

黄芪注射液对模拟高海拔缺氧大鼠视网膜的影响

潘星¹, 张文芳¹, 刘勤², 张书², 白惠玲², 贾茜钰²

基金项目: 甘肃省中医药管理局科研项目 (No. GZK-2015-61)
作者单位: ¹(730030) 中国甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院眼科; ²(730000) 中国甘肃省兰州市, 甘肃省人民医院眼科
作者简介: 潘星, 硕士研究生, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 张文芳, 毕业于北京大学, 博士, 主任医师, 副院长, 研究方向: 眼底病. zhwenf888@163.com; 刘勤, 毕业于兰州大学, 学士, 主任医师, 眼科主任, 研究方向: 眼表疾病. summliu@126.com
收稿日期: 2017-06-14 **修回日期:** 2018-02-01

Influence of astragalus injection on retina of simulated high altitude hypoxia rat

Xing Pan¹, Wen - Fang Zhang¹, Qin Liu², Shu Zhang², Hui-Ling Bai², Xi-Yu Jia²

Foundation item: The Scientific Research Project of Administration of Traditional Chinese Medicine in Gansu Province (NO. GZK - 2015-61)

¹Department of Ophthalmology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China; ²Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Wen - Fang Zhang. Department of Ophthalmology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. zhwenf888@163.com; Qin Liu. Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. summliu@126.com

Received: 2017-06-14 Accepted: 2018-02-01

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of astragalus injection on the metabolic and pathological changes of the retinal free radical metabolism and pathology in high-altitude hypoxic rats.

• **METHODS:** Sixty healthy SD rats without any eye disease were selected, and the random grouping method was divided into two groups: astragalus injection group (intervention group) and physiological saline group (control group), each group of 30 rats. In each group, 6 were randomly selected for injection of astragalus injection (15mL/kg) and physiological saline (15mL/kg) in the pre-simulated chamber. The rats were sacrificed immediately and removed the eyeballs after the rats were taken out of the simulated module. We observed the changes of retinal morphology with the HE staining method, and determine the retinal SOD and MDA content with colorimetry.

• **RESULTS:** HE staining showed no morphological

changes in the two groups of retinas at 2h, and as the time of hypoxia was prolonged, the retinal edema gradually increased, but the intervention group was less edema than the control group. The activity of SOD in both groups decreased with the increase of anoxia time of high altitude, and the comparison of different time points in the group was statistically significant ($P < 0.05$). The content of MDA in both groups increased gradually, and the comparison between different time points in the group was statistically significant ($P < 0.05$). The SOD in the two groups of retinas was significantly different at same time point ($P < 0.05$), except for at 2h without statistical significance. The MDA showed the same situation as SOD.

• **CONCLUSION:** Astragalus injection can reduce the damage degree of retinopathy in rats under the high altitude hypoxia environment, that the mechanism may be related to free radicals, enhance the activity of SOD, reduce the MDA content of lipid peroxides, and enhance antioxidant capacity.

• **KEYWORDS:** astragalus injection; high - altitude hypoxia; retina; SOD; MDA

Citation: Pan X, Zhang WF, Liu Q, *et al.* Influence of astragalus injection on retina of simulated high altitude hypoxia rat. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(3):434-437

摘要

目的: 探究黄芪注射液对模拟高海拔缺氧大鼠视网膜自由基代谢及病理学形态改变的影响。

方法: 选取 60 只健康不伴有眼疾的 SD 大鼠, 依照随机分组法分为黄芪注射液组 (干预组) 与生理盐水组 (对照组), 每组各 30 只。每组大鼠中, 随机各选取 6 只于放入模拟舱前分别腹腔注射黄芪注射液 (15mL/kg) 与生理盐水 (15mL/kg)。注射完 30min 之后放入 5 000m 的模拟舱, 分别生存 2、6、8、12、24h。出舱后立即处死并摘除眼球, 用 HE 染色法观察视网膜形态的改变, 比色法测定视网膜 SOD 和 MDA 含量。

