# 虫草素对碱烧伤诱导大鼠角膜新生血管的抑制作用*

程文武[1],柳 蔚[2],江 萍[3],张汉武[1],席祖莲[1],訾世莉[1]
(1. 宜昌市夷陵医院,湖北 宜昌 443100; 2. 三峡大学 生物与制药学院,湖北 宜昌 443000; 3. 宜昌市中心医院,湖北 宜昌 443000)

[摘 要] **目的**:研究虫草素对大鼠角膜新生血管的作用及其对角膜组织血管内皮生长因子(VEGF)和其受体 VEGFR2 表达的影响。**方法**:48 只 SD 大鼠右眼采用 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)角膜贴纸方法灼伤角膜制备角膜新生血管模型,造模后隔日随机给予生理盐水 0.1 mL(模型对照组)、地塞米松 0.6 mg/kg(阳性对照组)、虫草素 4 mg/kg(高剂量组)、虫草素 2 mg/k(低剂量组)球结膜下注射,每组 12 只,另取 4 只未造模大鼠对侧健康眼球为正常对照组;于造模成功后第 4、8 及 14 天时分次处死大鼠取角膜组织,HE 染色观察各组大鼠角膜组织学改变,测量各组角膜新生血管面积,夹心法 ELISA 检测角膜 VEGF 的表达,SP 法检测 VEGFR2 的表达。**结果**:48 只模型大鼠右眼角膜烧灼区域呈灰白色混浊,与正常对照组比较,造模后各组角膜均有新生血管生成,提示造模成功;与正常对照组比较,高剂量组和造模第 8 天后的低剂量组角膜新生血管生长面积较小,高剂量组角膜组织中 VEGF、VEGFR2 表达减少,差异具有统计学意义($P<0.05$);与高剂量组比较,低剂量组角膜新生血管生长面积更大,且 VEGF、VEGFR2 表达较多,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论**:较大剂量虫草素能有效抑制 NaOH 所致大鼠角膜新生血管的形成,其机制可能与虫草素抑制灼伤角膜组织中 VEGF 表达有关。

[关键词] 虫草素; 碱烧伤; 角膜新生血管; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体 2
[中图分类号] R772.21 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)03-0308-05
**DOI**:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.014

# Inhibit Effect of Cordycepin on Rat Corneal Neovascularization Induced by Alkali Burn

CHENG Wenwu[1], LIU Wei[2], JIANG Ping[3], ZHANG Hanwu[1], XI Zulian[1], ZI Shili[1]
(*1. Yiling Hospital of Yichang City, Yichang 443100, Hubei, China; 2. College of Biology and Pharmacy, Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei, China; 3. Central Hospital of Yichang City, Yichang 443000, Hubei, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the inhibit effect of cordycepin on rat corneal neovascularization (CNV) after alkali burn and its influence over expression of VEGF and VEGFR 2. **Methods**: CNV model was induced by alkali burn of the cornea with 1 mol · $L^{-1}$ NaOH on 48 SD rats. The next day rats were divided with equal number into four groups randomly after modeling: model group accepted 0.1 mL saline, positive control group accepted 0.6mg/kg dexamethasone, high and low dose treatment group accepted 4mg/kg and 2mg/kg cordycepin respectively. 4 healthy rats' contralateral eyes were selected as normal control group. On the $4^{th}$, $8^{th}$ and $14^{th}$ day executed the rats to extract cornea. Histological changes were observed after HE staining, mearsuring CNV area, ELISA was adopted to test expression of cornea VEGF, SP was adopted to test expression of VEGFR 2. **Results**: Compared with the model group, right eye cornea burned area showed grey and white nubecula; comparing with normal control group, CNV was observed in cornea of all groups, indicating successful modeling; comparing with normal control group, CNV area was relatively small in high dose group and $8^{th}$ day after mod-

*[基金项目]2014 年宜昌市科技局科技计划项目(A13301-61)
网络出版时间:2017-3-18 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2320.023.html

eling in low dose group, expression of VEGF and VEGFR 2 in high dose corneal tissue, differences were statistical significant ($P<0.05$); comparing with high dose group, low dose group showed bigger CNV are, VEGF and VEGFR 2 showed more expression, differences were statistical significant ($P<0.05$). **Conclusion**: Large dose of cordycepin can inhibit the growth of CNV induced by alkali burn in rat cornea, the mechanism might be relevant with cordycepin inhibited VEGF expression in burned corneal tissue.

