

通脉糖眼明胶囊对老龄大鼠视网膜损伤的保护作用^Δ

朴春梅*, 屈相玲, 周训蓉[#](贵阳中医学院第二附属医院药学部, 贵阳 550003)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2200-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.12

摘要 目的:探讨通脉糖眼明胶囊对老龄大鼠视网膜损伤的保护作用。方法:将老龄大鼠(24月龄)随机分为通脉糖眼明胶囊高、中、低剂量组(1.750、0.875、0.378 g/kg)、阳性对照药组(羧苯磺酸钙胶囊,0.175 g/kg)和模型组,每组10只,ig给予相应的药物,每天1次,连续给药90 d。第90天给药结束时,另取1.5月龄大鼠10只作为空白对照组。将60只大鼠禁食不禁水12 h,股静脉取血,测定血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、微量还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平;取右眼球,以HE染色法观察视网膜病理变化,并对视网膜神经节细胞层(RCL)神经元进行计数。结果:与空白对照组比较,模型组大鼠血清中GSH-Px、GSH、SOD水平均降低,MDA水平升高,RCL神经元数为空白对照组大鼠的(59±4)%($P<0.05$ 或 $P<0.01$),视网膜有损伤;与模型组比较,阳性对照药组及通脉糖眼明胶囊各剂量组大鼠血清中GSH-Px、GSH、SOD水平均升高,MDA水平降低,RCL神经元数依次为空白对照组的(98±7)%、(69±5)%、(78±7)%、(95±6)%($P<0.05$ 或 $P<0.01$),视网膜损伤程度减轻。结论:通脉糖眼明胶囊能抑制老龄化诱导的视网膜脂质过氧化,并能阻止老龄大鼠视网膜神经元凋亡,对老龄化诱导损伤的大鼠视网膜有保护作用。

关键词 通脉糖眼明胶囊;老龄大鼠;视网膜损伤;抗氧化;视神经

Protective Effects of Tongmaitang Yanming Capsules on Retinal Damage of Aged Rats

PU Chunmei, QU Xiangling, ZHOU Xunrong (Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Guiyang College of TCM, Guiyang 550003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the protective effects of Tongmaitang yanming capsules on retinal damage of aged rats. METHODS: Aged rats (aged 24 months) were randomly divided into Tongmaitang yanming capsule high-dose, medium-dose and low-dose groups (1.750, 0.875, 0.378 g/kg), positive control drug group (Calcium dobesilate capsules, 0.175 g/kg) and model group, with 10 rats in each group. They were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 90 days. At the end of the 90th day, another 10 rats aged 1.5 months were included into blank control group. After medication, 60 rats were provided with water but no food for 12 hours. Blood sample was collected from femoral, and the serum levels of GSH-Px, GSH, SOD and MDA was determined, respectively; right eyes were sampled, pathological change of retina was observed by HE staining and the number of retinal cell layer (RCL) neurons was counted. RESULTS: Compared with blank control group, serum levels of GSH-Px, GSH and SOD decreased in model group, while MDA level increased; the number of RCL neurons was (59±4)% of blank control group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and retina damage was found. Compared with model group, the serum levels of GSH-Px, GSH and SOD increased in positive control drug group and Tongmaitang yanming capsule groups, while MDA level decreased; the number of RCL neurons in those groups were (98±7)%, (69±5)%, (78±7)% and (95±6)% of blank control group, respectively ($P<0.05$ or $P<0.01$); retina damage was relieved. CONCLUSIONS: Tongmaitang yanming capsules can inhibit aging-induced lipid peroxidation of rat retina, prevent the progressive loss of retina neurons and protect aging-induced retina damage of rats.

KEYWORDS Tongmaitang yanming capsules; Aged rat; Retina damage; Antioxidant activity; Retinal neuron

1048372.

[8] Eleftheriou P, Petrou A, Geronikaki A, *et al.* Prediction of enzyme inhibition and mode of inhibitory action based on calculation of distances between hydrogen bond donor/acceptor groups of the molecule and docking analysis: an application on the discovery of novel effective PTP1B in-

hibitors[J]. *SAR QSAR Environ Res*, 2015, 26(7/9):557.

[9] Yuan JQ, Wan JF. Cytotoxic phenolic glycosides from *Boschniakia himalaica*[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2012, 48(4):555.

[10] Zhou ZW, Yin S, Wang XN, *et al.* Two new lignan glycosides from *saussurea laniceps*[J]. *Helv Chim Acta*, 2007, 90(5):951.

[11] Kazuko Y, Hiroshi K, Yukiko K, *et al.* Neolignans and Phenylpropanoids from the rhizomes of *Coptis japonica* var. *dissecta*[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 43(4):578.

