

渴络欣胶囊对缺氧诱导视网膜血管新生的抑制作用

胡金芳¹, 王玮², 吴建明², 申秀萍¹, 柯潇², 高小平^{2*}

(1. 天津药物研究院 新药评价中心, 天津 300193;
2. 成都康弘药业集团 国家认定企业技术中心, 成都 610036)

[摘要] 目的: 观察渴络欣胶囊对缺氧诱导视网膜血管新生的抑制作用。方法: 采用人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 开展体外研究, 将低、中、高质量浓度渴络欣 (5, 10, 20 mg·L⁻¹) 预处理细胞 24 h 后以 150 μmol·L⁻¹ CoCl₂ 诱导, 24 h 后 ELISA 检测细胞培养上清中血管内皮生长因子 (VEGF) 浓度, 蛋白免疫印迹检测缺氧诱导因子 1-α (HIF1-α) 蛋白水平, RT-qPCR 检测 VEGF, HIF1-α mRNA 表达变化。体内实验采用 60 只 C₅₇BL/6J 新生乳鼠随机分为 6 组: 正常组, 缺氧诱导视网膜病变 (OIR) 模型组, 多贝斯组和渴络欣低、中、高剂量组。正常组饲养于正常空气环境, 其余各组幼鼠于 7 日龄时置于氧体积分数为 75% ± 2% 的高氧环境中连续生活 5 d, 然后放回正常空气环境中饲养以建立 OIR 模型, 多贝斯组每日 ig 0.5 g·kg⁻¹ 多贝斯胶囊内容物, 渴络欣低、中、高剂量组分别每日 ig 0.5, 1.0, 2.0 g·kg⁻¹ 渴络欣胶囊内容物, 给药 5 d 后麻醉处死小鼠, 摘除右眼球制备视网膜组织切片, HE 染色后计数突破内界膜内皮细胞核数, 左眼视网膜铺片 ADP 酶染色观察视网膜血管形态学改变。结果: 体外结果显示, CoCl₂ 模型组 VEGF 分泌量、mRNA 表达量和 HIF1-α 蛋白水平均显著高于空白组 ($P < 0.001$), 而中、高浓度渴络欣处理后均显著低于模型组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 体内结果显示, 渴络欣不同剂量组与模型组比较视网膜无灌注区明显减少, 血管迂曲、扩张和变形程度减轻, 视网膜血管累计吸光度 (A) 和突破内界膜内皮细胞核数均显著低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 渴络欣胶囊可抑制缺氧诱导视网膜 VEGF 表达及血管新生。

[关键词] 渴络欣胶囊; 血管内皮生长因子; 视网膜新生血管; 缺氧诱导因子 1-α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0156-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100156

Inhibitory Effects of Keluoxin Capsule on Hypoxia-induced Angiogenesis in Retina

HU Jin-fang¹, WANG Wei², WU Jian-ming², SHEN Xiu-ping¹, KE Xiao², GAO Xiao-ping^{2*}

(1. Center of Evaluation for Drug Safety, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;
2. State-certified Enterprise Technology Center, Chengdu Kanghong Pharmaceuticals Group, Chengdu 610036, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Keluoxin capsule on hypoxia-induced angiogenesis in retina. **Method:** *In vitro*, cultured ARPE-19 was pretreated with 5, 10, 20 mg·L⁻¹ Keluoxin for 24 hours, before 150 μmol·L⁻¹ CoCl₂ treatment for 24 hours, ELISA and Western blotting were used to detected the level of vascular endothelia growth factor (VEGF) and hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1-α), expressions of VEGF and HIF1-α mRNA were measured by real-time PCR. *In vivo*, sixty C₅₇BL/6J mice were randomly divided into six groups as follows: control group, retinopathy (OIR) model group, calcium dobesilate group and Keluoxin groups. In control group, mice were raised in regular air environments. The fifty mice were fed under the environment with 75% ± 2% oxygen for five days and then returned to normal air to establish OIR model. The 0.5 g·kg⁻¹ calcium

[收稿日期] 20131119(021)

[基金项目] 四川省科技支撑计划项目(2010SZ0261)

