

分类号:
密 级:

学校代码: 10541
学 号: 20043166

湖南中医药大学硕士学位论文

活血利水法对兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变
增殖膜上EGFmRNA及整合素- β_1 表达的影响的实验研究

研 究 生: 付美林

导 师: 彭清华 教授

专 业: 中西医结合眼科学

研究方向: 眼底病的研究

中国 ● 湖南 ● 长沙

二 00 七年五月

原创性声明

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得湖南中医药大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名：

年 月 日

关于学位论文使用授权说明

本人了解湖南中医药大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保存学位论文；学校可根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文。

作者签名：

导师签名：

年 月 日

目 录

中文摘要

英文摘要

引 言

材料和方法.....	1
1. 实验材料.....	1
1.1 实验动物.....	1
1.2 药品及试剂.....	1
1.3 实验器材.....	1
2. 实验方法.....	2
2.1 动物分组.....	2
2.2 PRP 制作	2
2.3 tPVR 模型造模方法.....	2
2.4 给药方法.....	3
2.5 观察指标与方法.....	3
2.6 眼底照相和实体照相.....	3
2.7 眼球壁标本采集方法.....	3
2.8 检测指标与方法.....	3
2.8.1 增殖膜 EGFmRNA 的测定.....	3
2.8.2 增殖膜整合素- β_1 的测定.....	4
2.9 组织学送检.....	5
3. 统计学处理.....	5
结果与分析.....	6
1. 一般情况.....	6
2. PVR 分级情况.....	6

3. EGFmRNA 的测定.....	8
4. 整合素- β_1 的测定.....	9
5. 组织病理学观察.....	10
讨 论.....	11
1. 祖国医学有关 PVR 及其治疗的认识.....	11
2. 现代医学对 PVR 机理及保护视网膜组织的研究现状.....	12
2.1 现代医学对 PVR 机理的认识.....	12
2.2 现代医学对 PVR 治疗的认识.....	15
3 我们对外伤性 PVR 的认识及散血明目片的前期研究.....	16
4. 活血利水法抑制外伤性 PVR 作用机理的探讨.....	17
4.1 散血明目片组方分析.....	17
4.2 活血利水之散血明目片对 ERM 中 EGFmRNA 的影响.....	18
4.3 活血利水之散血明目片对ERM中整合素- β_1 的影响.....	19
结 语.....	20
致 谢.....	21
参考文献.....	24
附 图.....	26

中文摘要

目的：探讨活血利水之散血明目片对外伤性增生性玻璃体视网膜病变 (traumatic Proliferrative Vitreoretinopathy, tPVR) 增殖膜上表皮生长因子信使核糖核酸 (EGFmRNA)、整合素- β_1 表达的影响及防治PVR的作用机理。

方法：将 40 只家兔随机抽取 32 只，造成外伤性PVR模型，随机分成活血利水组、活血化瘀组、利水明目组、模型组，另 8 只为空白组。连续灌胃 28 天后，观察眼底PVR分级情况，原位杂交方法检测增殖膜中表皮生长因子信使核糖核酸 (EGFmRNA)，免疫组化方法检测增殖膜上整合素- β_1 在各组的表达及病理组织学改变。

结果：在活血利水组，增殖膜上整合素- β_1 、表皮生长因子信使核糖核酸 (EGFmRNA) 阳性程度低于模型组，差异有非常显著性 ($P < 0.01$)。活血化瘀组与利水明目组也能降低整合素- β_1 、EGFmRNA的阳性程度，与模型组相比有显著性意义 ($P < 0.05$)。活血利水组整合素- β_1 、EGFmRNA阳性程度低于另 2 个治疗组，有显著性差异 ($P < 0.05$)。活血利水治疗组整合素- β_1 、EGFmRNA阳性程度略高于空白组，有显著差异性 ($P < 0.01$)。

结论：活血利水法是活血化瘀和利水明目两者作用的协同，能通过拮抗增殖膜中整合素- β_1 和表皮生长因子信使核糖核酸 (EGFmRNA) 的作用来抑制增殖细胞的过度增生，从而防治PVR形成和发展。

关键词：活血利水法 外伤性增生性玻璃体视网膜病变 (tPVR) 增殖膜 (ERM) 表皮生长因子信使核糖核酸 (EGFmRNA) 整合素- β_1

**Experimental study on effect of Integrin- β_1 and EGFmRNA'
expression on ERM of Huo Xue Li Shui Method on Traumatic
Proliferative Vitreoretinopathy in Rabbits**

Postgraduate : Fu Meilin

Tutor :Prof. Peng Qinghua

Hunan University of Traditional Chinese Medicine
(Changsha China,410007)

Abstract

Objective: To study the curative and preventive effects and mechanism of HuoXueLiShui Method (HXLSM) on traumatic proliferative vitreoretinopathy .

Methods:32 rabbits were selected randomly from 40 rabbits and induced to traumatic proliferative vitreoretinopathy models, then divided into four groups: the first group was treated with San Xue Ming Mu Tablet—Huo Xue Li Shui (HXLS) group, the second treated with Zhi Xue Qu Yu Tablet—Huo Xue Hua Yu(HXHY) group, the third treated with Zhu Ling San—Li Shui Ming Mu(LSMM) group and the model group .The rest 8 formed the blank control group. After the rabbits had been fed and administrated for a month ,we observed the visibility of fundus, the degree of PVR and pathologic changes ,measured the positive levels of epidermal growth factor messenger ribonucleic acid (EGFmRNA)、 integrin- β_1 on epiretinal membrane(ERM).

Results: Compared with model group ,the positive level of EGFmRNA and

Integrin - β_1 was decreased significantly in HXLS group ($p < 0.01$). Compared with model group, the positive level of EGFmRNA and Integrin - β_1 decreased much in HXHY and LSMM group ($p < 0.05$). And the level of EGFmRNA and Integrin - β_1 in HXLS group were lower than those in HXHY and LSMM group. The positive level of EGFmRNA and Integrin - β_1 in HXLS group was a little higher than those in blank group ($p < 0.05$).

Conclusions: HXLS method is the coordination of HXHY method and LSMM method. It could inhibit and cure the formation and development of traumatic PVR by counteracting the expression of EGFmRNA and Integrin- β_1 on ERM as to inhibiting proliferative cell's hyperplasy.

Keywords: HXLS method traumatic proliferative vitreoretinopathy (TPVR) epiretinal membrane (ERM) EGFmRNA Integrin- β_1

引 言

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 于 1983 年由视网膜学会命名。它是指在裂孔源性视网膜脱离或视网膜复位术后, 由于视网膜色素上皮 (RPE) 细胞和神经胶质细胞的增生和收缩, 造成牵拉性视网膜脱离的病变。眼球穿通伤后因过度的眼内纤维组织增生引起的牵拉性视网膜脱离, 称为外伤性PVR; 而因裂孔源性视网膜脱离发生者则称为“特发性PVR”^[1]。其共同点是眼内细胞增生(极少新生血管)牵引视网膜脱离和以时相为特征的程序化过程(包括炎症期、增生期和瘢痕期)^[2]。目前认为, 在炎症刺激下的纤维组织增生和玻璃体或视网膜在伤口的嵌顿, 是其主要发病机制。临床上目前主要采取玻璃体手术治疗, 但手术治疗并不能有效阻止细胞的迁移增生, 甚至刺激其加重, 从而导致PVR的复发。因此, 寻求手术之外的药物辅助治疗, 尤其是中医药治疗, 对我们中医眼科工作者而言, 具有非常重要的意义。