Δ 基金项目:贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(No.黔科合中药字[2011]5012号);贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2013204]4-6号);贵阳中医学院科研项目(No.[2010]40号)

* 副主任药师。研究方向:中药新药。E-mail: 2270617882@qq.com

通信作者:副主任药师。研究方向:中药新药。E-mail: 2398662779@qq.com

(收稿日期:2015-11-13 修回日期:2016-03-16)

(编辑:林静)

通脉糖眼明胶囊为贵阳中医学院第二附属医院的医院制剂,由黄芪、生地、丹参、三七、决明子、青箱子、茺蔚子、淡竹叶等8味药材组成,具有益气养阴、活血通络、明目退翳的作用,用于治疗糖尿病性视网膜病变,效果甚佳。前期研究结果表明,通脉糖眼明胶囊对糖尿病性视网膜病变大鼠具有良好的降糖、改善血液流变学、保护视网膜免受损伤等作用^[1]。为了进一步探讨通脉糖眼明胶囊对视网膜的保护作用,笔者拟研究通脉糖眼明胶囊对老龄大鼠视网膜的作用及抗氧化作用,揭示其抗老龄大鼠视网膜损伤的可能机制,为临床治疗老龄视网膜损伤及糖尿病性视网膜病变提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

AEROSSET2000 型全自动生化分析仪(美国雅培公司);ALC-210.3型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

通脉糖眼明胶囊(贵阳中医学院第二附属医院药剂科提供,批号:120406,规格:0.5 g/粒);羟苯磺酸钙胶囊(阳性对照药,奥地利利比威药品有限公司,批号:20120224,规格:0.5 g/粒);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒(批号:20120912)、微量还原型谷胱甘肽(GSH)测试盒(批号:20120915)、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号:20120911)、丙二醛(MDA)测试盒(批号:20120916)均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,♀♂各半,分别为24月龄(体质量450~650 g)和1.5月龄(体质量180~220 g)2种,由重庆市中药研究院实验动物研究所提供,合格证号:SCXK(渝)2012-0006。

2 方法^[2-4]

2.1 分组、给药与处理

取24月龄大鼠50只,♀♂各半,随机分成模型组及通脉糖眼明胶囊高、中、低剂量组(1.750、0.875、0.378 g/kg)、阳性对照药组(羟苯磺酸钙胶囊,0.175 g/kg),每组10只。ig给药,10 ml/kg,每日1次,连续90 d;模型组大鼠给予等容量的蒸馏水。通脉糖眼明胶囊用法用量为口服,每次5粒,每日3次,成人体质量按60 kg计算,则成人日用剂量为0.125 g/kg,大鼠高、中、低剂量分别相当于成人日用剂量的14、7、3.5倍;羟苯磺酸钙胶囊用法用量为口服,每次1粒,每日3次,大鼠用药剂量0.175 g/kg,相当于成人日用剂量的7倍。

末次给药后,大鼠禁食不禁水12 h,股静脉取血,1 000×g离心10 min,取上层血清于-20℃保存备用。处死大鼠,摘取右眼球,10%甲醛固定。

另取1.5月龄SD大鼠10只,♀♂各半,体质量180~220 g,设为空白对照组,同一时间同上法取材。

2.2 指标检测

2.2.1 血清中GSH-Px、GSH、SOD、MDA水平检测 取血清,按照GSH-Px、GSH、SOD、MDA测试盒说明书操作。

2.2.2 视网膜病理观察及神经节细胞层(RCL)神经元数检测

取甲醛固定的右眼球,经乙醇常规脱水,二甲苯透明后浸蜡包埋,连续4 μm厚切片,进行HE染色。每张切片随机选取3个视野,于显微镜下观察视网膜病理变化并对RCL神经元进行计数。计数方法:同一倍率下,记录视野中RCL长为160 μm(长度以标尺为准,平行于神经节细胞层方向)在任意区域

内的神经元数,取平均值,并与空白对照组计数相比得出RCL神经元数占比。

2.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件分析。计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性两样本间比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 通脉糖眼明胶囊对老龄大鼠脂质过氧化的影响