结果: HE 染色示 2h 时两组视网膜均无形态学改变, 随着缺氧时间延长, 视网膜各层水肿逐渐加剧, 但干预组水肿程度低于对照组。随高海拔缺氧时间的延长, 两组 SOD 活性均下降, 组内不同时间点比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组 MDA 的含量均逐渐升高, 组内不同时间点比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组 SOD 活性在同时间点进行比较, 除 2h 无统计学意义, 其余时间点差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 同时点两组 MDA 含量进行比较, 除 2h 差异无统计学意义, 其余时间点差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论:黄芪注射液可以改善高海拔缺氧环境下大鼠视网膜病变的损伤程度,其机制可能与清除自由基、增强 SOD 的活性,减少脂质过氧化物 MDA 的含量、增强抗氧化能力有关。

关键词:黄芪注射液;高海拔缺氧;视网膜;SOD;MDA

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.3.07

引用:潘星,张文芳,刘勤,等.黄芪注射液对模拟高海拔缺氧大鼠视网膜的影响.国际眼科杂志 2018;18(3):434-437

0 引言

高原环境极易发生缺氧,视网膜组织属于神经系统的一部分,是脑组织的分类,视网膜与中枢神经系统紧密相连,一旦中枢神经系统缺氧,视网膜组织就会缺氧,随之形成高海拔视网膜病变(high altitude retinopathy, HAR)。超氧化物歧化酶(SOD)是机体内氧自由基清除系统中最为重要的一员,也是细胞氧化应激中的防御屏障,它的缺乏会破坏视网膜色素上皮细胞的完整性^[1-2]。丙二醛(MDA)是增多的氧自由基逐步攻击生物膜的不饱和脂肪酸,脂质过氧化反应随之增强,进而形成的终产物,它主要破坏细胞膜结构,造成细胞水肿,还会影响血管的通透性。已有报道黄芪具有利尿消肿、增强免疫力、增强心肌收缩力、降低自由基的生成并且加快自由基的消除等作用。但黄芪对于 HAR 的干预作用的报道依然少见,因此,我们建立模拟高海拔缺氧大鼠视网膜的模型,来探讨黄芪注射液对模拟高海拔缺氧大鼠视网膜组织结构及 SOD 活性与 MDA 含量的影响,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取健康不伴有疾病的 SD 大鼠 60 只,雌雄不限,于兰州大学医学院动物中心购买,体质量 220 ~ 250g,采用随机分组法将 60 只 SD 大鼠分为黄芪注射液组(干预组)和生理盐水组(对照组),每组各 30 只,随机各自选取 6 只于放入模拟舱前 30min 分别腹腔注射 15mL/kg(黄芪注射液给人肌肉注射有效量是 2.5mL,依据不同种属动物和人有效剂量的差异表:0.25kg 的大鼠每天剂量约为 20mg/kg,成人每天剂量约为 3mg/kg,则大鼠约为成人的 6 倍,2.5mL×6=15mL)黄芪注射液(国药准字 Z13020999,产品批号 14101381)、生理盐水(15mL/kg)。注射完 30min 之后放入 5 000m(氧分压 11.3kPa)的模拟舱(山东潍坊华信氧业有限公司),分别生存 2、6、8、12、24h。SOD 试剂盒与 MDA 试剂盒的生产厂家均为南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色 当各组大鼠在舱内生存到设定实验时间后,出舱并选用颈椎脱臼法处死大鼠,立即摘除大鼠的眼球,随机选取一只大鼠的双眼投入 4% 多聚甲醛中固定 24h,之后依次放入低浓度至高浓度的酒精中脱水,石蜡包埋、待冷却后连续切片,厚度约 3 μ m,烘干后脱蜡水化,作 HE 染色并编号,于光学显微镜下观察大鼠视网膜形态的变化。

1.2.2 SOD 与 MDA 测量 摘除大鼠眼球后,于冰生理盐水中,沿角巩膜缘使用眼科剪剔除眼前节包括晶状体,在显微镜下剥离视网膜,用微量分析天平称取视网膜的

湿重,以预冷的双蒸水为匀浆介质配成 2% 的湿重,放入玻璃匀浆器中进行匀浆(匀浆环境必须保持冰环境),匀浆数分钟后,将匀浆液倒入离心管中,放入低温离心机中,转速选取 3000r/min,时间为 15min,之后取上清液测定蛋白浓度、SOD 以及 MDA。SOD 测定方法为黄嘌呤氧化酶法:依据试剂盒说明书中的步骤与方法,先配制好所需的应用液及显色剂,分组分成测定管和对照管,之后按顺序依次加入所需试剂,混匀,恒温水浴箱放置 40min,之后两组分别加入显色剂,混匀,于室温放置 10min,使用分光光度计,于波长 550nm 处,测定吸光度 OD 数值,代入公式计算 SOD 含量。MDA 测定方法为硫代巴比妥酸(TBA)法:根据试剂盒说明书中的步骤与方法,首先配制所需的试剂,分成空白管、标准管、测定管、对照管四组,按顺序加入各组所需试剂,混匀,沸水浴,取上清液,使用分光光度计,于波长 532nm 处,测定 OD 数值,代入公式计算 MDA 含量。