外伤性PVR在中医学归属于“暴盲”、“云雾移睛”、“视瞻昏渺”等眼病的范畴。导师在多年的临床实践中, 自拟了有活血通脉、利水明目作用的中药复方, 并按现代制剂制备工艺制成片剂, 命名为“散血明目片”, 用于治疗玻璃体积血等眼病。临床研究证明, 散血明目片能促进玻璃体积血的吸收, 改善眼底状况。进一步的实验研究证实, 散血明目片能有效防治tPVR并对视网膜具有保护性作用。本课题旨在通过对实验性外伤性PVR模型兔采用活血利水法(服散血明目片)、活血化瘀法(服止血去瘀明目片)、利水明目法(服猪苓散)治疗后, 对增殖膜上EGFmRNA、整合素- β_1 进行对比观察, 进一步阐明活血利水法(散血明目片)抑制外伤性PVR的作用及其机理。

材料和方法

1. 实验材料

1.1 实验动物：有色家兔 40 只，雌雄各半，体重 2.0—2.5kg，由湖南中医药大学动物实验中心提供。

1.2 药品及试剂：

散血明目片：由三七、酒大黄、蒲黄、猪苓、防己、地龙、白茅根、泽泻、益母草等中草药按现代制剂制备工艺制成，0.3g/片，选用同一批号药物，批号：020624。由湖南中医药大学附一院药剂科提供。使用时研成粉末，温开水混合，浓度为 100ml 含散血明目片 12g 的混悬液。

止血祛瘀明目片：由丹参、三七、赤芍、地黄、墨旱莲、茺蔚子、牡丹皮、女贞子、夏枯草、毛冬青、大黄、黄芩（酒炙）等制成，0.3g/片，选用同一批号的药物，批号：国药准字 Z20025316。陕西摩美得制药有限公司提供。使用时研成粉末，温开水混合，浓度为每 100ml 含止血祛瘀明目片 12g 的混悬液。

猪苓散加减：猪苓 10 g、泽泻 10 g、茯苓 15 g、阿胶 10 g（烔）、滑石 10 g、车前子 15 g。使用时煎成汤剂，浓度为 100mL 含生药 130g。

兔EGFmRNA 原位杂交检测盒：购自武汉博士德公司。

兔Anti整合素- β_1 检测盒：购自武汉博士德公司。

SABC 免疫组织化学试剂盒：购自武汉博士德公司。

1.3 主要器材

JY3002 型电子天平	上海精密科学仪器有限公司
HHS-2 电子恒温不锈钢水浴锅	上海南阳仪器有限公司
LEICA DM LB ₂ 型双目显微镜	德国LEICA公司产
TD5- II 台式离心机	长沙平凡仪器仪表有限公司生产

S2-93 自动双重纯水蒸馏器	上海亚荣生化仪器厂生产
Shandon325 型石蜡切片机	英国 Shandon 公司生产
DNP-9162 型电热恒温培养箱	上海精宏实验设备有限公司生产
Motic B ₅ 显微摄像系统	麦克奥迪实业集团公司生产
DF-101B 集热式恒温磁力搅拌器	浙江乐清乐成电器厂生产
DZF--6050 真空干燥箱	上海精宏实验设备有限公司生产
杂交湿盒 100 片型	美国 Boster 公司生产
HZS-H 水浴振荡器	哈尔滨东联电子技术开发有限公司生产

常规眼科手术器械(眼科剪、眼科镊、8-0 尼龙缝线等), 自备。

2. 实验方法

2.1 动物分组: 40 只有色家兔随机抽取 8 只(8 只眼)作为空白组(A 组), 其余 32 只(32 只眼)造成右眼外伤性 PVR 模型, 并随机分成模型组(B 组)、活血化瘀组(C 组、用止血祛瘀明目片)、利水明目组(D 组、用猪苓散)、活血利水组(E 组、用散血明目片), 每组 8 只(8 只眼)。

2.2 富含血小板的血浆(platelet-rich plasma, PRP)的制备: 用 3.8%枸橼酸钠的玻璃离心管收集健康成年有色兔耳缘静脉血(静脉血与枸橼酸钠体积比为 9:1), 轻轻摇动混匀, 室温下以 50g 之离心力离心 10 分钟, 取上 1/3 之上清液, 进行血小板计数, 获得血小板浓度为 $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5/\text{ml}$ 的血浆, 即 PRP^[3]。

2.3 外伤性实验性 PVR 模型制作^{[4][5]}: 有色家兔 32 只(体重 2.0—2.5kg), 耳缘静脉注射乌拉坦 4ml/kg。每只兔选右眼为实验眼, 自颞上方注入透明质酸酶 0.1ml 并反复抽吸, 再分离 3-9 点的球结膜和筋膜, 在角膜缘后 4mm 处用巩膜穿刺刀刺向玻璃体中心部, 勿伤及晶状体及周边视网膜, 用剪刀向两侧扩大切口, 伤口与视网膜平行达 8mm。轻压眼球, 将脱离的玻璃体剪除, 用 8-0 尼龙线间断缝合切口。玻璃体腔中央注入 0.1ml 的 PRP (约含 50,000 个血小板)。术毕予地塞米松 + 庆大霉素各 0.1ml 球

结膜下注射。造模后 1 周内每天用 0.3%诺氟沙星滴眼药滴右眼，每天 3 次；0.5%托吡卡胺滴右眼，每天 3 次。

2.4 给药方法：造模后第 3 天开始给药，A 组（空白组）与 B 组（模型组）均予温开水灌胃，5ml/kg、2 次/日。C 组（活血化瘀组）予止血祛瘀明目片混悬液灌胃，0.6g · 5ml/kg，2 次/日。D 组（利水明目组）予猪苓散汤剂灌胃 6.5g · 5ml/kg (每 ml 含生药 1.3g)，2 次/日。E 组（活血利水组），予散血明目片混悬液，按 0.6g · 5ml/kg 灌胃，2 次/日。均相当于成人剂量。各组均灌胃 28 天。

2.5 观察指标与方法：

PVR 分级 用直接检眼镜检查，观察 PVR 分级，采用 Weiss 的评级方法^[6]，将病变分为六级：

0 级：无增生；

0.5 级：玻璃体勉强可见增生痕迹；

1 级：细小的增生束，但无真正的条索形成；

2 级：有浓厚的增生束，但无真正的增生条索形成；

3 级：有细薄的增生条索；

4 级：有浓厚的增生条索。

2.6 眼底照相和实体照相：用 TOPCON 眼底照相机给形成 ERM 的兔眼照相。取模型组完整眼球，先将眼球取出放入混合固定液中 3h，然后去除角膜和晶体，固定于桌面上，打开聚光灯，数码相机拍摄。

2.7 眼球壁标本采集方法：上述采集完玻璃体标本的眼球立即行眼球摘除术，并在上极象限作球冠形开窗，观察增殖膜分级情况后，剔除角膜和晶状体，取眼球壁，小心剥离视网膜及增殖膜组织，立即置于 4%的戊二醛溶液中，保存于 4℃ 下固定，待检。

2.8 检测指标与方法：

2.8.1 增殖膜 EGFmRNA 的测定

标本离体后,及时予以固定。固定液为4%多聚甲醛/0.1MPBS (PH7.0-7.6),含有1/100DEPC。固定1小时即可,常规脱水、浸蜡、包埋。切片厚度6 μ m。石蜡切片经常规脱蜡和水化。30%H₂O₂ 1份+蒸馏水10份混合,室温5-10分钟以灭活内源性酶。蒸馏水洗3次。切片上滴加3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶(1ml3%柠檬酸加2滴浓缩型胃蛋白酶,混匀),37℃或室温消化20分钟。用PBS洗3次×5分钟。蒸馏水洗1次。胃蛋白酶消化后才需要固定液为1%多聚甲醛/0.1MPBS (PH7.2-7.6),含有1/1000DEPC。室温固定10分钟。蒸馏水洗3次。干的杂交盒底部加20%甘油20ml以保持湿度。按每张切片20 μ l加预杂交液,置于恒温箱中38-42℃3小时。吸取多余液体,不洗。将保护膜揭开后,盖在切片上。恒温箱40℃杂交过夜。37℃左右水温的2×SSC洗涤5分钟×2次;37℃0.5×SSC洗涤15分钟×1次;37℃0.2×SSC洗涤15分钟×1次(如果有非特异性染色,重复0.2×SSC洗涤15分钟×1-2次),置于恒温箱中37℃30分钟。滴加封闭液,甩去多余液体,不洗。滴加生物素化鼠抗地高辛,滴加SABC,滴加生物素化过氧化物酶,每次用PBS洗5分钟×4次。DAB显色,复染,酒精脱水,二甲苯透明,封片。光镜下胞浆呈棕黄色颗粒者为阳性。用显微图象分析仪对切片进行图像分析,所有切片均在同一放大倍数(×200)及同一光强度下分析,测量阳性染色区域,每例动物测10张切片,取平均值。观察指标:①平均光密度(average optical density, AOD);②阳性产物平均灰度值(average gray, AG, 系统设定白色最大灰度为256,黑色最小灰度为0)。实验数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2.8.2增殖膜整合素- β_1 的测定