[第一作者] 胡金芳, 硕士, 副研究员, 从事药理毒理研究工作, Tel: 022-84845247, E-mail: hujf@tjpr.com

[通讯作者] * 高小平, 博士, 研究员, 从事新药筛选及分子药理学研究, Tel: 028-87519304, E-mail: ga Xiaoping@cnkh.com

dobesilate was administered by gavage feeding once daily in calcium dobesilate group, and 0.5, 1.0, 2.0 g·kg⁻¹ Keluoxin were gavaged as low, middle and high dosage Keluoxin groups respectively. Five days later, the mice were sacrificed using excessive anesthesia method and the retinal sections were prepared for the calculation of the number of endothelial cell nuclei broken retinal inner membrane after hemotoxylin and eosin staining. The morphologic changes of retinal vessels were observed after ADPase staining. **Result:** The VEGF secretion, mRNA expression of VEGF and HIF1- α of CoCl₂ group were significantly higher than control group ($P < 0.001$), and those were decreased by 10, 20 mg·L⁻¹ Keluoxin remarkably ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). *In vivo*, there was a obvious reduction in expansion, deformation and A value of vascular in Keluoxin groups compared with OIR model group, and the number of cell nuclei broken the inner limiting membrane had decreased in Keluoxin groups ($P < 0.01$) significantly. **Conclusion:** Keluoxin capsule can inhibit hypoxia-induced VEGF secretion and neovascularization in retina.

[**Key words**] Keluoxin capsule; VEGF; retinal neovascularization; HIF1- α

渴络欣胶囊是国内首个用于治疗糖尿病肾病的中草药复方制剂,具有益气养阴,活血化瘀的功效,其主要成分包括大黄、水蛭、黄芪、女贞子、太子参和枸杞子。研究发现,加减大黄蛭虫丸能抑制视网膜色素上皮细胞增殖以及血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达^[1],大黄素能通过阻断 VEGF 受体磷酸化抑制血管新生^[2];水蛭提取物可减少 RF/6A 细胞(猴脉络膜-视网膜内皮细胞)VEGF 受体表达^[3],其活性成分水蛭素也能抑制荷瘤小鼠肿瘤组织 VEGF 表达^[4];黄芪可抑制视网膜周细胞凋亡和氧化应激反应^[5-6],而后两者是视网膜新生血管形成的重要因素^[7-8]。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是由糖尿病引起的微血管病变,DR 患者视网膜在缺氧环境下可分泌大量 VEGF 促进血管新生,新生血管容易破裂并反复出血,严重影响患者视力甚至导致失明,因此如何控制血管新生是 DR 预防和治疗的关键。本文拟观察渴络欣胶囊对 CoCl₂ 模拟缺氧诱导人视网膜色素上皮细胞生成 VEGF 的抑制作用,并以氧诱导视网膜病变(OIR)为基础构建视网膜新生血管模型,观察渴络欣胶囊对 OIR 小鼠血管新生的影响。

1 材料

1.1 细胞 人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)购自 ATCC(批号 60279299),用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养于含体积分数 5% CO₂、37 °C 的培养箱。

1.2 动物 7 日龄 SPF 级 C₅₇BL/6J 乳鼠 60 只,雌雄不限,与哺乳母鼠共同饲养,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物生产许可证号 SCXK(京)2009-0004,动物质量合格证号 0209896。

1.3 试剂 渴络欣胶囊(成都康弘制药有限公司,

批号 100101),DMEM/F12 基础培养基(Gibco,批号 8113V01),胎牛血清(Gibco,批号 1376154),人 VEGF 检测试剂盒(R&D 公司,批号 303421),兔抗 HIF1- α 单克隆抗体(Abcam,批号 GR80143-3),TRIZOL Reagent(Invitrogen 公司,批号 66011),SYBR Premix Ex Taq™(批号 AK3001),反转录试剂盒(批号 AK1802)均为 TaKaRa 公司,CCK-8 试剂盒(日本同仁化工,批号 ES781),多贝斯(西安利君制药有限公司,批号 1006093-2),ADP Na₂(Sigma 公司,批号 A2754)。