统计学分析:数据采用 SPSS 21.0 分析。所得到的实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示,组间及组内比较采用 *t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果 模拟海拔高度 5 000m(氧分压为 11.3kPa)时间为 2h 时,生理盐水组大鼠视网膜无明显病理改变(图 1A),6h 时视网膜组织出现病理变化,神经节细胞层(RGC)和内丛状层(IPL)开始出现水肿,组织疏松(图 1B),随着缺氧时间延长至 8h 时视网膜各层均疏松水肿(图 1C),12h 时 RGC 及内核层(INL)水肿更加明显(图 1D),24h 时视网膜神经节细胞层(RGC)已经出现核固缩,细胞排列紊乱,无规则,形态也不规整(图 1E),且视网膜组织厚度随着缺氧时间的延长而增厚。给予黄芪注射液组,当缺氧时间为 2h 时,大鼠视网膜也未见明显病理变化(图 1F),当缺氧时间为 6h 时视网膜组织疏松且开始出现水肿,神经节细胞层(RGC)和内丛状层(IPL)水肿明显,视网膜厚度也较前增加(图 1G),随着缺氧时间延长至 8h 视网膜组织水肿程度进一步加剧(图 1H),12h 时视网膜神经节细胞层(RGC)及内核层(INL)水肿程度亦更加明显(图 1I),至 24h 时视网膜神经节细胞层(RGC)出现了核固缩表现,内核层(INL)细胞排列无规则,形态不完整(图 1J),视网膜组织厚度更加增大。但是黄芪注射液组各时间段视网膜改变与生理盐水组相比,组织水肿程度、厚度等改变均较轻。

2.2 SOD 与 MDA 结果 实验数据符合正态性分布,随着实验设计高海拔缺氧时间的不同,对于 SOD 活性的测定中,黄芪组和生理盐水组均随着时间的延长 SOD 的活性降低,黄芪组和生理盐水组分别在同时间点比较发现:除 2h 外,6、8、12、24h 两组均具有统计学意义($P<0.05$)。对生理盐水组和黄芪组分别进行组内两两不同时间点的比较发现,差异均具有统计学意义($P<0.05$,表 1,图 2)。在对 MDA 含量的测定中发现,随着高海拔缺氧时间的延长,黄芪组和生理盐水组 MDA 含量均升高。对于两组在同时间点的比较中发现:除 2h 外,6、8、12、24h 两组均具有统计学意义($P<0.05$)。对生理盐水组和黄芪组分别进行组内不同时间点两两比较发现,差异均具有统计学意义($P<0.05$,表 2,图 3)。

