

补青颗粒防治大鼠D-乳糖性白内障的研究

邓自辉, 牛阳*, 王荣, 范庆寅, 梁帅
(宁夏医科大学, 银川 750004)

[摘要] **目的:**观察补青颗粒对大鼠半乳糖性白内障的防治作用。**方法:**用SD大鼠复制半乳糖白内障模型。实验分为6组:空白对照组无特殊处理;模型对照组每日ip注射50% D-半乳糖溶液($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续15 d,制成白内障动物模型;阳性对照组同模型组处理的同时每天给予障眼明片混悬液 $0.02\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig至实验结束;补青颗粒高、中、低剂量组处理同模型组且每天分别给予 $0.8, 0.4, 0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量ig至实验结束。分别记录实验前及造模起第3, 7, 14天晶状体的混浊程度,实验结束时检测各组晶体超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量。**结果:**对照组晶状体始终透明,模型组第3天晶体开始发生混浊,补青颗粒3个剂量组晶体混浊的速度及程度在3, 7, 14天均明显低于模型组($P < 0.05$), SOD活性显著高于模型组($P < 0.05$), MDA含量显著低于模型组($P < 0.05$)。**结论:**补青颗粒具有较好的防治大鼠半乳糖性白内障的作用。

[关键词] 补青颗粒; 半乳糖性白内障; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0205-04

[doi] 10.11653/syjf2013130205

Experimental Study on Protection and Treatment of Galactose Cataract by Buqing Granules

DENG Zi-hui, NIU Yang*, WANG Rong, FAN Qing-yin, LIANG Shuai
(Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protection and treatment effects of Buqing granules on galactose cataract. **Method:** Animal model of galactose cataract was induced in SD rats. The rats were divided into six groups: black control group, model group treated by daily intraperitoneal injection of 50% D-galactose solution ($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) for 15 days, positive control group treated by Zhangyan suspension $0.02\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ everyday, high, medium and low dose groups of Buqing granules ($0.8, 0.4, 0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Recorded the lens turbidity was recorded before and after modeling from the first day to 3, 7, 14. At the end of the experiment, superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) was detected. **Result:** The lens in control group was transparent, in model group lens opacities occurred at the third day, in the three dose groups of Buqing granules occurring time and extent of lens opacities at 3, 7 and 14 days were significantly lower than the model group ($P < 0.05$). SOD activity was significantly higher than the model group ($P < 0.05$), MDA was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The Buqing granules had better prevention and treatment in rats with galactose cataracts.

[Key words] Buqing granules; galactose cataract; superoxide dismutase; malondialdehyde

目前,白内障仍是全球范围内致盲的最主要原因。当白内障发展至成熟期,虽可手术治疗,但要求

患者具备一定的经济条件和身体条件,所以手术复明并不能广泛适用。而药物的早期防治却随着老年

[收稿日期] 20121227(028)

[基金项目] 国家科技支撑项目(2009BA172B03)

[第一作者] 邓自辉,硕士研究生,从事卫气营血辨证理论及临床研究, E-mail: zihui0730@163.com

[通讯作者] *牛阳,教授,硕士研究生导师,从事中医温病学教学、科研工作, Tel: 13909574577, E-mail: niuyang0227@163.com

性白内障发病机制的进一步研究逐渐成熟,受到国内外研究学者的高度重视。中医药在这一方面的研究亦取得了一定的进展。本实验所用补青颗粒出自《杨氏家藏方》,功效补肝益肾,利水消肿明目。由枸杞子、菟丝子、熟地黄等组成。笔者分别采用 HPLC, UV 以及薄层色谱定性对补青汤的有效成分进行鉴别,然后制剂,并通过实验,观察白内障大鼠晶状体的混浊程度及测定晶状体超氧化物歧化酶活性(SOD)、丙二醛(MDA)含量,对其药效进行评价。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 60 只(清洁级),雌雄各半,鼠龄约 4~5 周,体重 60~80 g。由宁夏医科大学动物实验中心提供,合格证号,SCXK(宁)2011~0001。以 1% 阿托品液散瞳后经裂隙灯检查大鼠晶体均透明,并按常规饲养及自由饮水一星期。

1.2 药品与试剂 补青颗粒:菟丝子 20 g,熟地黄 20 g,枸杞子 20 g,车前子 10 g,地骨皮 10 g,白茯苓 20 g,甘菊花 10 g。加 8 倍量水煎煮 2 h,滤过,煎液另存;药渣再加 7 倍量水煎煮 1.5 h,滤过,合并两次煎液,静置 24 h,取上清液浓缩至比重为 1.06 的清膏,干燥,粉碎成细粉,加入辅料,混匀,制成颗粒,干燥,即得。此过程由宁夏医科大学药学院制备;障眼明片(广州中一药业有限公司,批号 N00057);D-半乳糖(由上海佳和生物科技有限公司提供),配制成质量分数为 50% 的半乳糖溶液;总蛋白含量测试盒(BCA 法)、SOD 测试盒、MDA 测试盒(南京建成生物工程研究所,生产批号分别为 20120620, 20120619, 20120627)。