石蜡切片6 μ m,常规脱蜡和水化,3%H₂O₂室温处理10min;微波炉热修复抗原;正常山羊血清封闭30min,吸取多余液体,不洗,滴加1:100稀释的兔抗TGF- β_1 抗体;滴加生物素化羊抗兔IgG;滴加SABC;每步之间用

0.1mol/LPBS充分洗涤。最后，显微镜下控制DAB显色时间，苏木素复染，脱水，透明，封片。具体步骤按照试剂盒说明进行，阴性对照用PBS代替一抗。DAB显色，光镜下胞浆呈棕黄色颗粒者为阳性。用显微图象分析仪对切片进行图像分析，所有切片均在同一放大倍数（ $\times 200$ ）及同一光强度下分析，测量阳性染色区域，每例动物测10张切片，取平均值。观察指标：①平均光密度；②阳性产物平均灰度值（系统设定白色最大灰度为256，黑色最小灰度为0）。实验数据以平均值 $\pm$ 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。

2.9 组织学送检

光学显微镜检查：灌胃 28 天后，所有实验兔均用空气栓塞法处死，取出右眼球，采集完增殖膜标本后予固定液固定 24 小时，梯度酒精脱水，二甲苯透明，浸蜡和石蜡包埋后进行切片，片厚 $6\mu\text{m}$ ，铺于载玻片上，常规进行 HE 染色，显微镜观察和摄影。

3. 统计学处理

所有实验数据以均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，用 SPSS14.0 进行统计学处理。先做方差齐性检验，方差齐者用方差分析，方差不齐者作数据转换变为方差齐后再行方差分析，组间比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性， $P < 0.01$ 表示差异具有极显著性。（其中 PVR 等级资料比较行秩和检验，以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。）

结果与分析

1. 一般情况

所有实验动物在实验观察期间进食及精神状态正常。结膜及角膜上皮无溃疡及糜烂缺损。

2. PVR 分级情况

空白组玻璃体透明，视网膜结构清晰，灌胃 28 天眼底无明显变化。

给药后第 1 天，少部分兔眼眼底用检眼镜看不见视网膜红光反射，大部分玻璃体腔中可见界限清楚的雾状混浊，眼底视网膜结构模糊可见。

给药后第 7 天，各组兔眼玻璃体中可见灰白色团块状混浊，少数可见灰白色细小条索。

给药后第 14 天，各组玻璃体中可见灰白色膜样混浊。模型组中玻璃体腔中出现大小不等的纤维增生条索；活血化瘀组与利水明目组亦有部分出现纤维增生条索，均较模型组少；活血利水组可见细小增生束，未见增生条索。

给药后第 21 天，模型组中的纤维条索渐增大，少数眼可见较粗大的条索，并牵拉视网膜，开始出现局部视网膜脱离及视网膜皱褶；活血化瘀组及利水明目组玻璃体的条索较模型组少，偶见粗大条索；活血利水组玻璃体中可见少量细小条索，未见粗大的增生条索。

给药后第 28 天，各组的玻璃体混浊均较前减轻，眼底红色反光增强，其表面被灰白色的机化膜所包绕。模型组多数眼可见较粗大的增生条索，出现视网膜脱离及皱褶；活血化瘀组及利水明目组可见少量粗大增生条索及牵拉性视网膜脱离；活血利水组未见粗大的增生条索，但可见程度不等的机化膜。

各组中不同时期的 PVR 分级情况见表 1、表 2、表 3、表 4。给药 28

天后处死的模型组眼底照相和实体照相见图 1, 2。

表 1 第 1 天各组 PVR 分级比较

组别 \ Weiss 分级	0	0.5	1	2	3	4
模型组	4	4	0	0	0	0
活血利水组	5	3	0	0	0	0
活血化瘀组	4	4	0	0	0	0
利水明目组	5	3	0	0	0	0

表 2 第 7 天各组 PVR 分级比较

组别 \ Weiss 分级	0	0.5	1	2	3	4
模型组	1	3	3	1	0	0
活血利水组	4	4	0	0	0	0
活血化瘀组	2	3	2	1	0	0
利水明目组	2	2	3	1	0	0

表 3 第 14 天各组 PVR 分级比较

组别 \ Weiss 分级	0	0.5	1	2	3	4
模型组	0	0	1	3	2	2
活血利水组	3	4	0	1	0	0
活血化瘀组	0	2	3	1	2	0
利水明目组	0	0	2	3	2	1

表 4 第 21 天各组 PVR 分级比较

组别 \ Weiss 分级	0	0.5	1	2	3	4
模型组	0	0	0	2	4	2
活血利水组	2	3	1	1	1	0
活血化瘀组	0	1	1	3	2	1
利水明目组	0	0	2	2	2	2

表 5 第 28 天各组 PVR 分级比较

组别 \ Weiss 分级	0	0.5	1	2	3	4
模型组	0	0	0	2	3	3
活血利水组	1	3	2	1	1	0
活血化瘀组	0	0	2	3	2	1
利水明目组	0	0	1	3	2	2

经统计分析 (秩和检验, $P < 0.05$), 给药 1-7 天时各组之间无显著性差异 ($P > 0.05$); 给药后第 14 天、21 天、28 天各组之间有显著性差异 ($P < 0.01$), 其中活血利水组的 PVR 严重程度显著低于模型组及另 2 个治疗组 ($P < 0.05$), 活血化瘀组、利水明目组与模型组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3. EGFmRNA 的测定

染色观察结果: 空白组标本染色阴性“-”; 模型组 PVR 增生膜标本染色强阳性“3+”, EGFmRNA 表达明显增强; 活血利水组 PVR 增生膜标本染色弱阳性“+”, 也有 EGFmRNA 的表达, 但阳性染色程度较模型组明显减弱, 表达水平较低; 活血化瘀组弱阳性“+”, 表达水平较低; 利水明目组阳性“2+”, 阳性染色程度较活血利水法组和活血化瘀组强, 表达水平较高, 见图 9~13。给药 28 天后 ERM 中 EGFmRNA 的表达见表 6。

表 6 各组 ERM 中 EGFmRNA 的表达阳性指标测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	AG	AOD
A 空白组	8	86.1 ± 2.1	0.462 ± 0.0027
B 模型组	8	$43.3 \pm 2.5^{\Delta}$	$0.744 \pm 0.0036^{\Delta}$
C 活血化瘀组	8	$59.8 \pm 1.6^{\Delta*}$	$0.595 \pm 0.0021^{\Delta*}$
D 利水明目组	8	$53.0 \pm 2.2^{\Delta*}$	$0.647 \pm 0.0025^{\Delta*}$
E 活血利水组	8	$75.4 \pm 1.9^{\Delta* \# \varepsilon}$	$0.490 \pm 0.0032^{\Delta* \# \varepsilon}$

Δ : 与正常组相比, $P < 0.01$; *: 与模型组相比, $P < 0.01$; #: 利水明目组相比, $P < 0.05$; ε : 与活血化瘀组相比, $P < 0.05$