1.4 仪器 SpectraMax M5 型多功能酶标仪(Molecular Devices 公司),Opticon 3 型实时荧光定量 PCR 仪(MJ Research 公司),凝胶成像系统(Bio Rad 公司),DP71 型病理显微摄影机(Olympus 公司),RM-2135 型自动切片机(Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞处理与 VEGF 含量检测 ARPE-19 细胞用 DMEM/F12 无血清培养基饥饿 24 h 后分为 5 组:渴络欣低、中、高剂量组分别用 5, 10, 20 mg·L⁻¹ 渴络欣胶囊内容物(去除辅料)预处理 24 h 后加入 150 μ mol·L⁻¹ CoCl₂ 诱导 24 h,CoCl₂ 模型组以生理盐水代替药物进行预处理,同时空白对照组以生理盐水代替药物和 CoCl₂。处理完成后收集细胞上清液,参照 ELISA 检测试剂盒说明书检测 VEGF 含量,细胞增殖用 CCK-8 试剂盒检测。

2.2 蛋白免疫印迹法检测蛋白水平 收集细胞,加入细胞裂解液提取总蛋白,BCA 法定量,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后将蛋白转至 PVDF 膜上并用脱脂奶粉在 37 °C 下封闭 2 h,加入兔抗人 HIF1- α 单克隆抗体(1:1 000),4 °C 孵育过夜,漂洗后加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000),37 °C

孵育 1 h, 漂洗后显色, 分析目标条带的灰度值。

2.3 RT-qPCR 检测 mRNA 相对表达量 细胞总 RNA 采用 TRIZOL 法提取, 反转录合成 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR, VEGF, HIF1- α 和参比基因

β -actin 的扩增引物 (由金唯智生物科技有限公司合成) 见表 1。PCR 反应步骤如下: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 退火/延伸 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环后以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组间 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
VEGF	5'-CGAAACCATGAACCTTTCTGC-3'	5'-CCTCACTGGGCACACACTCC-3'
HIF1- α	5'-ACAAGTCACCACAGGACAG-3'	5'-AGGGAGAAAATCAAG-TCG-3'
β -actin	5'-AGCGGGAAATCGTGCCTGAC-3'	5'-AGTTTCGTGGATGCCACAGGAC-3'

2.4 视网膜新生血管模型的建立 50 只幼鼠连同母鼠放入氧箱中, 给予氧体积分数为 75% \pm 2%, 氧气流量为 (0.50 ~ 0.75 L \cdot min $^{-1}$) 的高氧环境, 期间每天更换垫料、加食、换水、替换母鼠。5 d 后将小鼠放回正常空气环境中建立 OIR 模型, 然后将模型小鼠随机分为 5 组 ($n=10$): 多贝斯组每日灌胃 0.5 g \cdot kg $^{-1}$ 多贝斯胶囊内容物, 渴络欣低、中、高剂量组每日 ig 0.5, 1.0, 2.0 g \cdot kg $^{-1}$ 渴络欣胶囊内容物, ig 体积为 10 mL \cdot kg $^{-1}$, 模型组 ig 给予等体积生理盐水; 同时设正常组 ($n=10$) 在正常空气环境中饲养。所有小鼠饲养室温控制在 (23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度维持在 40% ~ 70%, 每小时通风次数为 10 ~ 15 次。各组小鼠均在给药 5 d 后 (17 日龄) 麻醉处死, 取双眼于 4% 多聚甲醛固定, 左眼球进行视网膜铺片, ADP 酶血管染色; 右眼球进行连续切片, HE 染色。

2.5 左眼球视网膜铺片和 ADP 酶血管染色 分离左眼球视网膜后刷去表面色素层, 以视乳头为中心切为 4 片, 按照 ADP 酶血管染色的方法对视网膜铺片进行染色^[9], 然后置显微镜下观察并摄片, 采用 Image-Pro[®] Plus (IPP) 软件对图片中的血管进行分析。

2.6 右眼球连续切片和 HE 染色 右眼球经常规脱水、透明、浸蜡和包埋后, 矢状面平行视神经进行连续切片, 片厚 5 μm , 每片相隔 30 μm , 每只眼球选取 10 个切片。常规脱蜡后进行 HE 染色, 于高倍镜下观察突破内界膜血管内皮细胞核的情况, 并计数一个视野中突破内界膜内皮细胞核数。