各组大鼠血清中GSH-Px、GSH、SOD、MDA水平检测结果见表1。

表1 各组大鼠血清中GSH-Px、GSH、SOD、MDA水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Serum levels of GSH-Px, GSH, SOD and MDA in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	GSH-Px, μmol/L	GSH, μmol/L	SOD, U/L	MDA, μmol/L
空白对照组	989.73 ± 151.38**	3.92 ± 1.02*	215.61 ± 16.24*	5.25 ± 1.62*
模型组	510.48 ± 25.32	2.62 ± 1.07	200.23 ± 12.62	6.89 ± 1.52
阳性对照药组	875.25 ± 93.15**	3.84 ± 1.21*	214.53 ± 13.53*	5.12 ± 1.36*
通脉糖眼明胶囊高剂量组	908.00 ± 60.07**	4.59 ± 1.20**	217.06 ± 15.62*	5.06 ± 1.12**
通脉糖眼明胶囊中剂量组	734.53 ± 101.75**	3.75 ± 0.64*	216.62 ± 9.74*	5.25 ± 1.09*
通脉糖眼明胶囊低剂量组	618.90 ± 76.93*	3.91 ± 1.42*	212.67 ± 1.04*	5.47 ± 1.14*

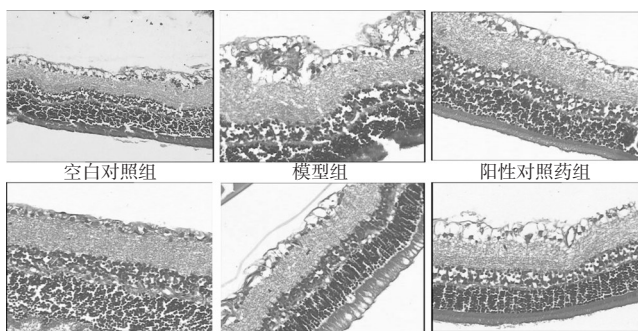
注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

从表1可见,与空白对照组比较,模型组大鼠血清中GSH-Px、GSH、SOD水平均显著降低,MDA水平显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明老龄大鼠脂质过氧化增强;与模型组比较,阳性对照药组及通脉糖眼明胶囊各剂量组大鼠血清中GSH-Px、GSH、SOD水平显著升高,MDA水平降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示通脉糖眼明胶囊长期应用能抑制老龄化诱导的大鼠血清脂质过氧化。

3.2 通脉糖眼明胶囊对老龄大鼠视网膜病理改变的影响

各组大鼠视网膜损伤病理图见图1;各组大鼠视网膜RCL神经元计数结果见表2。



通脉糖眼明胶囊高剂量组 通脉糖眼明胶囊中剂量组 通脉糖眼明胶囊低剂量组

图1 各组大鼠视网膜损伤病理图(HE, 10×10)

Fig 1 Pathology of retina damage in rats of each group(HE, 10×10)

如图1可见,空白对照组大鼠视网膜结构正常。模型组大鼠视网膜内核层以内各层均见不同程度水肿,其中RCL尤为明显;神经节细胞排列紊乱,细胞变性、坏死,呈明显不规则扩张;可见血管管壁增厚,但未见血管内血栓形成、出血以及血管瘤改变,表明老龄化可诱导视网膜损伤。与模型组比较,阳性对照药组视网膜基本正常。通脉糖眼明胶囊各剂量组与模

表2 各组大鼠视网膜RCL神经元数($\bar{x} \pm s, n=10$)Tab 2 The number of RCL neurons in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	RCL神经元数占比, %
模型组	59±4
阳性对照药组	98±7**
通脉糖眼明胶囊高剂量组	95±6**
通脉糖眼明胶囊中剂量组	78±7*
通脉糖眼明胶囊低剂量组	69±5*

注:与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

型组比较, 视网膜病理变化均有不同程度减轻, 且呈现一定的剂量依赖关系; 其中通脉糖眼明胶囊高剂量组大鼠视网膜结构与空白对照组比较, 其视网膜结构已经基本趋于正常, 提示通脉糖眼明胶囊长期应用对老龄化视网膜损伤大鼠具有保护作用。

从表2可见, 模型组大鼠视网膜RCL神经元数仅为空白对照组的59%。与模型组比较, 阳性对照药组大鼠视网膜RCL神经元数明显增加; 通脉糖眼明胶囊各剂量组RCL神经元数呈剂量依赖性增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 由此提示通脉糖眼明胶囊长期应用可能对老龄化视网膜损伤具有促进神经元再生作用。

4 讨论

糖尿病视网膜病变是一种眼部疾病, 其发生常常有细胞凋亡参与, 凋亡是视网膜细胞病变的共同通路。视网膜脱离后不久感光细胞即发生死亡, 所以即使在视网膜复位后视力往往也难以恢复。因此, 视力恢复往往取决于视网膜脱离时间的长短, 原因在于感光细胞在脱离后发生了凋亡。诱发凋亡的因素与氧化应激有关。视网膜在缺血、缺氧条件下, 自由基生成明显增加, 产生氧化应激反应, 从而引起细胞膜完整性的破坏, 刺激细胞凋亡, 导致内皮细胞和视网膜损害、周细胞凋亡及血眼屏障破坏^[6]。有研究显示, 视网膜病变患者存在氧化损伤, 表现为血清中抗氧化酶(SOD、GSH-Px)活性显著降低, 而MDA等氧化应激产物水平显著升高, 说明氧化应激与视网膜病变的发生明显相关。因此, 提高机体抗氧化系统的功能可能有利于视网膜病变的治疗与控制^[6]。同时, GSH是机体重要的自由基清除剂, 其能有效地清除生物氧化产生的自由基, 还可直接使自由基还原或促进SOD合成, 因而其水平高低可间接反映机体内氧化应激水平^[7]。