如表 6 所示, 空白组、活血利水组与模型组比较, 阳性区 AG 和 AOD

均存在显著性差异 ($P < 0.01$)。活血化瘀组、利水明目组与模型组比较,阳性区 AG 和 AOD 也存在差异 ($P < 0.05$)。AOD 越强,阳性细胞面积越大,AG 值越小,表示阳性产物 EGFmRNA 的表达越强烈。活血利水组能明显下调增生膜上 EGFmRNA 的表达,与活血化瘀、利水明目组相比较,也具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

4 整合素- β_1 的测定

4.1 免疫组化染色观察结果:

空白组标本染色弱阳性“+”,说明整合素 β_1 在正常视网膜组织上有表达;模型组PVR增生膜标本染色强阳性“3+”,整合素- β_1 表达明显增强;活血利水组PVR增生膜标本染色呈阳性“+”,也有整合素- β_1 的表达,但阳性染色程度较模型组弱,表达水平较低;活血化瘀组和利水明目组均阳性“2+”,阳性染色程度较活血利水法组强,表达水平较高,见图4~8。

4.2 给药30天后ERM中整合素- β_1 的表达见表7:

表7 各组ERM中整合素- β_1 的表达阳性指标测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	AG	AOD
A 空白组	8	102.9 ± 1.7	0.361 ± 0.0023
B 模型组	8	$46.8 \pm 2.5^{\Delta}$	$0.694 \pm 0.0018^{\Delta}$
C 活血化瘀组	8	$79.3 \pm 1.2^{\Delta*}$	$0.470 \pm 0.0043^{\Delta*}$
D 利水明目组	8	$74.5 \pm 2.3^{\Delta*}$	$0.491 \pm 0.0035^{\Delta*}$
E 活血利水组	8	$97.3 \pm 1.6^{\Delta*}\# \epsilon$	$0.382 \pm 0.0056^{\Delta*}\# \epsilon$

Δ : 与正常组相比, $P < 0.01$; * : 与模型组相比, $P < 0.05$; # : 与利水明目组相比, $P < 0.05$;
 ϵ : 与活血化瘀组相比, $P < 0.05$ 。

如表7所示,空白组、活血利水组与模型组比较,阳性区AG和AOD

均存在显著性差异 ($P < 0.01$)。活血化瘀组、利水明目组与模型组比较,阳性区AG和AOD也存在差异 ($P < 0.05$)。AOD越强,阳性细胞面积越大,AG值越小,表示阳性产物整合素- β_1 的表达越强烈。活血利水组能明显下调增生膜上整合素- β_1 的表达,与活血化瘀、利水明目组相比较,也具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

5. 组织病理学观察

5.1 造模 24 小时后组织病理学观察

空白组玻璃体透明,视网膜结构清晰(见图 14)。其余各组视网膜各层重度水肿,神经纤维层水肿呈气球状、筛网状;外核层、内核层、神经节细胞层细胞数减少,各层结构分界不清楚,并有大量纤维索性渗出。

5.2 造模 28 天后组织病理学观察

空白组:视网膜结构清晰,较前无变化。(图 14)

模型组:可见神经纤维层局部性水肿,神经节细胞层轻度水肿,细胞数减少,神经胶质细胞数量增加,玻璃体腔中有少量渗出和出血,有纤维增殖膜形成,其内有圆形和梭形细胞(图 15)。

活血化瘀组:视网膜各层结构紊乱,可见纤维索性渗出,以及增殖膜形成(图 16)。

利水明目组:视网膜各层紊乱,玻璃体腔内有渗出,有纤维增殖膜形成(图 17)。

活血利水法组:视网膜各层结构稍紊乱,细胞排列整齐,局部性神经纤维层水肿,玻璃体腔内有少许渗出物附于内界膜上(图 18)。

上述结果显示,活血利水组视网膜增殖程度明显轻于模型组,亦轻于活血化瘀组和利水明目组,表明各治疗组均有抑制视网膜增殖形成的作用,但以活血利水组更明显。活血利水法能有效地抑制增生性玻璃体视网膜病变的形成。

讨 论

1.祖国医学有关 PVR 及其治疗的认识

中医对 PVR 无特定的病名，根据 PVR 发病阶段及初发症状不同，多将其归属于“暴盲”、“云雾移睛”或“视瞻昏渺”范畴；有些患者主诉的“闪光感”则与“神光自现”（《审视瑶函》）、“电光夜照”（《目经大成》）相似。中医眼科学在继承传统医学的基础上，通过对现代检查仪器的运用，将整体和局部辨证相结合，认为视网膜、玻璃体的病变与肝、胆、肾、脾等脏腑功能密切相关。中医学认为视衣（视网膜）为瞳神深部组织，PVR 属内障眼病，归属于瞳神疾病范畴。玻璃体被称为“神膏”、“护睛水”，是胆中精汁渗润精华而成，并靠气血濡养而发挥作用，亦属瞳神范畴。因瞳神属水轮，在脏属肾，而视网膜是大脑的延伸部分，肾生髓于脑，故视网膜的病变与肾密切相关。肝胆互为表里，肝肾同源，肾藏精而肝藏血，目得血而能视，故肝肾不足，精血亏虚，不足以养视衣，为视网膜病的病因病机；又肝主疏泄，肝郁则气滞，气滞则血瘀，视网膜病变亦常与此有关；脾为后天之本，气血生化之源，主运化水湿，脾虚气血不足，目失所养，或水湿上泛，湿热内蕴等是视网膜发生变性、水肿、渗出或增殖的重要病机；眼部外伤，脉络破损，血溢脉外，也是其常见发病原因。中医对视网膜增殖物的辨证，认为凡出血所致日久不散变生膜状物，多属气血瘀滞；炎症所致的增殖，多因痰湿凝结。

中医对PVR的治疗，首先多采取防患于未然的措施，即对于玻璃体混浊，实行辨证论治。陆绵绵^[7]对于玻璃体出血性混浊（玻璃体积血）辨证分型，血热妄行型治以清热凉血止血之犀角地黄汤加减；气血瘀滞型治以活血化瘀之桃红四物汤加减；阴虚火旺型治以滋阴降火、活血化瘀之知柏地黄汤加减；气不摄血型治以补气摄血之归脾汤加减。病程较久，

玻璃体内有白色机化物形成者，可加昆布、海藻、牡蛎、贝母以软坚散结，均有良好疗效。李传课^[8]对于老年人或高度近视眼患者治以补益肝肾的驻景丸加减；湿热内蕴者治以清热利湿之猪苓散加减；气血不足者治以补益气血之八珍汤，在临床上疗效确切。郭小健^[9]等曾在PVR兔眼玻璃体内注射汉防己甲素（汉防己中分离出来的一种生物碱）药液，可有效抑制玻璃体纤维增殖，使视网膜脱离率由对照组的77.5%降至43.5%。其次，中医重视围手术期的药物治疗，在PVR的治疗上，尤其注重手术后用药，目前一般多主张中西医结合治疗，以促进术眼的恢复，减少PVR的复发率和手术并发症。郑燕林^[10]运用具有破血逐瘀、软坚散结功能的水蛭素（水蛭中提取的一种多肽，凝血酶的特异抑制剂）注入外伤性PVR兔眼玻璃体腔内，发现对早期细胞外基质主要成分层粘连蛋白和IV型胶原有抑制作用，而且与模型对照组相比较，水蛭素高、低剂量治疗组均能提高闪光视网膜电图b波振幅，尤其是高剂量治疗组优于低剂量治疗组，从而达到保护视网膜的目的，并以此验证临床上PVR的手术后中药复方的应用确实对视网膜具有保护作用。雷晓琴^[11]在基础研究发现，化瘀散结片能降低玻璃体中碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮生长因子浓度，降低PVR增殖膜中LN（层粘连蛋白）、IVc（IV型胶原）的阳性表达及玻璃体液中LN、IVc的浓度，从而防治PVR的形成和发展。