2.7 数据处理 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 对数据进行统计分析, 比较采用 One-Way ANOVA 分析, 组间两样本比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 渴络欣胶囊对缺氧诱导 ARPE 细胞 VEGF 分泌的影响 CCK-8 检测结果显示, 各剂量渴络欣组、CoCl₂ 组和空白组细胞数之间无显著差异, 表明渴

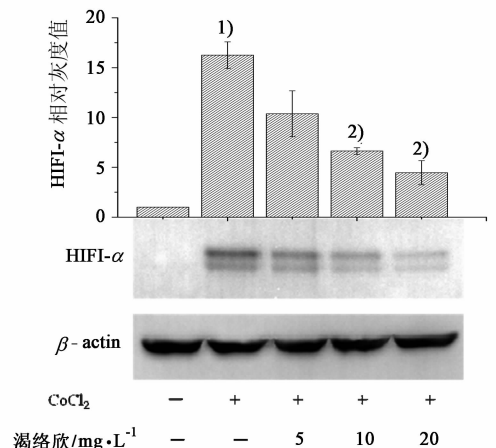
络欣对 ARPE-19 细胞增殖无明显影响。ELISA 结果显示, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 可显著上调培养上清中 VEGF 分泌 ($P < 0.001$), 而 10, 20 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 渴络欣可显著下调 CoCl₂ 诱导的 VEGF 分泌 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 渴络欣胶囊对 ARPE-19 细胞 VEGF 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度 /mg \cdot L $^{-1}$	细胞数/个	VEGF /ng \cdot L $^{-1}$
空白	-	18 748 \pm 1137	460.9 \pm 32.5
CoCl ₂ 模型	-	19 896 \pm 447	935.7 \pm 88.2 ¹⁾
渴络欣	5	19 715 \pm 352	817.9 \pm 103.9
	10	20 213 \pm 1 220	602.7 \pm 37.9 ²⁾
	20	19 904 \pm 569	512.3 \pm 91.7 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.001$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 HIF1- α 蛋白水平的影响 蛋白免疫印迹结果显示, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 处理后出现明显的 HIF1- α 蛋白条带, 渴络欣处理后条带亮度较 CoCl₂ 组弱, 灰度值扫描显示 CoCl₂ 可显著上调 HIF1- α 蛋白水平 ($P < 0.001$), 而 10, 20 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 渴络欣可显著下调 CoCl₂ 诱导的 HIF1- α 蛋白水平 ($P < 0.05$), 见图 1。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.001$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (图 2 同)

图 1 渴络欣胶囊对 HIF1- α 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3.3 对 VEGF 和 HIF1- α mRNA 表达的影响 RT-qPCR 结果显示,150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 处理后 VEGF mRNA 表达量与空白组相比显著升高 ($P < 0.001$), 10, 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 渴络欣则可显著下调其表达 ($P < 0.05$)。而 CoCl_2 诱导和各剂量渴络欣处理对 HIF1- α mRNA 表达水平均无显著影响,见图 2。