[**Key words**] cordycepin; alkali burn; corneal neovascularization; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor 2

角膜新生血管性疾病是眼科的常见疾病,各种角膜炎症、化学性烧伤、异物存留等均可致角膜新生血管形成。新生血管是病理性血管组织,易导致炎症、出血而致角膜混浊,最终导致视力下降,严重者可致盲。角膜新生血管性疾病目前尚缺乏有效的治疗手段,主要治疗措施为使用糖皮质激素及免疫抑制剂。本实验以碱烧伤法制作角膜新生血管模型,以虫草素作为干预药物,研究其对角膜新生血管的抑制作用。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料和实验动物

虫草素对照品,含量≥98%,购自中科院成都生物研究所。SPF 级健康 SD 大鼠 52 只,三峡大学动物实验中心提供,体重 260 ~ 320 g,雌雄各半。经裂隙灯检查无眼前节病变。

### 1.2　方法

**1.2.1**　虫草素的配制　分别称取虫草素对照品 60 mg、30 mg,各用 5 mL 注射用水稀释,加热至50 ~ 60 ℃溶解,配制后用1 mL无菌 EP 管分装备用。

**1.2.2**　大鼠角膜新生血管模型制备　48 只 SD 大鼠,采用 20% 乌拉坦 5 ~ 10 mL/kg 腹腔注射麻醉,并用 0.4% 奥布卡因滴眼液对大鼠右侧眼球表面进行麻醉,开睑后用蘸有 1 mol/L 氢氧化钠溶液的直径 3 mm 的圆形滤纸贴附于右眼角膜中央,烧灼 40 s 后用生理盐水连续冲洗 1 min,对发生严重前房积血、角膜感染、角膜穿孔及烧伤区偏位等情况的大鼠予以剔除,术毕以抗生素眼膏涂眼[1-2]。观察大鼠右眼角膜,烧灼区域呈灰白色混浊,可确认模型复制成功。

**1.2.3**　分组　48 只模型大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组、高剂量组及低剂量组,每组 12 只,分别于造模后隔日给予生理盐水 0.1 mL、地塞米松 0.6 mg/kg、虫草素 4 mg/kg 及虫草素 2 mg/kg 球结膜下注射。4 只未造模大鼠左侧健康眼球为正常对照组。

**1.2.4**　标本采集与处理　分别于造模后第 4、8 及 14 天,各组随机取 4 只大鼠采用断头法处死,摘除眼球,尽量于无菌条件下剪取角膜组织以及约 1 mm宽角膜缘组织。造模后各组角膜组织分为 3 等分,其一用多聚甲醛固定,用于 HE 染色;其二于 -70 ℃低温保存,用于 ELISA 检测;其三用 10% 甲醛固定,用于免疫组化检测。

**1.2.5**　角膜组织病理学检查　角膜组织自固定液取出后,经脱蜡、染色、脱水、透明和封固等步骤,行 HE 染色,400 × 显微镜下观察,分析角膜组织的病理形态。

**1.2.6**　角膜新生血管面积　造模后在各个取材时,于麻醉后在手术显微镜下用游标卡尺测量大鼠角膜新生血管的长度,并计算新生血管的面积。角膜新生血管面积(S) = C/12 × 3.1416[$r^2$ - (r - l)$^2$],C 代表新生血管累及角膜圆周的钟点数,l 代表新生血管的长度,r 代表角膜半径[3]。