综上所述，在PVR的形成前，以及PVR的围手术期应用中医药，对提高视功能，减少术后复发率等方面确有其肯定、独到的疗效，临床报道也较多见。因此，我们希望能通过基础实验更好地阐明中药复方防治PVR的作用机理。

2. 现代医学对PVR机理的认识及保护视网膜组织的研究现状

2.1 现代医学对PVR机理的认识

PVR是指在视网膜前、后面及玻璃体内形成的可以收缩的细胞性膜，主要在眼外伤或裂孔源性视网膜脱离后的视网膜复位手术后形成。对其

发病机制,近几十年来,许多眼科学者进行了积极的探索,但至今仍不清楚。大量的基础研究表明,和其他受伤组织一样,PVR的发生大致分为三个阶段,即炎症反应期、增殖期及瘢痕重塑期。只不过这个过程被机体所过度激化,其中包括血-视网膜屏障破坏、炎症反应、细胞移行、增生和分泌细胞外基质、瘢痕收缩等。有文献报道,PVR的发生有很多危险因素,包括视网膜巨大裂孔、多发裂孔、无晶状体眼、脉络膜脱离、伴有葡萄膜炎等^[12]。由于视网膜巨大裂孔、多发裂孔及术后炎症反应可使RPE细胞更多进入玻璃体腔和影响血-眼屏障。对于白内障术后、无晶状体眼的视网膜脱离,因白内障手术可使血-眼屏障受到一定影响,且短期内发生孔源性视网膜脱离,则PVR形成的危险性更大,而视网膜冷凝既可使RPE细胞释放进入玻璃体腔,又可加重血-眼屏障的损害。自1975年Mackmer首先提出PVR是由细胞增殖所形成以来,经过多年的病理生物学研究,现已阐明眼内细胞增殖是对创伤的修复性反应,综合起来共有5种细胞成分,即(1)视网膜色素上皮细胞;(2)神经胶质细胞(包括Müller细胞及星形细胞);(3)成纤维细胞;(4)肌成纤维细胞;(5)巨噬细胞。前两者为基础成分,后三者均可由前两者转化而来。也就是说,玻璃体或视网膜结构完整性被破坏后,玻璃体内各种细胞,主要是视网膜色素上皮细胞,其次是巨噬细胞、成纤维细胞、神经胶质细胞等以细胞外基质为支架进行迁移,进而增生、收缩,牵拉视网膜^[13]。在PVR形成过程中,有酶类、蛋白、胶原^[14]、生长因子合成和免疫系统^[15]的参与。炎症或损伤修复时,出现巨噬细胞的趋化及聚集、血小板的析出及聚集、血液的凝固等,可以释放多种生长因子,如TGF- α 、EGF、TNF等,从而刺激视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞及神经胶质细胞的增生、移行,导致PVR形成^[16]。

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是1962年Cohen首先发现的一种小分子多肽,能刺激上皮细胞和成纤维细胞生长、增生,是通过

EGFR对组织修复及再生发挥重要的调节作用,从而促进创面修复。与EGF具有相同受体的另一种小分子多肽是转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α),与EGF属于同一家族,与EGF具有相似的生物学效应^{[17][18]}。而EGFR的存在是它们作用的基础。当EGFR未与其配体结合时,EGFR随机分布于细胞表面,呈侧向运动和自旋运动,配体与EGFR结合后,激活酪氨酸蛋白激酶,细胞内蛋白磷酸化,向细胞内传递有丝分裂信息,使细胞进行分化增殖。当位于细胞膜上的EGF-EGFR复合物被细胞吞入胞质,复合物被溶酶体分解而TGF- α 、A-EGFR复合物由于pH值的改变使TGF- α 从受体分解,复合物向细胞内传递的信号被终止,EGFR再循环到细胞膜上供再利用,其生物学功能消失^{[19][20]}。EGFR是一种170kD的跨膜糖蛋白,在人、猴及大鼠正常视网膜组织未见EGFR表达^{[21][22]}。有研究证实,EGFR蛋白分子及基因的表达并不是存在于PVR的全过程,而主要存在早期病变中^[23]。在病变早期,EGFR与其配体结合形成复合物才具有生物学活性,促进PVR的发生与发展,到中后期其功能降低并逐渐消失。已有研究证明,伤口的巨噬细胞表达TGF- α ,而EGFmRNA表达于其临近细胞;但体外实验已证明,培养的巨噬细胞或巨噬细胞系未见EGF表达,说明EGF由伤口的非巨噬细胞分泌^[24]。前文已提出PVR是一种损伤修复的过程,巨噬细胞可诱发PVR的发生^{[25][26]}。前文提到的EGFR激活过程可能都是EGFR在PVR的早期高表达的原因,但其机制尚需更进一步研究。EGFR阳性细胞来源目前仍不太明确,可能来源于视网膜色素上皮细胞或巨噬细胞。目前,EGFR单克隆抗体及酪氨酸蛋白激酶抑制剂等药物用于阻止EGFR与配体的结合复合物发挥其生物学功能已成为肿瘤治疗研究的热点,有的药物已进入Ⅱ期临床试验,这些药物可能为预防及治疗早期PVR提供新思路。

整合素(integrin)大多为亲异性细胞粘附分子,其作用依赖于 Ca^{2+} ,介导细胞与细胞间的相互作用及细胞与细胞外基质间的相互作用。含 β_1

亚单位的整合素主要介导细胞与细胞外基质成分之间的粘附^[27]。视网膜脱离后出现纤维增殖可形成增殖性视网膜病变，目前的研究表明，在增殖的纤维膜边缘上有整合素 β_1 的表达，并认为来源于成纤维细胞。整合素 β_1 作为细胞膜上的细胞外基质结合受体，是细胞与基质胶原、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白的主要联系桥梁。细胞膜上的整合素的表达水平一方面影响着细胞的增殖、分化、迁移和某些大分子的合成^[28]，另一方面对细胞保持结构完整有着密切联系。有研究显示^[29]，整合素 β_1 在脱离的视网膜各层广泛表达，说明在视网膜脱离后的确存在细胞与细胞间质的信号的变化。在玻璃体视网膜增殖性病变发生过程中，胶原、纤维粘连蛋白等细胞外基质成分发生沉积，色素上皮细胞、成纤维细胞可以通过整合素 β_1 与这些细胞外基质结合，为细胞的游走和增殖提供了条件。视网膜复位后整合素 β_1 核酸表达较视网膜脱离状态下核酸表达明显低，说明视网膜复位对导致细胞游走、增殖的整合素 β_1 的表达有抑制作用，从而减少了细胞迁移的条件，在一定程度上可以抑制增殖性玻璃体视网膜病变的进一步进展^[30]。

2.2 现代医学对PVR治疗的认识

目前，手术治疗仍然是PVR 治疗的最主要方法。鉴于多次术后仍有复发的可能，药物治疗依然在不断摸索中。动物实验证明，5-Fu能有效降低PVR的发病率，在治疗剂量下相对无毒性反应，临床多采用玻璃体腔注射治疗PVR，Pastor 等^[31]在手术后将5-Fu与激素联合使用能防止视网膜脱离手术后的PVR产生；眼内注射地塞米松能抑制细胞增殖及牵拉性视网膜脱离，这可能是糖皮质激素减少了血-视网膜屏障的破坏以及对炎症反应过程的抑制。临床应用显示，全身给药或玻璃体腔注射均有减少PVR发生的作用；Yang等人最近利用从蛇毒提取的一种小分子多肽即去整合素能抑制实验性兔PVR的产生^[32]，结果发现，PVR的发生率明显下降。基因治疗也是现在很热门的研究方向，抗义链RNA是一种目前正在研究的极具