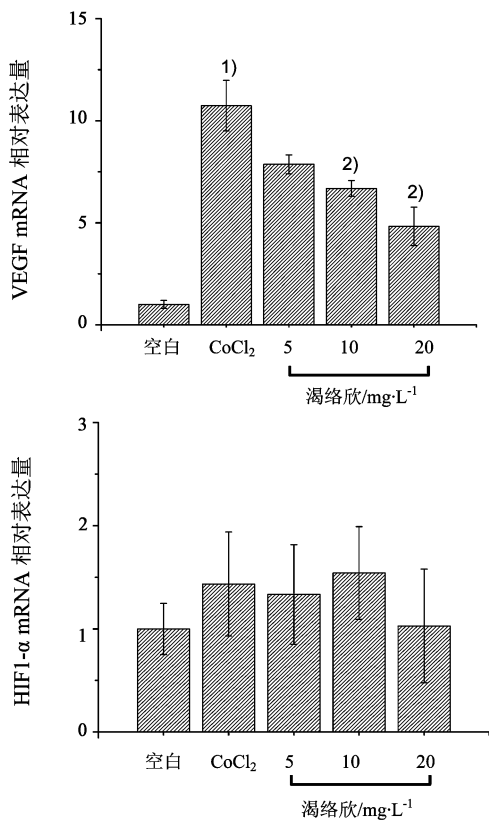


图 2 渴络欣胶囊对 VEGF 和 HIF1- α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

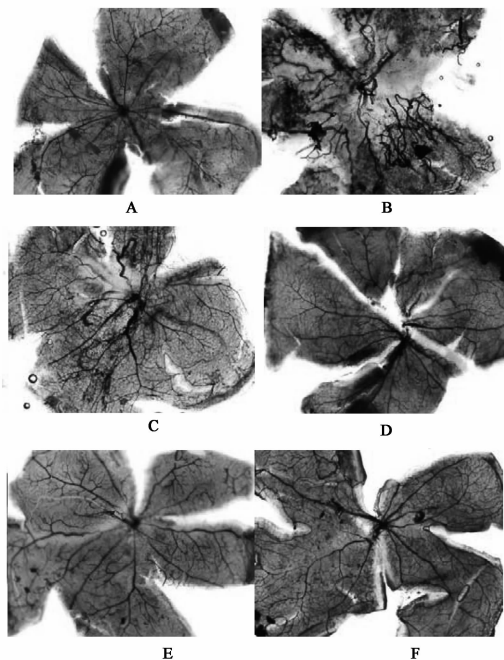
3.4 OIR 小鼠视网膜血管形态学观察 与正常组比较,模型组视乳头周围有大片无灌注区,并见血管迂曲、扩张、变形,周边部可见大量新生血管,血管 A 值显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较,渴络欣低、中、高剂量组视网膜无灌注区明显减少,血管清晰,血管迂曲、扩张、变形程度减轻,新生血管减少,血管 A 值显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 3 和图 3。

3.5 OIR 小鼠视网膜突破内界膜内皮细胞核观察与计数 与正常组比较,模型组内界膜下细胞排列紊乱,视网膜表面或视网膜前有新生血管芽,突破内界膜内皮细胞核数显著增加 ($P < 0.001$);与模型组比较,渴络欣各剂量组新生血管明显减少,进入玻璃体和晶状体囊膜周围的新生血管较少,视网膜神经纤维层或视网膜表面细胞增生数量较少,而突破内界膜内皮细胞核数也显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 3 和图 4。

表 3 渴络欣胶囊对 OIR 小鼠血管面积和突破内界膜血管内皮细胞核数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	A/ $\times 10^4$	细胞核数/个
正常	-	3.5 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0
模型	-	15.5 \pm 6.2 ¹⁾	21.2 \pm 12.5 ¹⁾
多贝斯	0.5	8.3 \pm 2.9 ³⁾	8.2 \pm 6.9 ²⁾
渴络欣	0.5	10.7 \pm 2.9 ²⁾	5.6 \pm 6.2 ³⁾
	1.0	9.6 \pm 2.9 ³⁾	6.1 \pm 6.9 ³⁾
	2.0	10.4 \pm 3.1 ²⁾	11.2 \pm 7.4 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.001$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常组;B. 模型组;C. 多贝斯 0.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 渴络欣 0.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 渴络欣 1.0 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; F. 渴络欣 2.0 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(图 4 同)

图 3 渴络欣胶囊对 OIR 小鼠视网膜血管形态的影响 (ADP 酶染色, $\times 40$)

4 讨论

视网膜新生血管是在视网膜大面积缺氧、缺血和微循环障碍的环境下生成,缺氧环境会导致视网膜细胞中的 HIF1- α 在胞内大量堆积,然后进入细胞核上调 VEGF 表达和分泌,促进新生血管形成^[10-11],当视网膜大量新生血管生成时发展为增殖型糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR),由于新生血管壁结构不健全,容易破裂并反复出血,甚至进入玻璃体内,严重影响患者视力,因此如何控制视网膜血管新生和 VEGF 分泌是 PDR 药物治疗的关键之处。