**1.2.7**　角膜组织中 VEGF 和 VEGF2 的表达　称量 0.003 g 角膜组织,经研钵研磨匀浆后装入 EP 管,4 ℃,5 000 r/min 离心10 min,收集上清液。夹心法 ELISA 检测 VEGF 的表达。免疫组化 SP 法检测角膜组织中 VEGFR2 的表达,角膜标本经 10% 甲醛固定,酒精梯度脱水,石蜡包埋切片、脱蜡至水,再经孵育、滴加一抗、二抗、三抗、显色、复染、封片等步骤,于高倍显微镜下观察 VEGFR2 的表达。

### 1.3　统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件包进行数据统计,总体均数间比较采用单因素方差分析,各组均数间两两比较采用 $q$ 检验。

## 2　结果

**2.1**　角膜组织病理学改变

与正常对照组相比，各造模组大鼠初期均出现角膜上皮糜烂剥脱，浅实质层溃疡水肿，透明度下降，溃疡愈合过程中新生血管自角膜缘逐步长入实质层，并随时间推移新生血管长度逐步增加，透明度部分恢复。造模后各组均见角膜实质层细胞水肿，层间疏松，层间空泡形成，大量淋巴细胞浸润；初发新生血管由单层内皮细胞构成，内皮细胞间隙较宽，后期新生血管逐渐形成管腔结构，内皮细胞外由平滑肌细胞构成管壁，随时间延长新生血管呈进行性生长。见图 1。

**2.2**　角膜新生血管面积

各模型组大鼠角膜新生血管均于造模后第 3 ~4 天开始生长，随时间延长呈进行性生长。与模型对照组相比，高剂量组和造模 8 d 后的低剂量组大鼠角膜新生血管生长面积较小，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；与高剂量组比较，低剂量组大鼠新生血管生长面积更大，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1、图 2。

表 1　各模型组大鼠造模后角膜新生血管面积（$\bar{x}\pm s$）

Tab. 1　CNV areas on different days after alkali burn

| 组别 | 造模后角膜新生血管面积（$mm^2$） | | |
|---|---|---|---|
| | 第 4 天 | 第 8 天 | 第 14 天 |
| 模型对照组 | 12.05 ± 0.71 | 16.37 ± 1.65 | 20.77 ± 1.67 |
| 阳性对照组 | 7.92 ± 1.06(1) | 12.32 ± 0.91(1) | 13.83 ± 1.38(1) |
| 高剂量组 | 8.07 ± 0.90(1) | 12.56 ± 0.78(1) | 15.14 ± 0.88(1) |
| 低剂量组 | 9.74 ± 2.03(2) | 14.55 ± 1.11(1)(2) | 17.93 ± 1.36(1)(2) |

(1) 与模型对照组比较，$P<0.05$；(2) 与高剂量组比较，$P<0.05$

**2.3**　角膜组织中 VEGF 和 VEGFR2 表达

造模后第 4、8 和 14 天，模型对照组比较，高剂量组 VEGF、VEGFR2 的表达减少，差异具有统计学意义（$P<0.05$），低剂量组 VEGF 有减少趋势。与高剂量组比较，低剂量组 VEGF、VEGFR2 表达水平升高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见表 2、表 3。图 3 可见 VEGFR2 主要表达于血管内皮细胞。

表 2　各模型组大鼠角膜 VEGF 的表达（$\bar{x}\pm s$）

Tab. 2　Expression levels of VEGF in corneal of all groups

| 组别 | 造模后角膜 VEGF 表达（ng/L） | | |
|---|---|---|---|
| | 第 4 天 | 第 8 天 | 第 14 天 |
| 模型对照组 | 154.19 ± 8.32 | 187.79 ± 9.76 | 210.28 ± 9.83 |
| 阳性对照组 | 87.71 ± 6.65(1) | 102.44 ± 6.21(1) | 129.50 ± 9.15(1) |
| 高剂量组 | 79.28 ± 6.36(1) | 112.83 ± 5.34(1) | 122.51 ± 5.86(1) |
| 低剂量组 | 163.33 ± 5.91(2) | 135.69 ± 9.24(1)(2) | 198.16 ± 9.63(2) |