临床价值的基因治疗方法之一，如果将PDGF、TGF- β 或者CTGF抗义链应用于PVR的预防与治疗，可能会有一定的效果。Mori等^[33]报道，载有适当数目基因的腺病毒可作为基因治疗PVR的有效载体。Wong等^[34]实验研究结果表明，缺乏核苷酸还原酶的单疱疹病毒I型(HSV-I)的突变体HrR可以被用来感染和选择性杀死增生活跃RPE细胞，从而开发为治疗人PVR的方法。这些仍处于动物实验研究中，有利有弊，如何正确引导仍需探索。

3. 我们对外伤性 PVR 的认识及散血明目片的前期研究

古人对于水与血有着精辟、独到的见解。李东垣指出“血与水本不相离”；明·缪希雍认为：“水属阴，血亦属阴，以类相从”；唐容川《血证论》更指出“血与水皆阴也，水为先天阴气所化之阴液，血为后天胃气所化之阴汁”；“水为血之倡，水行则血行”。《灵枢·营卫生会曰》：“夺血者无汗，夺汗者无血”。揭示了血竭津枯，水枯血虚的相关病理。《金匱要略》所言：“经为血，血不利则为水”，指出了血与水的病理因果关系。唐容川《血证论》则根据“血积既久，其水乃成”，“水虚则精血竭”的病理基础，强调了“血病而不离乎水”。因此，导师提出 PVR 生理病理机制是以上理论在眼内的局部应用，即生理上水血同源，病理上水血互累。导师认为 PVR 属祖国医学外不见证的瞳神疾病。津液化其精微，上输于肺，若雾露之溉，受气取汁，变化而赤，方始为血，再经肺朝百脉之功上输于目。津液和调，则脉道通利，瞳神不为所犯。肝肾同源，若肾阴虚，虚火上炎，灼伤脉络，血溢脉外；或肝气郁结，气滞血瘀，脉络阻滞，血行不畅；或肝郁日久化热，或外邪入里化热，迫血妄行；或肾水不足，水不涵木，肝阳上亢，血不循经；或脾虚气血不足，目失所养或水湿上泛，痰湿凝结亦可导致视网膜增植物形成。而外伤后损及脉络致血不循经，溢于脉外，出血日久不散变生膜状物而发外伤性 PVR。至于玻璃体视网膜手术亦是一种人为的眼外伤，术后多有瘀血病理存在。故而导师提出“水血互结”之病机，治疗上主张用活血利水法以

活其血、利其水、散其结，组方散血明目片。

前期实验研究表明^{[35][36]}，活血利水之散血明目片具有显著促进玻璃体中红细胞溶解的作用；促进巨噬细胞的噬血功能，因而对积血的清除有显著作用，促进血液循环，改善血液流变学指标；显著提高SOD活性，减轻自由基对眼组织的损害，因而对玻璃体积血造成的玻璃体组织结构损害有一定的促进恢复作用；能减少巨噬细胞释放IL-6、TNF- α 等炎症因子^{[37][38]}，抑制其在玻璃体内的高表达，进而抑制由玻璃体积血造成的PVR的发生；能降低外伤性PVR玻璃体中ICAM-1的高表达^[39]，因而减少了细胞直接接触，也因此减少视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、神经胶质细胞等迁移与增殖；能同时降低外伤性PVR模型兔玻璃体中CTGF高表达^[40]，进而抑制增殖细胞的过度增生，从而抑制PVR的形成和发展。

前期临床研究表明^[41]，散血明目片能促进玻璃体积血的吸收，改善眼底状况，改善全身的血液流变性，降低血液粘滞性和聚集性，降低血小板的活化功能，减轻血管内皮细胞的受损等，从而全面改善患者的血瘀状况，加速积血的清除，提高玻璃体积血患者的视功能，对视网膜具有保护性作用。

4.活血利水法抑制外伤性 PVR 作用机理的探讨

4.1.散血明目片组方分析

散血明目片以三七、白茅根为君药，蒲黄、益母草、猪苓、泽泻为臣药，酒大黄、地龙、山楂为佐药，木贼草为使药。方中三七化瘀止血，活血通脉；药理研究证实三七能明显抑制凝血酶原-纤维蛋白系统，能降低血小板表面活性，促进纤维蛋白溶解；白茅根止血利水，凉血清热，现代研究证明，本品有利尿降压作用，并能缩短出血时间，增强凝血作用，降低毛细血管通透性，因而对高血压、糖尿病引起的眼科病变有标本兼治之功；蒲黄生用利水、止血化瘀。近代研究资料发现，蒲黄能促

进血液凝固，其浸液、煎剂或乙醇浸液能使实验动物凝血时间明显缩短，作用显著而持久。蒲黄提取物能使血小板增加，改善微循环；益母草活血利水，《本草汇言》：“行血养血，行血而不伤新血，养血而不滞新血，诚为血家之圣药也”。现代药理证明益母草能改善血液的浓、粘、凝、集状态，使子宫组织血运通畅，改善局部缺血缺氧；猪苓、泽泻利水且明目；大黄通行十二经，清热泻火，擅通瘀滞，酒炒可减其苦寒泄下之弊，增其通滞化瘀之功；地龙清热通络利水，《本草纲目》云：地龙“性寒而下行……能解诸热疾……而通经络”，其提取物蚓激酶对玻璃体积血有促进吸收作用；山楂行气消积散瘀；木贼草入肺经，入血分而疏泄瘀滞，清热消积且明目，为引经报使之药。诸药合用，共奏活血、通脉、利水、明目之功。

4.2. 活血利水之散血明目片对 ERM 中 EGFmRNA 的影响

本实验结果显示，模型组 EGFmRNA 阳性程度明显增高，其余各组增殖膜上 EGFmRNA 也有较高表达，而活血利水治疗组 EGFmRNA 阳性程度明显较模型组低，亦低于活血化瘀组与利水明目组，说明活血利水法治疗（用散血明目片）在抑制 PVR 发展过程中起作用，且效果优于单纯活血化瘀法与利水明目法。活血利水之散血明目片组方中所用的药物，据现代药理研究表明，大部分具有抑制血小板聚集和粘附、改善血液流变性、降低血管的通透性、改善血管的脆性、扩血管、加速止血、防止血栓形成的作用，因此能加速消除玻璃体混浊，减少积血对视网膜的毒性损伤，减少巨噬细胞的浸润及炎性因子的释放，从而降低外伤性 PVR 增殖膜中 EGFmRNA 的高表达，因而减少了细胞直接接触，也因此减少视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、神经胶质细胞等迁移与增殖，进而抑制 PVR 的形成和发展。

4.3. 活血利水之散血明目片对 ERM 中整合素- β_1 的影响

本实验结果表明，模型组 ERM 中整合素- β_1 阳性程度明显增高，说明

整合素- β_1 参与了PVR的形成。活血利水组、活血化瘀组、利水明目组中整合素- β_1 的阳性表达均较模型组明显减少，其中活血利水组的整合素- β_1 的表达又低于活血化瘀组和利水明目组，说明活血利水法、活血化瘀法、利水明目法对抑制外伤性PVR的形成均有一定作用，而且活血利水法疗效优于单纯活血化瘀法或利水明目法。实验结果提示，具有活血利水作用的散血明目片能同时降低ERM中整合素- β_1 的阳性表达，从而抑制增殖细胞的过度增生，防治PVR的形成和发展。

结 语

本课题探讨了具有活血通脉、利水明目作用之散血明目片对成年有色家兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变的影响,检测增殖膜上整合素- β_1 、EGFmRNA表达情况,得出如下结论:

1. EGFmRNA、整合素- β_1 在实验性增生性玻璃体视网膜病变家兔模型的增生膜中均有高表达,EGFmRNA、整合素- β_1 均参与PVR的形成。

2. 活血利水之散血明目片具有抑制血小板聚集和粘附、改善血液流变性、降低血管的通透性、改善血管的脆性、扩血管、加速止血、防止血栓形成的作用,因此能加速消除玻璃体混浊,减少对视网膜的毒性损伤,减少巨噬细胞的浸润及炎性因子的释放,从而降低了外伤性PVR模型兔增殖膜中EGFmRNA的高表达,因而减少了细胞直接接触,也因此减少视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、神经胶质细胞等迁移与增殖,进而抑制PVR的形成和发展。