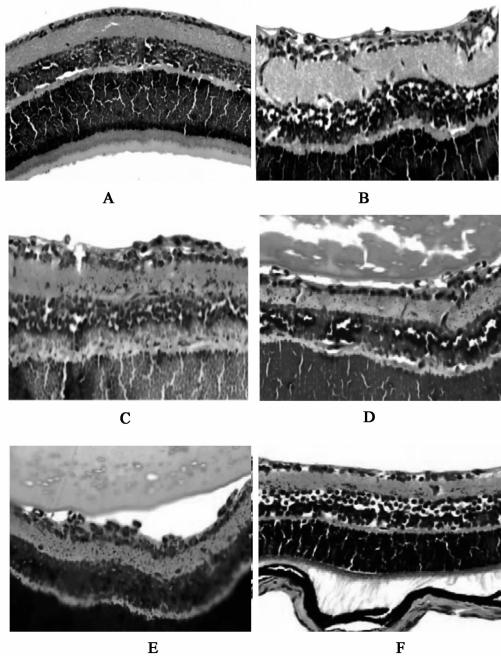


图 4 渴络欣胶囊对突破视网膜内界膜血管内皮细胞核数的影响(HE 染色, ×400)

选择合适的缺氧模型是研究视网膜血管新生的重要内容。在体外实验中,用 CoCl_2 处理视网膜细胞可模拟缺氧环境,导致 HIF1- α 在胞内堆积并上调细胞 VEGF 的表达^[12]。在体内实验中,1994 年 Smith 等^[13]建立的 OIR 模型已在视网膜血管新生研究中得到广泛应用。在该模型中,新生小鼠从高氧回到正常空气环境后,相对缺氧导致 VEGF 释放增加,刺激血管新生,以缓解组织对氧的需求^[14-15]。本实验以体外缺氧 CoCl_2 模型和体内缺氧 OIR 模型为基础研究渴络欣对视网膜血管新生的影响。体外实验中, CoCl_2 模型组 VEGF 含量和 HIF1- α 蛋白水平均显著高于对照组,显示缺氧介导的 VEGF 过分泌模型构建成功。渴络欣处理后 VEGF 分泌、VEGF mRNA 表达和 HIF1- α 蛋白水平均显著降低,表明渴络欣可通过影响 HIF1-VEGF 信号途径抑制缺氧诱导的 VEGF 分泌。作为调控新生血管生成最主要的生长因子,VEGF 被下调预示着渴络欣对血管新生具有抑制作用,这在体内实验得到了证实。在 OIR 小鼠体内实验中,模型组视网膜血管形成了无灌注区,突破内界膜内皮细胞数较正常组显著增加,并且视网膜周边部产生大量新生血管,发生率为 100%,表明模型诱导成功。以不同剂量的渴络欣处理 OIR 小鼠 5 d 后,无灌注区明显减少,视网膜周边新生血管和突破视网膜内界膜内皮细胞核数均显著减少,

显示渴络欣胶囊可抑制缺氧诱导的视网膜血管新生。

本实验结果表明渴络欣胶囊可能具有预防和治疗 PDR 的作用,但是 OIR 血管新生机制与高血糖引起的 PDR 血管新生机制不完全相同,因此渴络欣胶囊能否通过抑制血管新生减轻 PDR 还有待研究,例如对链脲佐菌素诱导的糖尿病性视网膜血管新生的影响等。实验结果也显示渴络欣对 HIF1- α mRNA 表达无显著影响,因此提示渴络欣抑制新生血管的机制可能与影响 HIF1- α 蛋白翻译或降解等过程有关,但其作用机制还需要进一步研究。除 PDR 之外,本实验结果也提示渴络欣胶囊对其他的缺氧诱导视网膜血管新生相关疾病可能也具有潜在的预防和治疗作用,如视网膜静脉周围炎、早产儿视网膜病变、视网膜静脉阻塞和缺氧引起的新生血管性青光眼等,在该类疾病的防治中可能也具有有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 罗旭昇,吴星伟,顾青. 加减小黄蛰虫丸抑制视网膜色素上皮细胞增殖、移行及其机制研究[J]. 中国中医眼科杂志,2009,19(5):249.
- [2] Kwak H J, Park M J, Park C M, et al. Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/Flk-1) phosphorylation [J]. Int J Cancer, 2006, 118(11):2711.
- [3] 熊欣,彭琦,郑燕林. 水蛭提取物对血管内皮细胞 VEGF 受体-2 表达的影响[J]. 国际眼科杂志,2009,9(1):41.
- [4] 任青华,牟忠祥,耿延君,等. 中药水蛭素对荷瘤鼠 Ki-67 与 VEGF 表达的影响[J]. 医学研究杂志,2010,39(6):46.
- [5] 杨建华,段俊国. 黄芪提取物对体外高糖培养牛视网膜毛细血管周细胞的影响[J]. 国际眼科杂志,2007,7(3):685.
- [6] 江红,匡洪宇. 黄芪总黄酮对高糖诱导的牛视网膜血管周细胞氧化应激与 DNA 损伤的影响[J]. 中国中医急症,2010,19(8):1353.
- [7] Crawford T N, Alfaro III, Kerrison J B, et al. Diabetic retinopathy and angiogenesis [J]. Curr Diabetes Res, 2009, 5(1):8.
- [8] Caldwell R B, Bartoli M, Behzadian M A, et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress [J]. Current Drug Targets, 2005, 6(4):511.

