHIZUYA S. Sonic hedgehog: its expression in a healing cornea and its role in neovascularization [J]. *Molecular Vision*, 2009, 15: 1036–1044.
- [15] CHEN J K, TAIPALE J, COOPER M K, *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(21): 2743–2748.
- [16] SURACE E M, BALAGGAN K S, TESSITORE A, *et al.* Inhibition of ocular neovascularization by hedgehog blockade [J]. *Mol Ther*, 2006, 13(3): 573–579.
- [17] EDELMAN J L, CASTRO M R. Quantitative image analysis of laser-induced choroidal neovascularization in rat [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 71(5): 523–533.
- [18] ISHIBASHI T, HATA Y, YOSHIKAWA H. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1997, 235(3): 159–167.

## 大黄多糖对 $\alpha$ -糖苷酶活性的抑制作用\*

张海凤<sup>1</sup>, 董亚琳<sup>2</sup>, 刘琳娜<sup>1</sup>, 张 琰<sup>1</sup>

(1. 第四军医大学唐都医院药剂科, 西安 710038; 2. 西安交通大学第一附属医院药剂科, 710061)

**[摘要]** 目的 从大黄中提取多糖, 并测定提取物粗粉中大黄多糖的含量, 研究大黄多糖对酶-抑制剂模型和 Caco-2 细胞模型上  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用, 初步探索大黄多糖在治疗糖尿病方面的潜在价值。方法 用水提醇沉法提取大黄多糖, 用苯酚-硫酸比色法测定多糖含量。采用氧化酶比色法测定大黄多糖对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 20) 以及 Caco-2 细胞模型表达  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性。结果 大黄多糖粗粉中大黄多糖平均含量为 (23. 08  $\pm$  0. 89)%,  $RSD=3. 87\%$  ( $n=3$ ), 方法平均回收率为 97. 59%,  $RSD=3. 15\%$  ( $n=6$ )。以麦芽糖为底物时, 在酶-抑制剂模型上, 浓度为 125, 250, 500, 1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的大黄多糖的抑制率分别为 33. 09%, 24. 43%, 33. 14%, 31. 73%, 250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的阳性药阿卡波糖的抑制率为 80. 45%。在 Caco-2 细胞模型上, 浓度为 125, 250, 500, 1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的大黄多糖抑制率分别为 23. 43%, 26. 23%, 28. 24%, 29. 17%, 250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的阿卡波糖对 Caco-2 细胞的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率达到 84. 08%。结论 运用水提醇沉法提取大黄多糖, 用酚-硫酸比色法测定多糖含量方法简便可行, 大黄多糖具有一定的抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的作用, 但作用不显著。

**[关键词]** 大黄多糖; 含量测定;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用

**[中图分类号]** R285. 5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2010)08-0985-05

### Inhibition on $\alpha$ -Glucosidase by Rhubarb Polysaccharides

ZHANG Hai-feng<sup>1</sup>, DONG Ya-lin<sup>2</sup>, LIU Lin-na<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, Tangdu Hospital, the fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, 710061, China)

**ABSTRACT Objective** To extract polysaccharide from rhubarb, determine the content and study the  $\alpha$ -glucosidase inhibition effect on the enzyme-inhibitor model and Caco-2 cells model for preliminary exploring the potential value of rhubarb polysaccharides on treating diabetes. **Methods** Rhubarb polysaccharides were extracted by water isolation and alcohol precipitation, and the content was determined with phenol-sulfuric acid colorimetry. The inhibitory activity of rhubarb polysaccharides on  $\alpha$ -glucosidase (EC 3. 2. 1. 20) was measured, as well as  $\alpha$ -glucosidase expressed on Caco-2 cell model by using oxidase colorimetric method. **Results** The average concentration of rhubarb polysaccharides in rhubarb extracts was (23. 08  $\pm$  0. 89)%,  $RSD=3. 87\%$  ( $n=3$ ), and average recovery was 97. 59%,  $RSD=3. 15\%$  ( $n=6$ ). With maltose as the substrate in the enzyme-inhibitor model, the inhibition rates of 125, 250, 500, 1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  rhubarb polysaccharides were 33. 09%, 24. 43%, 33. 14%, 31. 73%, respectively. The inhibition rate of 250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  positive drug (acarbose) was 80. 45%. On the Caco-2 cell model, the inhibition rates of 125, 250, 500, 1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  rhubarb polysaccharides were 23. 43%, 26. 23%, 28. 24%, 29. 17%, and 250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  positive drug (acarbose) reached 84. 08%. **Conclusion** Water extraction and alcohol precipitation for Rhubarb polysaccharides isolating and phenol-sulfuric acid colorimetric assay for determining content of polysaccharide are simple and feasible. Rhubarb polysaccharides has a certain degree of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity.

**KEY WORDS** Rhubarb Polysaccharide; Content determination;  $\alpha$ -Glucosidase inhibition