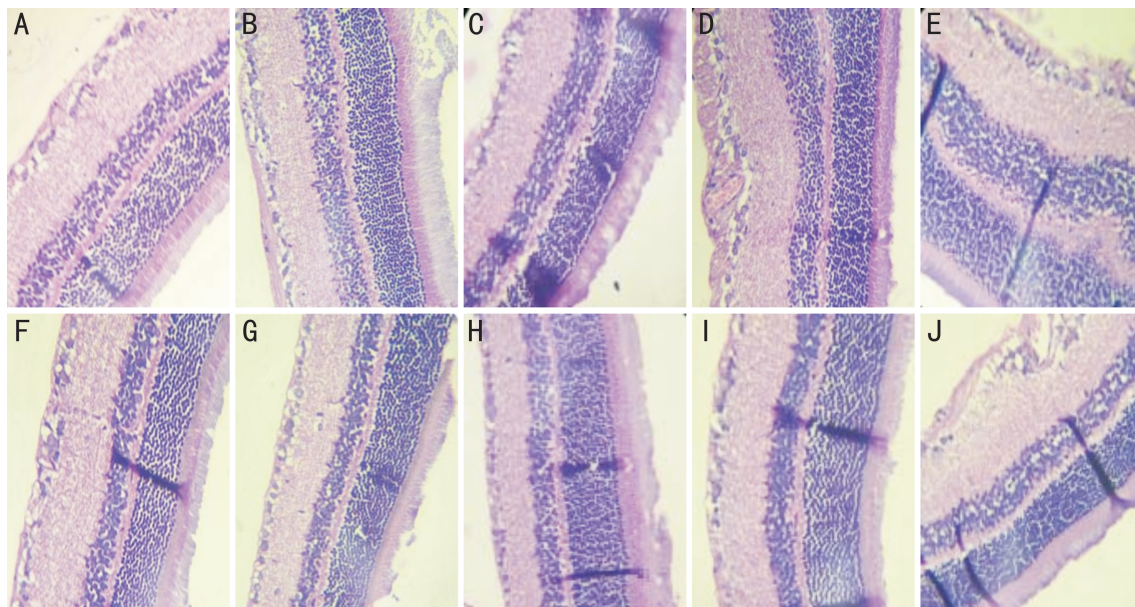


图1 对照组及干预组模拟高海拔缺氧不同时间点大鼠视网膜组织病理图片(HE×400) A:对照组 2h;B:对照组 6h;C:对照组 8h;D:对照组 12h;E:对照组 24h;F:干预组 2h;G:干预组 6h;H:干预组 8h;I:干预组 12h;J:干预组 24h。

表1 不同时间两组视网膜 SOD 活性测定 ($\bar{x} \pm s, U/mgprot$)

时间	黄芪组	生理盐水组	t	P
2h	156.69±2.34	155.78±2.83	2.901	0.59
6h	152.11±0.98	145.75±1.93	6.578	<0.01
8h	141.29±1.21	136.92±1.17	5.796	<0.01
12h	132.49±1.17	128.49±2.25	3.533	0.008
24h	125.19±1.26	121.87±2.24	2.901	0.02

表2 不同时间两组视网膜 MDA 含量测定 ($\bar{x} \pm s, nmol/mgprot$)

时间	生理盐水组	黄芪组	t	P
2h	5.71±1.15	5.52±1.1	2.281	0.52
6h	6.10±1.23	5.69±1.08	6.020	<0.01
8h	6.40±0.17	6.12±1.06	5.776	<0.01
12h	6.64±0.82	6.47±0.87	3.460	0.009
24h	6.89±1.12	6.66±0.99	4.028	0.004

3 讨论

高原因其独特的环境:低压低氧、紫外线强、昼夜温差大等特点形成了有着独特地域特色的高原疾病。其中低压低氧是对进入高原环境后的人们进行考验的最重要问题。一旦组织得不到充足的氧或者无法利用足够氧时,组织的代谢过程及形态结构等方面会发生一系列改变,此病理过程即为缺氧^[3]。研究指出网状层是视网膜组织内部的高代谢区域,由深层的毛细血管为其供氧,由于视网膜本身血管稀少,且又是消耗氧的高代谢区,因此视网膜内部接收氧,进行氧代谢极易受到影响,这也是视网膜容易发生缺氧并形成病变的原因^[4]。Alon 等^[5]的研究表明,缺氧会引起视网膜血管内皮细胞选择性凋亡,诱导血管闭塞,使得视网膜氧化应激反应增加。本实验是模拟高海拔急性缺氧,探究黄芪对短时间 HAR 的改善程度,2、6、8、12、24h 时间点的选取参考贾茜钰等^[6]文献。对于高海拔缺氧所造成的 HAR,在分子学生物机制、能量代谢机制等方面都已经有所探究,本实验是从自由基与抗氧化系统来探究 HAR。