3. 活血利水之散血明目片能同时降低ERM中整合素- β_1 的阳性表达,进而抑制细胞的过度增生,防治PVR的形成和发展。

致 谢

本课题自始至终在导师彭清华教授的悉心指导下完成，谨向我的导师致以衷心的感谢。感谢彭老师三年来给我生活和学习上无微不至的关怀，在我做动物实验，开题报告选题，毕业论文的设计、撰写方面都提供了充足的经费支持和无私的技术指导；不遗余力为我提供各种学习机会，使我在临床和科研方面都取得了较大进步；其严谨的治学态度，高超的医疗技术，精辟独到的眼底病见解，诲人不倦的教育态度将永远是我学习的榜样。

本课题的完成还得到了学校附一医院眼科李传课教授、喻京生老师、任定业老师、罗丹老师、眼视光中心夏海燕老师，学校实验动物中心余望贻主任，学校病理教研室丁志高老师、张国民老师，学校附一院药剂科左亚杰老师的指导和帮助，得到了邢雁飞、陈吉、刘婷、熊静、周丽、魏艳萍、陈艳芳、张志慧等同学的大力支持和帮助，在此一并致以衷心的感谢和良好的祝愿。

同时衷心感谢中医附一院眼科罗萍主任及全体医护人员以及郴州市第一人民医院眼科武正清教授及各位老师在我临床实习期间给予的关心和指导。

参考文献

- [1] Wiedemann P, Hilgers RD, Heimann K. Adjunctive daunorubicin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy: results of a multicenter clinical trial[J]. Am J Ophthalmol 1998, 126:550-559.
- [2] 惠延年. 增生性玻璃体视网膜病变: 带入 21 世纪的深题. 中华眼底病杂志 1999, 15 (2): 67—68;
- [3] 汪谦主编. 现代医学实验技术. 第一版. 北京: 人民卫生出版社 1997
- [4] 万光明. 一种新的PVR 模型的制作与评价[J]. 中国实用眼科杂志2003 , 21 (2) :148 - 149.
- [5] 惠延年, 蔡用舒. 兔眼后节穿孔伤玻璃体纤维增生[J]. 中华眼科杂志 1985, 21 (5): 75—77.
- [6] Weiss JF, Belkin M. The effect of penicillamine on post vitreous proliferation [J]. Am J Ophthalmol, 1987, 92:625.
- [7] 章淑华. 陆绵绵教授治疗玻璃体积血的经验 [J]. 长春中医学院学报 2000, 16(2): 9-10
- [8] 李传课主编. 中医眼科临床手册. 第一版. 上海: 科学技术出版社 1987
- [9] 郭小健. 血栓通和汉防己甲素对实验性增殖性玻璃体视网膜病变的作用[J]. 中华眼科杂志 1994, 30 (4): 308-309
- [10] 郑燕林. 水蛭素对外伤性增生性玻璃体视网膜病变增殖膜抑制机制的探讨 [J]. 中国中医眼科杂志2002, 12 (4): 187-192
- [11] 雷晓琴. 化瘀散结片对兔眼外伤性增生性玻璃体视网膜病变玻璃体中层粘连蛋白IV型胶原的影响[J]. 中国中医眼科杂志2003, 13 (3): 125-129
- [12] 冯学峰(译). 增殖性玻璃体视网膜病变的发病机理. 美国医学会眼科杂志中文版, 1998, (10): 261
- [13] Wiedemann P, Heimann K. Proliferative vitreoretinopathy. Pathogenesis and Possibilities for treatment with cytostatic drug. Klin Monatsbl-Augenheilkd. 1986, 188: 559-564.
- [14] Kon CH, Occhleto NL, Charteris D, et al. A prospective study of matrix

- metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39: 1524-1529.
- [15] Weller M, Heimann L. Proliferative vitreoretinopathy: new discoveries in pathophysiology and therapy. Klin Monatsbl - Augenheilkd, 1997, 76: 355-361.
- [16] Patel B, Hiscot P, Charteris D, Mather J, McLeod D, Boulton M. Retinal and preretinal localisation of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptor in proliferative diabetic retinopathy[J]. Br J Ophthalmol 1994, 78: 714-718.
- [17] 王正国. 创伤愈合与组织修复[M]. 济南: 山东科技出版社 1998.
- [18] Ziehler TR, Pierce GF, Herndon DN. Growth Factors and Wound Healing: Basic science and potential clinical application[M]. New York: Springer, 1997: 206.
- [19] Ono HA. Study of cytokines in burn blister fluid related to wound healing[J]. Burns 1995, 21(5): 325-352.
- [20] 王明国. 表皮生长因子受体[J]. 国外医学分子生物学分册 2001, 21(2): 82-85.
- [21] Couch JM, Cullen P, Casey T, Fabre J. Epidermal growth factor receptor sites in human and monkey eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1988, 29: 86.
- [22] 熊新春, 杜蜀华, 魏厚仁. 表皮生长因子受体在正常大鼠眼组织中的表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志 1999, 8: 64-66.
- [23] 阎峰, 惠延年, 马吉献. 表皮生长因子受体在增生性玻璃视网膜周膜中的表达[J]. 眼科新进展 2003; 23(1): 8-10
- [24] Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping[J]. Science 1988, 241: 708-711.
- [25] 惠延年, 石一宁, 张新海, 等. 巨噬细胞诱发的实验性增生性玻璃体视网膜病变中的几种早期炎症细胞因子[J]. 中华眼科杂志 1999, 35(2): 140-143.
- [27] 周晓虹, 张锦生. 整合素的研究进展(综述) [J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1995, 15: 84-86.
- [28] Meitinger D, Hunt DM, Shih DT, et al. Vitreous induced modulation of integrins in retinal pigment epithelial cells: Effects of fibroblast

- growth factor²²[J] . Exp Eye Res , 2001 , 73 :681 - 692.
- [29] Menko AS , Philip NJ . $\beta 1$ integrin in epithelial tissues : An unique distribution in the lens [J] . Exp Cell Res , 1995 , 218 :516 - 521.
- [30] 刘敬, 马志中, 曹利群, 等. 整合素 $\beta 1$ 在实验性兔视网膜脱离、复位的表达变化[J]. 中国康复理论与实践 2004 , 10 (5) :274 —275.
- [31] Pastor, et al. Am J Ophthalmol, 1998, 126 (4):550
- [32] Yang CS, et al. Arch Ophthalmol 1998, 116 (1):69
- [33] Mori K, Gehlbach P, Ando A, et al. Intraocular adenoviral vetromediated gene transfer in proliferative retinopathies[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43 (5): 1610
- [34] Wong CA, Jia W, Mafsubara JA, et al. Experimental gene therapy for an in vitro model of proliferative vitreoretinopathy[J]. Can J Ophthalmol, 1999, 34 (7): 379
- [35] 李建超, 彭清华, 赵海滨等 散血明目片抑制积血所致PVR的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002 , 8 (11) : 36 - 39
- [36] 彭清华, 喻京生, 曾明葵等. 活血通脉、利水明目法治疗玻璃体积血的临床研究[J]. 湖南中医学院学报, 2003, 23 (1): 39-42.
- [37] 彭清华, 李建超, 张琳. 散血明目片对兔玻璃体积血 IL-6 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志 2002, 12 (2) : 84-86
- [38] 李建超, 彭清华, 张琳. 散血明目片对兔玻璃体积血 TNF- α 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志 2003, 13 (1): 9-11
- [39] 彭清华, 魏为, 李建超. 活血利水法对外伤性实验性 PVR 模型兔玻璃体中 ICAM-1 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志 2005, 32 (3): 184-186
- [40] 陈吉, 彭清华, 邢雁飞等. 散血明目片对外伤性实验性 PVR 模型兔玻璃体中 CTGF 表达的影响[J] . 中国中医眼科杂志 2006, 16 (4): 224-227
- [41] 李建超, 彭清华, 张琳. 散血明目片对兔视网膜的保护性作用[J]. 中国中医眼科杂志 2002, 12 (4) :195-197.