柴胡疏肝散醇提物的抗氧化活性

任鹏, 王林林, 许飞虹, 于亚青, 张丹参, 张万明*

(河北北方学院药学院, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:**研究柴胡疏肝散醇提物的体外自由基清除能力和体内抗氧化活性。**方法:**体外抗氧化实验测定了柴胡疏肝散醇提物对 1,1-二苯基-2-苦肼基自由基(DPPH)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除能力;体内抗氧化实验,小鼠随机分为正常组、模型组、柴胡疏肝散水提组($8.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、柴 a 组($1.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、柴胡疏肝散醇提物低、中、高剂量组($4.1, 8.2, 20.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),除正常组外,其余组小鼠每天接受不可预见性温和应激,共 28 d。造模 1 周后灌胃给药,研究柴胡疏肝散醇提物对小鼠的肝组织中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响,并与水提物做比较,评价其体内抗氧化活性。**结果:**体外抗氧化实验表明,柴胡疏肝散醇提物对 DPPH, $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率随着浓度的增大而增大,其对自由基清除率达到半数时的抗氧化剂浓度(EC_{50})分别为 $0.75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $35.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $52.17\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;体内实验表明,模型组小鼠肝脏中 SOD, CAT 酶活性显著低于正常组($P < 0.01$)。给药剂量越大, SOD, CAT 酶活性越高,在本实验设定的给药浓度范围内,呈现一定的量效关系。与水提组相比,具有同等生药量的醇提物 $8.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 SOD, CAT 酶活性显著较高($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明醇提物的抗氧化作用较水提物高。**结论:**柴胡疏肝散醇提物具有较强的抗氧化生物活性。

[关键词] 柴胡疏肝散; 抗氧化活性; 自由基

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0161-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014100161

Antioxidative Activities of Ethanol Extracts from Chaihu Shugan Powder

REN Peng, WANG Lin-lin, XU Fei-hong, YU Ya-qing, ZHANG Dan-shen, ZHANG Wan-ming*

(Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate *in vitro* radical scavenging activity and *in vivo* antioxidant activities

[收稿日期] 20131107(017)

[基金项目] 河北省教育厅基金项目(z2008106);河北北方学院基金项目(2001017)

[第一作者] 任鹏,在读硕士生,从事药物分析、药理学研究, Tel:15369333626, E-mail:renpeng201264@163.com

[通讯作者] *张万明,教授,硕士生导师,从事药物分析、药理学研究, Tel:13582638180, E-mail:zwm19650228@163.com

- [9] 孟凡星,王志军,罗瑶,等. 氧诱导视网膜病变小鼠模型的建立与评价[J]. 暨南大学学报, 2011, 32(2):199.
- [10] Ozaki H, Yu A Y, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(1):182.
- [11] 徐寒松,孔德明,向慧. 通脉糖眼明胶囊对单纯型糖尿病视网膜病变患者 VEGF 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):229.
- [12] Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, et al. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α [J]. J Biol Chem, 2003, 278(18):15911.
- [13] Smith L E, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35:101.
- [14] 付浴东,周占宇,万金娥,等. Avastin 玻璃体腔注射对小鼠氧诱导视网膜病变新生血管的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(11):988.
- [15] Pierce E A, Foley E D, Smith L E, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity [J]. Arch Ophthalmol, 1996, 114(10):1219.

[责任编辑] 聂淑琴