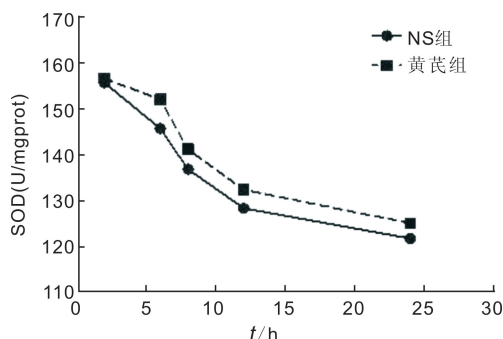


图2 模拟高海拔缺氧不同时间点两组大鼠视网膜 SOD 含量变化。

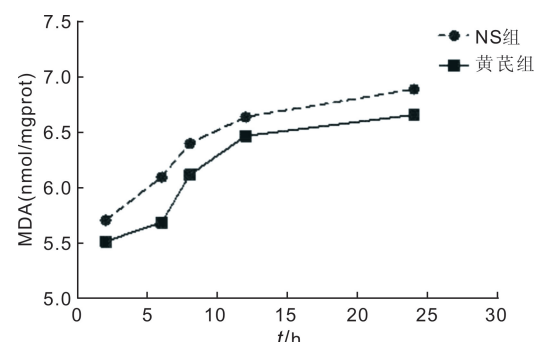


图3 模拟高海拔缺氧不同时间点大鼠视网膜 MDA 活性变化。

从 HE 染色结果中我们发现在高海拔缺氧早期,对照组 2h 时大鼠视网膜无明显变化,缺氧 6h 时视网膜神经节细胞和内丛状层细胞水肿,视网膜厚度较前增加,随缺氧时间延长至 8h 视网膜各层水肿均增加,当大鼠生存 12h 时视网膜神经节细胞层及内核层水肿反应更为明显,24h 可见视网膜神经节细胞层出现核固缩,内核层细胞排列紊乱。干预组视网膜形态变化与对照组类似,但水肿程度低于对照组。

视网膜组织是眼睛的多层感觉组织之一,富含各种不饱和脂肪酸,其对于脂质过氧化物和活性氧非常敏感^[7]。自由基活性增强与抗氧化能力的下降是视网膜病变发生

的重要因素之一。赵奎卿等^[8]实验研究也证实,氧稳态难以在缺氧视网膜组织中维持,随着缺血缺氧进一步加剧,SOD的活性降低,诱发细胞产生一些因子,促进其凋亡。缺氧环境下,氧可以还原为 O_2^- 自由基,自由基所引发的一系列连锁反应使脂质过氧反应增强,产物MDA生成增多,使得视网膜损伤更加严重。SOD被形象地比喻为人体内的垃圾清道夫,它在体内的作用机制是:第一步通过歧化反应,催化 O_2^- ,生成 H_2O_2 和 O_2 ;第二步是在过氧化氢酶(CAT)或者谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的作用下,将上一步生成的 H_2O_2 最终分解为无毒的 H_2O 和 O_2 ^[9]。MDA作为一种脂质过氧化的终产物,它是因为氧自由基逐步攻击了生物膜不饱和脂肪酸,脂质过氧化反应增强,其含量也随之增强。MDA主要是对细胞的膜结构造成损伤,因此,测定SOD与MDA可以进一步评估机体自由基的代谢情况,也是进一步评估缺氧对机体造成损伤的重要指标^[10]。已有文献报道在高原低压低氧的环境下,机体的抗氧化能力会降低,氧自由基增多,而抗氧化酶的活性却降低,连锁反应后脂质过氧化物增加^[11]。本实验中也发现随着缺氧时间的延长,生理盐水组和黄芪组的SOD活性均逐渐下降,MDA的含量均逐渐上升,组内两两时间点进行比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。此结果与赵善民等^[12]的研究结果相符,进一步说明随着缺氧时间的延长,自由基含量会逐渐增加,而且脂质过氧化物的含量也会增加。

黄芪作为一种中国本土草药,历史久远,中医认为它具有抗毒排脓、补气固表、益气升阳等功效。西医认为它具有利尿消肿、增强免疫力、增强心肌收缩力、降低自由基的生成并且加快自由基的消除等作用,且被现代药理学认为是一种天然并且效果显著的抗氧化剂^[13]。其主要成分包括:皂苷、黄酮、多糖、生物碱及氨基酸等。国外研究报告,在对新生鼠心肌缺氧-复氧的模型中发现,给予黄芪甲苷IV预处理,发现黄芪甲苷IV能够有效增加缺氧细胞的生存能力,机制与降低活性氧的生成与线粒体膜电位的损失,增加抗氧化酶SOD活性,降低MDA含量,减少磷酸肌酸激酶(CPK)和乳酸脱氢酶(LDH)的活性有关^[14]。在凌洪峰等^[15]的研究中指出:对黄芪多糖进行实验探究,发现其也可以明显提高SOD、CAT、GPX的活性,与此同时又将存在于血浆、脑匀浆以及肝匀浆中过氧化脂质(lipid peroxide, LPO)的水平进一步降低,提示黄芪多糖对于抗氧化有着一定的作用。处于5000m海拔高度的条件下,探究黄芪对耐缺氧的实验中发现,给予黄芪干预组的大鼠耐缺氧时间长,SOD的活性会升高,MDA含量下降,提示黄芪具有清除活性氧,发挥抗氧化的作用^[16]。高旭等^[17]在探究黄芪多糖与小鼠氧化应激能力的关系中发现,黄芪多糖可以通过使SOD活性的增强与MDA含量的降低,使得小鼠耐缺氧时间与能力提高,抗疲劳能力也提高,说明黄芪多糖可以增强机体抗氧化能力。本实验中,我们也发现除2h以外,其余时间点黄芪注射液组SOD活性均高于生理盐水组,MDA含量均低于生理盐水组,且两组比较均具有统计学意义($P < 0.05$),这与其它研究所做的黄芪对于缺血缺氧的实验结果相符合。2h组无意义其原因可能