附 图

以下各图，A 空白组，B 模型组，C 活血化瘀组，D 利水明目组，E 活血利水组



图 1 PVR 眼底照片



图 2 正常眼底照片



图 3 PVR 眼球实体照片

整合素- β_1 （免疫组化法）

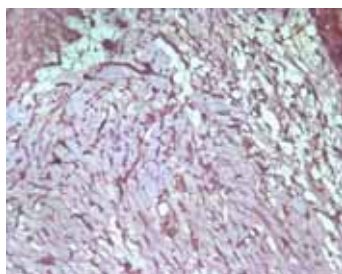


图 4 A 空白组

组织胞浆可见少量棕黄色颗粒，说明整合素 β_1 在正常视网膜组织中有表达，呈弱阳性。

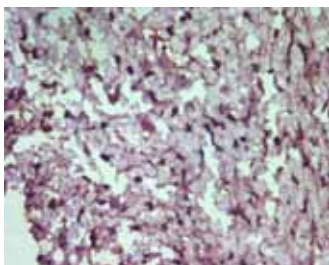


图 5 B 模型组

组织胞浆可见大量棕黄色颗粒，说明整合素 β_1 在增值膜上阳性表达显著增强，呈强阳性。

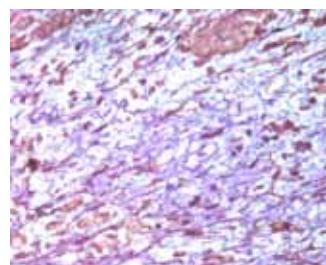


图 6 C 活血化瘀组

组织胞浆可见较多棕黄色颗粒，说明整合素 β_1 阳性表达程度明显较 B 组降低。

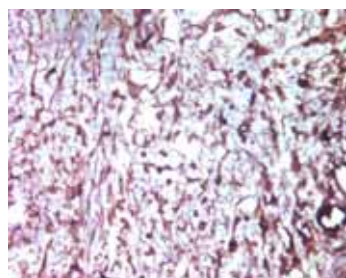


图 7 D 利水明目组

组织胞浆可见较多棕黄色颗粒，说明整合素 β_1 在该组阳性表达程度明显较 B 组降低。

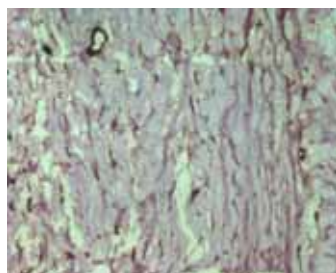


图 8 E 活血利水组

组织胞浆可见少量棕黄色颗粒，说明整合素 β_1 在该组阳性表达程度较 B、C、D 组显著降低，呈弱阳性。

EGFmRNA(原位杂交)

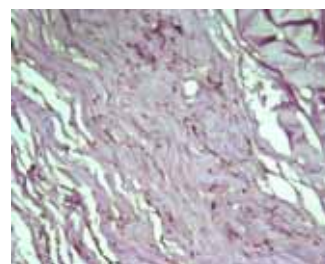


图 9 A 空白组

组织胞浆可见少量棕黄色颗粒，说明EGFmRNA在正常视网膜组织中有表达，呈弱阳性。

EGFmRNA（原位杂交法）

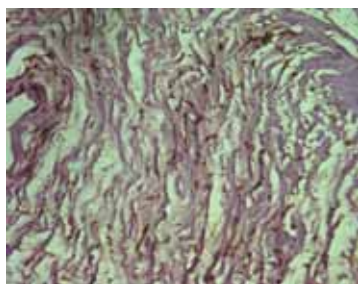


图 10 B 模型组

组织胞浆可见大量棕黄色颗粒，说明 EGFmRNA 在增殖膜上阳性表达显著增强，呈强阳性。

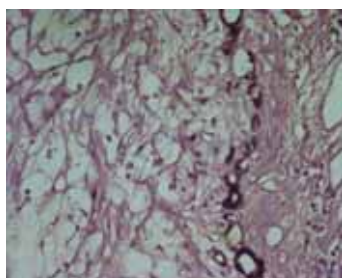


图 11 C 活血化瘀组

组织胞浆可见较多棕黄色颗粒，说明 EGFmRNA 阳性表达程度明显较 B 组降低。

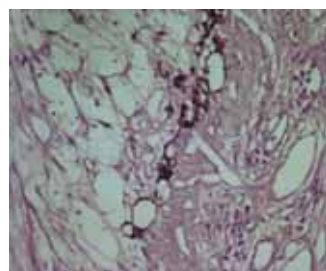


图 12 D 利水明目组

组织胞浆可见较多棕黄色颗粒，说明 EGFmRNA 在该组阳性表达程度明显较 B 组降低。

HE 染色

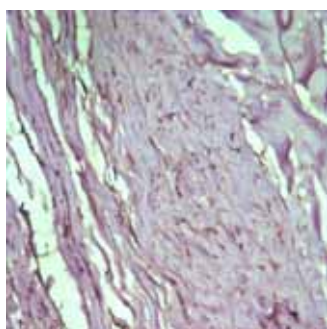


图 13 E 活血利水组

组织胞浆可见少量棕黄色颗粒，说明 EGFmRNA 在该组阳性表达程度较 B、C、D 组著降低，呈弱阳性。

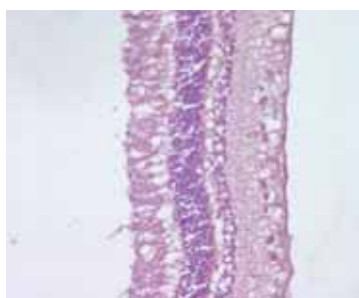


图 14 A 空白组

正常视网膜组织，各层细胞排列整齐。

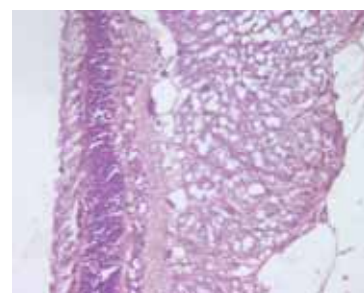


图 15 B 模型组

各组视网膜各层重度水肿，神经纤维层水肿呈气球状、筛网状可见大量增殖膜形成。

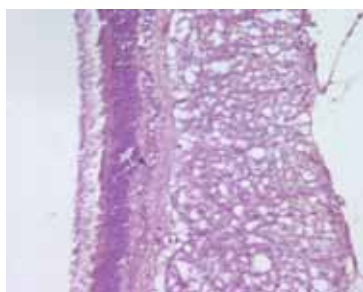


图 16 C 活血化瘀组

视网膜各层紊乱，局部神经纤维水肿，可见增殖膜

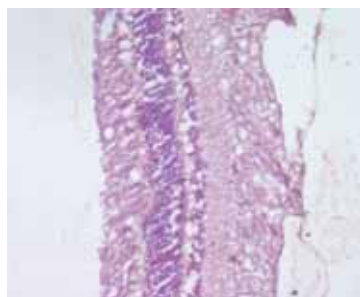


图 17 D 利水明目组

视网膜各层紊乱，可见薄层增殖膜

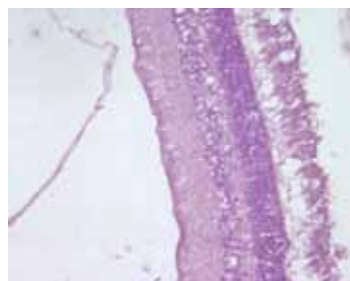


图 18 E 活血利水组

视网膜各层稍紊乱，细胞排列整齐，少许渗出物附着于内界膜。