(1) 与模型对照组比较，$P<0.05$；(2) 与高剂量组比较，$P<0.05$

表 3　各模型组大鼠造模后角膜 VEGFR2 的表达（$\bar{x}\pm s$）

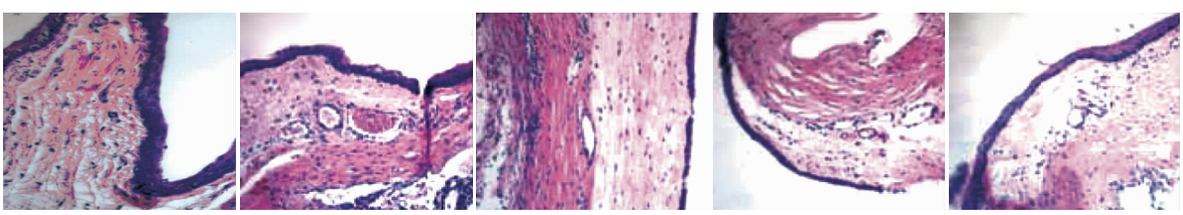
Tab. 3　Expression levels of VEGFR2 in cornea of all groups

| 组别 | 造模后角膜 VEGF 表达（ng/L） | | |
|---|---|---|---|
| | 第 4 天 | 第 8 天 | 第 14 天 |
| 模型对照组 | 21.54 ± 3.04 | 36.27 ± 3.70 | 49.29 ± 4.57 |
| 阳性对照组 | 13.55 ± 2.18(1) | 22.66 ± 3.25(1) | 32.24 ± 3.33(1) |
| 高剂量组 | 14.54 ± 1.62(1) | 26.82 ± 3.39(1) | 39.15 ± 1.27(1) |
| 低剂量组 | 20.59 ± 2.26(2) | 32.57 ± 2.46(2) | 49.77 ± 2.62(2) |

(1) 与模型对照组比较，$P<0.05$；(2) 与高剂量组比较，$P<0.05$

## 3　讨论

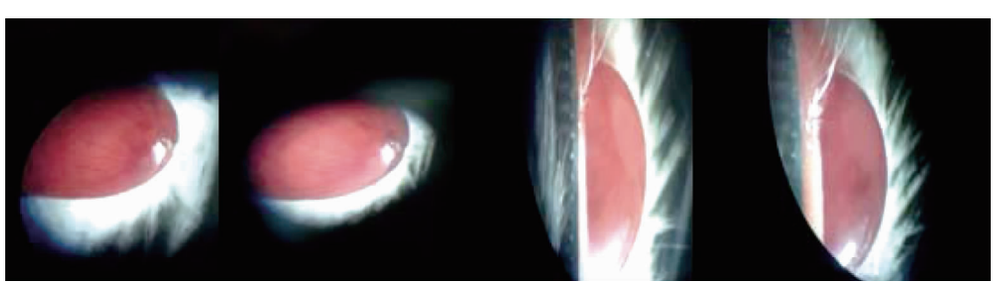
正常角膜无血管，这为眼球屈光系统的透明性提供了基础。角膜新生血管的发生，改变了角膜的透明性，长期的新生血管性疾病最终导致角膜透明性下降，进而视力下降，甚至失明。眼球是新生血管性疾病高发器官。新生血管的诱导因子有VRGF、成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子(TGF)、白细胞介素(IL)等，在众多血管生成因子当中，VEGF 是公认主要的诱导血管生成的物质，它能强烈地促使血管内皮有丝分裂和新生血管形成[4]。VEGF 通过与下游的 VEGFR 受体结合而发生作用，目前已经发现并克隆出来的 VEGF 受体主要有 VEGFR-1(Flt－1)，VEGFR-2(Flk/KDR)和 VEGFR-3(Flt－3)3 种，VEGFR2 是 VEGF 通路中的的主要功能受体[5-6]。朱小丽等[7]研究表明，虫草素能够抑制高糖培养的恒河猴脉络膜－视网膜血管内皮细胞新生血管的发生。另有研究表明，虫草素能够抑制人脐静脉内皮细胞的增值和鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成[7-8]。以往研究曾使用过蛹虫草提取物为干预药物，观察其对化学烧伤引起的角膜新生血管的抑制作用，实验结果显示，蛹虫草提取物能够在一定程度上抑制新生血管的生长[9]。本实验采用蛹虫草提取物成分之一虫草素单体作为干预药物，观察其对角膜新生血管的抑制效应，检测 VEGF 通路中 VEGF 及 VEGFR2 的表达，结果显示，虫草素对角膜新生血管具有一定的抑制效应，能够延缓角膜新生血管的生长，虫草素是蛹虫草提取物的有效成分之一，其抑制效应与剂量相关，是蛹虫草提取物的有效成分之一[10-11]。本研究免疫组化染色结果显示，VEGFR2 主要位于