是由于初始缺氧,视网膜组织内所形成的自由基能够被自身所含的SOD所清除,所以不需要药物的干预促进作用。

本实验利用模拟高原环境5000m时,黄芪注射液对大鼠视网膜自由基代谢及病理学形态改变的影响,从而为中药黄芪预防高原性缺氧疾病提供了思路与支持。实验未设置无缺氧处理组,这也是此实验不足之处,且HAR机制复杂,我们探讨的只是一个方面,后续可以从其他方面探究,还可以延长缺氧时间,进一步探究黄芪注射液是否依然具有保护作用。

参考文献

- 1 Imamura Y, Noda S, Hashizume K, et al. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(30):11282-11287
- 2 Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Bioph Meth* 2005; 65(2-3): 45-80
- 3 Oltmanns KM, Gehring H, Rudolf S, et al. Persistent suppression of resting energy expenditure after acute hypoxia. *Metabolism* 2006; 55(5): 669-675
- 4 Yu DY, Cringle SJ. Outer retinal anoxia during dark adaptation is not a general property of mammalian retinas. *Comp Biochem Physiol C* 2002; 132(1):47-52
- 5 Alon T, Hemo I, Itin A, et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1(10):1024-1032
- 6 贾茜钰,刘勤,张书,等. 黄芪注射液对模拟高原缺氧环境大鼠视网膜缺氧诱导因子-1 α 、p53表达的影响. *中华眼底病杂志* 2016; 32(4):423-427
- 7 江红,杨玉芝,段滨红,等. 黄芪对糖尿病视网膜病变患者氧化应激水平的影响. *黑龙江医药* 2011; 24(6):960-962
- 8 赵奎卿,贺经. 黄芪对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的影响. *国际眼科杂志* 2006; 6(5):1042-1044
- 9 Yang T, Shioda M, Kasahara S, et al. A facilitated electron transfer of copper-zinc superoxide dismutase (SOD) based on a cysteine-bridged SOD electrode. *BBA-Gen Subjects* 2002; 1569(3):151-158
- 10 刘文冲,孙晓莉,季乐乐,等. 一种抗心肌缺血/再灌注损伤的新化合物的合成及心肌保护作用研究. *药学报* 2009; 44(3):321-326
- 11 张伟,张昱. 不同海拔地区小鼠氧自由基的改变. *青海医学院学报* 2004; 25(3):178-179
- 12 赵善民,何显教,黄丽娟,等. 急性低氧对家兔血浆SOD、MDA、NO和红细胞ATP的影响. *临床和实验医学杂志* 2003; 2(3):155-157
- 13 张金国,高东升,魏广和,等. 黄芪注射液对急性心肌梗死早期患者左室重塑及心功能的影响. *中国中西医结合杂志* 2002; 22(5):346-348
- 14 Huang H, Lai S, Wan Q, et al. Astragaloside IV protects cardiomyocytes from anoxia/reoxygenation injury by upregulating the expression of Hes1 protein. *Can J Physiol Pharm* 2015; 94(5):1-39
- 15 凌洪峰,苏丹,曹洋. 黄芪多糖抗氧化作用研究. *医学理论与实践* 2005; 18(8):872-874
- 16 Gang Z, Si-Min Z, Shan-Jun Z, et al. Astragalus on the anti-fatigue effect in hypoxic mice. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(8):14030-14035
- 17 高旭,李丽芬,刘斌钰. 黄芪多糖对小鼠应激能力和自由基代谢的影响. *中国预防医学杂志* 2010; 11(2):120-121