临床治疗糖尿病视网膜病变的常用药物为羟苯磺酸钙, 商品名为导升明, 1997及1998年分别载入欧洲和英国的药典; 我国于2001年引进该药, 用于糖尿病视网膜病变的防治^[8]。研究表明, 该药能促进微血管循环, 并通过抗氧化应激作用来防止糖尿病大鼠发生视网膜水肿, 从而保护糖尿病大鼠视网膜免受缺血再灌注所致的氧化损伤^[9]; 还可通过抗氧化作用来减少糖尿病大鼠视网膜白蛋白渗出, 降低毛细血管通透性, 抑制羧甲基-赖氨酸-糖基化终末产物的形成和血管内皮细胞生长因子的过度表达, 稳定血-视网膜屏障^[10], 故本实验选其为阳性对照药。

本实验结果显示, 老龄大鼠(27月龄)视网膜发生病理改变, 视网膜神经元大量凋亡, 体内脂质过氧化明显增强。通脉糖眼明胶囊长期应用(给药90 d)能明显减轻老龄大鼠视网膜病理损伤, 增加RCL神经元数, 具有抗老龄化视网膜神经元凋亡的作用; 其能升高老龄大鼠血清中GSH-Px、GSH、SOD水平, 降低MDA水平, 具有抗老龄化脂质过氧化作用, 其抗老龄化视网膜神经元凋亡及抗氧化作用与阳性对照药相当。这提示通脉糖眼明胶囊长期应用具有视网膜保护作用, 其可能通过抗氧化应激和调节机体氧化还原之间的失衡而发挥抗视网膜神经元凋亡、减轻周围神经功能损伤的作用, 从而改善视网膜病变, 故对老龄化视网膜病变具有较好的保护作用。

通脉糖眼明胶囊临床用于糖尿病性视网膜病变的治疗, 但其作用机制不明确。通过本研究观察其对老龄化视网膜损伤大鼠的抗氧化、保护视网膜的作用, 不但为扩大通脉糖眼明胶囊临床主治范围提供了实验依据, 也为后续深入研究其对视网膜病变的作用及其机制提供了参考。

参考文献

- [1] 朴春梅, 蒋玲, 屈相玲, 等. 通脉糖眼明胶囊对糖尿病视网膜病变模型大鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2012, 23(27): 2504.
- [2] 马晓星, 刘畅, 韩翠艳, 等. 益康药酒的抗衰老药理学实验研究[J]. 中国中医急症, 2010, 19(8): 1374.
- [3] 韦素珍, 黄艳莲, 陆贻逊, 等. 黄精提取液对老龄小鼠心、脑SOD和MDA含量的影响[J]. 中国医药导报, 2010, 7(9): 31.
- [4] 张效莉, 吴景东. 白藜芦醇对衰老小鼠GSH和抗超氧阴离子自由基含量变化的影响[J]. 中国美容医学, 2011, 20(4): 600.
- [5] Chen BH, Jiang DY, Tang LS. Advanced glycation end-products induce apoptosis involving the signaling pathways of oxidative stress in bovine retinal pericytes[J]. *Life Sci*, 2006, 79(11): 1040.
- [6] 陈文华, 郭欣, 邢燕, 等. 糖尿病及其视网膜病变患者氧化应激状态的评价[J]. 中国全科医学, 2010, 13(48): 1173.
- [7] 边秀娟, 王兴华. 加味黄芪桂枝五物汤对糖尿病周围神经病变模型大鼠血清MDA、GSH水平的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(1): 78.
- [8] 陈星华, 段贵生. 羟苯磺酸钙的临床应用进展[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(4): 593.
- [9] Szabo ME, Haines D, Garay E, et al. Antioxidant properties of calciumdobsilate in ischemic/reperfused diabetic rat retina[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 428(2): 277.
- [10] Rota R, Chiavaroli C, Garay RP, et al. Reduction of retinal albumin leakage by the antioxidant calcium dobesilate in streptozotocin-diabetic rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 495(2/3): 217.

(收稿日期: 2015-09-21 修回日期: 2016-01-11)

(编辑: 刘 萍)