1.3 仪器 KJ5D 型裂隙灯显微镜(由苏州工业园区康捷医疗器械有限公司提供);酶标仪(美国,伯乐 680)。

2 方法

2.1 分组与给药 大鼠按性别、体重随机分为 6 组:正常对照组、白内障模型组、阳性对照组、补青颗粒高、中、低剂量组。参照文献中 D-半乳糖性白内障模型的建立方法,除空白对照组外,其余各组大鼠每天 ip 注射 50% D-半乳糖溶液,注射量 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续注射 15 d,并自由饮用 10% 半乳糖溶液。于诱发模型当日开始,治疗 15 d,阳性对照组每天以障眼明片混悬液 $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给大鼠 ig;补青颗粒高、中、低剂量组以 0.8, 0.4, 0.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给大鼠 ig。

2.2 观察方法 实验开始后 3, 7, 14 d 分别对各实验组用 1% 阿托品溶液滴眼扩瞳,用裂隙灯显微镜观察各组动物晶状体的动态变化,记录并拍照。参

考黄秀榕^[1]分期标准,将晶状体混浊分为 0~V 期:0 期:晶状体透明;I 期:晶状体周边皮质散在细小空泡;II 期:晶状体周边皮质成环状密集中等空泡;III 期:除晶状体四周皮质密集空泡外,部分皮质片状混浊;IV 期:晶状体核及核周皮质混浊;V 期:晶状体完全混浊。

2.3 造模成功指标 给药结束后,裂隙灯观察大鼠晶状体均至少出现空泡,处于 II 期,停止给糖后继续发展,到实验结束时($\geq 20 \text{ d}$)晶状体中均存在白色沉淀(\geq III 期),表明白内障造模成功^[2]。

2.4 晶体中 SOD 活性和 MDA 含量的测定 实验第 15 天,将各组大鼠颈椎脱臼致死,冰浴下摘除眼球,0~4 °C 生理盐水漂洗 3 次,在超净工作台上解剖显微镜下仔细从后路剖开眼球,除去球壁及玻璃体,剥离悬韧带,用圈托器将晶状体取出,滤纸吸干,分析天平称重,置于玻璃匀浆器内,按质量体积比 1:9 加入生理盐水,制成 10% 的组织匀浆,将匀浆器管底部浸入冰水混合物中充分研磨 5 min, 3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后,取上清液测定各指标。

2.5 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学处理。制作模型后白内障的发生情况以频数和百分数表示,各组间白内障发生情况的比较采用秩和检验。SOD 活性及 MDA 含量的测定以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间的比较方法采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠晶状体混浊程度的观察 在注射半乳糖后,大鼠出现了多饮、多尿、体重停止增长、毛发干燥无华、精神状态不佳等全身症状。造模组在给药后第 3 天开始发生不同程度的晶状体混浊,但补青颗粒高、中剂量组晶体混浊的速度及程度明显低于模型组 ($P < 0.05$),低剂组与障眼明组效果相当,模型组混浊程度最严重(表 1)。

3.2 晶状体 SOD 活性、MDA 含量的比较 造模结束后检测各组大鼠 SOD 及 MDA 含量,结果表明,补青颗粒和障眼明 SOD 的活力均显著高于模型组 ($P < 0.05$),且均能显著抑制晶体内 MDA 含量的增加 ($P < 0.05$),显示有抗脂质过氧化作用(表 2)。

4 讨论

目前,中药治疗年龄相关性白内障的制剂品种很多,但各外用药物的组成中,大多都含有促进吸收类药和营养代谢类药,各药再按不同的组方配上活血祛瘀药、清热药等,制成散剂或水剂,用以涂眼或点眼,少数采用注射或是结合内服中西药来治

表 1 补青颗粒对半乳糖致大鼠晶体混浊度的影响

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	3 d						7 d					14 d						
		0	I	II	III	IV	V	0	I	II	III	IV	V	0	I	II	III	IV	V
空白	-	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
模型 ¹⁾	-	8	12	0	0	0	0	0	0	6	12	2	0	0	0	0	9	11	0
障眼明 ²⁾	0.02	16	4	0	0	0	0	2	6	8	4	0	0	2	9	7	2	0	0
补青高 ²⁾	0.8	15	5	0	0	0	0	7	8	4	1	0	0	5	10	4	1	0	0
补青中 ²⁾	0.4	14	6	0	0	0	0	6	7	6	1	0	0	4	9	5	2	0	0
补青低 ²⁾	0.2	12	8	0	0	0	0	4	6	8	2	0	0	2	8	6	4	0	0