正常对照组　模型对照组　阳性对照组　高剂量组　低剂量组

图 1　正常对照组和各模型组大鼠角膜组织病理学检查(造模后第 14 天，HE，×400)

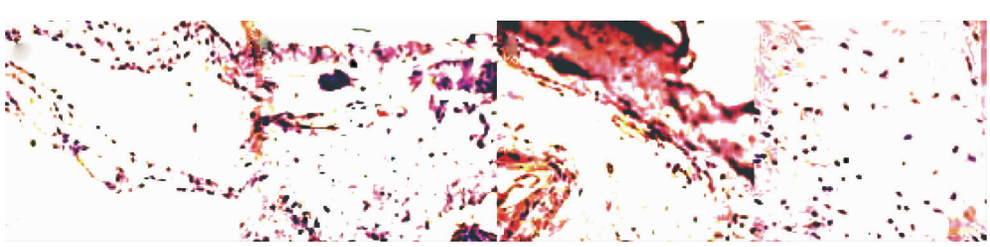
Fig. 1　Histopathological examination of each group at the 14th day after alkali burn



模型对照组　阳性对照组　高剂量组　低剂量组

图 2　各模型组大鼠造模后第 14 天时新生血管生长情况

Fig. 2　Growth condition of new vessels of model rats in each group



模型对照组　阳性对照组　高剂量组　低剂量组

图 3　各模型组大鼠角膜组织 VEGFR2 的表达（造模后第 14 天，SP，×400）

Fig. 3　VEGFR 2 expression of cornea in all groups

血管内皮,与文献报道一致[12-13]。综上所述,虫草素能抑制碱烧伤所致大鼠角膜新生血管的形成,抑制角膜组织中 VEGF 的传导通路可能是其抑制新生血管生长的主要机制之一,其抑制作用与剂量有关。

## 4 参考文献


[1] 颜世龙,梁丹,林妙丽,等. 碱烧伤大鼠角膜新生血管模型的初步探索[J]. 眼科学报,2005(4):165-172.

[2] 李鹏程,王国军,胡燕华. SDF-1 和 CXCR4 在鼠角膜碱烧伤新生血管中的表达[J]. 眼科新进展,2010(9),832-836.

[3] 张玉光,韩旭光,王巧玲. Avastin 抑制兔角膜移植术后角膜新生血管的实验研究[J]. 山东大学学报(医学版),2014(1):47-52.

[4] Ahluwalia A, Tarnawski AS. Critical role of hypoxia sensor - HIF-1α in VEGF gene activation. implications for angiogenesis and tissue injury healing[J]. Current Medicinal Chemistry, 2012(1):90-97.

[5] Deng Q, Bai S, Gao W, et al. Pristimerin inhibits angiogenesis in adjuvant-induced arthritic rats by suppressing VEGFR2signaling pathways[J]. International immunopharmacology, 2015(2):302-313.

[6] Meguenani M, Miljkovic-Licina M, Fagiani E, et al. FASEB journal:official publication of the federation of American societies for experimental biology[J]. International immunopharmacology, 2015(8):3411-3425.

[7] 朱小丽,孙小凤,赖铭莹. 虫草素对高糖培养的恒河猴脉络膜-视网膜血管内皮细胞血管新生的影响[J]. 国际眼科杂志, 2016(7):1237-1241.