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 各组晶体 SOD 活性、MDA 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	晶体数	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹
空白	20	-	68.39 ± 13.53	4.12 ± 0.46
模型	20	-	16.64 ± 2.48 ¹⁾	20.20 ± 2.55 ¹⁾
障眼明	20	0.02	39.05 ± 13.13 ²⁾	5.37 ± 1.31 ²⁾
补青颗粒	20	0.8	58.60 ± 11.25 ²⁾	4.79 ± 0.78 ²⁾
	20	0.4	48.84 ± 4.99 ²⁾	5.69 ± 1.03 ²⁾
	20	0.2	47.26 ± 3.74 ²⁾	5.57 ± 1.25 ²⁾

疗^[3]。而内服中药治疗多采用由多种中药制成的方剂,究竟是那种药材起主要作用,或者药物之间的协同作用尚不明确,缺乏对有效成分的确定,单方或组方中药治疗白内障的疗效还有待进一步证实^[4]。本实验中,以枸杞滋肝明目的功效为突破口,将补青汤组方进行混提。以菟丝子、枸杞子的明目成分、含量及干浸膏作为考察指标,进行其单因素考察,以提取次数、提取时间、加水量、pH 等为主要影响因素,考察指标为槲皮素、山柰酚、甜菜碱和浸膏收得率,进行多元回归优化提取工艺;并对槲皮素、山柰酚、甜菜碱 HPLC、总多糖、总黄酮 UV 进行定量控制,其他药材进行薄层色谱定性控制。然后将混提浸膏制成颗粒剂,用于动物实验,证实其对老年性白内障的发生发展具有一定的防治作用,为进一步的推广应用提供实验依据。

白内障成因尚不十分清楚,但现代研究认为白内障的产生与氧自由基和脂质过氧化物在晶状体内的堆积密切相关^[5]。大量研究证实,人体内本身就具有清除多余自由基的能力,这主要是靠内源性自由基清除系统,它包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等,其可以有效地清除·O₂⁻, HO, LOOH 等活性氧,并有终止自由基链锁反应的作用。其中 SOD 作为眼组织中自由基的主要清除剂,在白内障防治的研

究中越来越受到重视。MDA 是细胞质膜中不饱和脂肪酸通过脂质过氧化的最终产物。近几年来人们研究的热点之一就是脂质过氧化的损伤作用及抗氧化物的含量和活性与晶状体发生混浊的关系。动物实验证明,脂质过氧化毒性产物可造成晶状体的混浊。

本实验证实模型组大鼠晶状体中 MDA 含量明显增高,而 SOD 活性明显下降,表明老年性白内障的发病可能与机体抗氧化酶活性降低、氧自由基毒性蓄积以及脂质过氧化反应密切相关。研究还显示补青颗粒能减轻 D-半乳糖性白内障大鼠晶状体中脂质过氧化损伤程度,增强机体的抗氧化能力。同时还使 D-半乳糖性白内障的发生、发展得到不同程度的抑制。

D-半乳糖性白内障模型病程发展较慢且以皮质部病变特征为主,可以代表老年性白内障^[6]。而祖国医学对老年性白内障因病机的研究也由来已久。《秘传眼科龙木经》认为本症发病多由肝风、肝热、肝气上冲为患;《原机启微》根据病因把它归并与“阴弱不能配阳之病”,认为有“肝木不平,内夹心火”、“阴微不立,阳盛即淫”等多种病因。至近代,提出了老年性白内障的发生主要由于肝、肾、脾功能不调导致气血不足、不能上荣于目所致^[7]。由此,滋肝补肾、健脾除湿为治疗本病的关键,补青颗粒中熟地黄入肝、肾二经,具补血滋阴,益精填髓之功。枸杞子、菟丝子、车前子补阳益阴,滋肝明目。茯苓健脾利水渗湿。全方寓补肝益肾,利水消肿明目于一体^[8]。现代药理研究亦证实,菟丝子中的主要活性成分之一菟丝子黄酮,对大鼠半乳糖性白内障具有防治作用。杨涛^[9]等选用十几种含黄酮类化合物的中草药,观察其对大鼠半乳糖性白内障的防治作用,发现其中效果较好者就有菟丝子。而枸杞子中所含的枸杞多糖已证实具有抗氧化、抗衰老的作用。

玉郎伞多糖对快速老化小鼠额叶和 海马神经元 Caspase-3 表达及活性的影响

陈晓宇, 黄仁彬*

(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 考察玉郎伞多糖(YLSP)对快速老化(SAMP8)小鼠额叶、海马神经细胞半胱天冬蛋白酶-3(Caspase-3)表达及活性的影响。方法: 选择6月龄SAMP8小鼠, 随机分为模型组, 石杉碱甲组($0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), YLSP低、高剂量组($45, 180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 选择6月龄正常老化小鼠(SAMR1)作为对照组, 以上各组每日上午ig给药1次, 连续40d, 于末次给药的次日应用免疫组织化学方法检测额叶和海马Caspase-3的表达变化及神经细胞凋亡情况, 测定Caspase-3活性。结果: SAMP8小鼠额叶和海马Caspase-3阳性细胞数分别为(46.00 ± 5.30), (51.36 ± 3.28)个, Caspase-3活性分别为 2380 ± 193 , 2473 ± 241 , 均较对照组显著升高(4.90 ± 0.60), (6.14 ± 0.53); (437 ± 76), (521 ± 79) ($P < 0.01$); 与模型组相比, 石杉碱甲组、YLSP低、高剂量组额叶和海马Caspase-3阳性细胞数(23.48 ± 3.46 , 27.86 ± 4.04 ; 24.54 ± 3.55 , 30.60 ± 2.62 ; 17.98 ± 2.97 , 23.90 ± 2.58)及Caspase-3活性(1323 ± 126 , 1456 ± 130 ; 1397 ± 133 , 1483 ± 147 ; 987 ± 79 , 1091 ± 95)明显低于模型组($P < 0.01$); 与石杉碱甲组、YLSP低剂量组比较, YLSP高剂量组的额叶和海马Caspase-3阳性细胞数及Caspase-3活性显著降低($P < 0.05$)。结论: 表明YLSP降低Caspase-3表达及活性, 减少SAMP8小鼠脑部神经细胞凋亡。

[关键词] 玉郎伞多糖; SAMP8; 半胱天冬蛋白酶; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0208-04

[doi] 10.11653/syfy2013130208

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130425.1458.002.html>

[网络出版时间] 2013-04-25 14:58

[收稿日期] 20130208(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960504)

[第一作者] 陈晓宇, 博士研究生, 从事抗老年性痴呆药物研究, Tel:0771-2186165, E-mail:1534746296@qq.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 博士, 教授, 博士生导师, 从事抗老年性痴呆药物和抗糖尿病药物研究, Tel:0771-5358272, E-mail:huangrenbin518@163.com

且枸杞子本身就含有超氧化物歧化酶(SOD), 由此可提高晶状体的抗氧化能力, 达到抑制白内障发展的作用。方中其他药物如熟地黄、车前子等均经实验证实对Fenton反应所致的晶状体氧化损伤有不同程度的防护作用, 且效果较佳^[10]。综上所述, 本方无论是在现代药理研究方面还是在中医理论方面都充分的阐明了其防治老年性白内障的机制, 为其临床应用奠定了科学的理论基础及实验依据。

[参考文献]

- [1] 黄秀榕, 祁明信. 锌在控制实验性半乳糖白内障中的作用[J]. 中华眼科杂志, 1987, 5(4):293.
- [2] 李慈娟, 范小兵, 韩超, 等. 昂立明视胶囊抗白内障的动物试验[J]. 中成药, 2001, 23(3):199.
- [3] 张晓春, 燕振国. 我国白内障基础研究现状分析和展望[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(23):5469.
- [4] 孙熠, 严宏. 中医药治疗年龄相关性白内障的研究进

展[J]. 国际眼科杂志, 2005, 5(5):987.

- [5] 芦斌, 高继美, 刘俊茹, 等. 白内障超声乳化人工晶状体植入术联合小梁切除效果观察[J]. 河北医药, 2007, 29(6):571.
- [6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:891.
- [7] 唐由之, 肖国士. 中医眼科全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996:5.
- [8] 俞洋, 冯振娥, 赵晓林, 等. 补清汤治疗未成熟期年龄相关性白内障35例临床观察[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(5):496.
- [9] 杨涛, 梁康, 张晶颖. 四种中药对大鼠半乳糖性白内障的影响[J]. 北京医科大学学报, 1991, 23(2):97.
- [10] 黄秀榕, 祁明信, 王勇, 等. 十一种归肝经明目中药对Fenton反应所致的晶状体氧化损伤防护作用的研究[J]. 中医医学刊, 2003, 21(10):1650.

[责任编辑 聂淑琴]