[8] Yoo HS, Shin JW, Cho JH, et al. Effects of cordyceps militaris extract on angiogenesis and tumor growth[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004(5):657-665.

[9] Won SY, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of Cordyceps militaris[J]. J Ethnopharmacol, 2005(3):555-561.

[10] 程文武,江萍. 蛹虫草提取物抑制大鼠角膜新生血管的实验研究[J]. 眼科新进展, 2012(5):432-435.

[11] 李祥玲, 胡劲松, 陈作红. HPLC 测定人工蛹虫草及其培养基中虫草素和腺苷含量[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2010(2):107-111.

[12] Greene JM, Dunaway CW, Bowers SD, et al. In *vivo* monitoring of fetoplacental Vegfr2 gene activity in a murine pregnancy model using a Vegfr2-luc reporter gene and bioluminescent imaging[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2011(9):51.

[13] Tong Q, Qing Y, Wu Y, et al. Dioscin inhibits colon tumor growth and tumor angiogenesis through regulating VEGFR2 and AKT/MAPK signaling pathways[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2014(2):166-173.


(2017-01-04 收稿,2017-02-27 修回)
中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 赵　毅

(上接第 307 页)

机制介导参与的,缺血时间越长,脑细胞最终会走向凋亡,此后任何治疗不会有效,不会改善其任何功能[12]。大多数学者认为:脑缺血半暗带存在的时间大致为缺血后 3~6 h,所以临床常在 6 h 内溶栓治疗脑梗死;多数学者认为脑缺血半暗带在缺血后 24 h 以内仍存在,甚至时间可推后至缺血后 48 h[13]。综上所述,因脑缺血再灌注导致的 VD,治疗上应抢在出现不可逆的损伤之前,一旦确诊,要采用尽快治疗的原则,否则治疗效果将大大降低。

## 4 参考文献


[1] 张立,邢艳丽,熊伟南. 血管性痴呆治疗的研究进展[J]. 医学综述,2015(8):1414-1417.

[2] 周晓秋. 尼莫地平在血管性痴呆治疗应用[J]. 中国老年保健医学,2013(6):63-64.

[3] 张艳,李倩倩,霍薇. 血管性痴呆动物模型的研究现状[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2015(1):67-70.

[4] 孙丽芳,张丽欣,邢利和. 补阳还五方不同时间给药对血管性痴呆小鼠行为学的影响[J]. 河北中医药学报,2016(1):5-7.

[5] 袁野,杨俊卿,周岐新. 脑缺血再灌注致小鼠神经元退行性变进程中自由基水平和 SOD-1 表达的变化[J]. 第三军医大学学报,2011(12):1211-1215.

[6] 陈贺华,刘勇,沈晓明. 依达拉奉对急性脑梗死患者血清丙二醛和超氧化物歧化酶含量及神经功能的影响[J]. 中国现代药物应用,2014(13):159-161.

[7] 罗招凡,劳伟思,梁伟南. 血清同型半胱氨酸和 SOD 水平与急性脑梗死的相关性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2011(10):2463-2464.

[8] 陈乾兵. 尼莫地平对脑卒中后血管性认知障碍的临床效果[J]. 吉林医学,2015(7):1359-1360.

[9] 李孟,张晓华. 尼莫地平的药理作用及临床应用[J]. 中国实用医药,2013(13):201-202.

[10] 郭付清. 超早期应用尼莫地平对脑缺血大鼠一氧化氮和自由基的影响[J]. 山东医药,2006(17):79-80.

[11] 张根平. 尼莫地平治疗血管性痴呆 92 例临床报道[J]. 中国医药指南,2015(16):112-113.

[12] 王慧霞. 脑缺血半暗带及其干预的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2014(14):52-53.

[13] 汪利,李国忠. 缺血性卒中与脑侧支循环[J]. 中国医师进修杂志,2014(31):70-72.


(2017-01-12 收稿,2017-02-28 修回)
中文编辑: 周　凌; 英文编辑: 苏晓庆