

· 药理 ·

杞菊地黄汤对视网膜变性大鼠半胱氨酸 天冬氨酸蛋白酶-3 表达的影响

陈金卯^{1*}, 杨锦南², 林少春³, 吴开力³

(1. 广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021;

2. 新乡医学院, 河南 新乡 453003; 3. 中山大学中山眼科中心, 广州 510060)

[摘要] **目的:**观察杞菊地黄汤对实验性视网膜变性大鼠的治疗机制。**方法:**将生后45 d的SD大鼠分为正常组、模型对照组和杞菊地黄汤组,正常组不做处理,生后47 d中药组大鼠灌服杞菊地黄汤 $8.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($15\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),模型对照组同时灌服等体积生理盐水,生后50 d ip *N*-甲基-*N*-亚硝脲(*N*-methyl-*N*-nitrosourea, MNU) $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 造成视网膜变性模型,正常组第55天处死,后2组大鼠分别按造模后12 h, 1, 2, 3, 5 d处死,应用免疫组织化学法检测视网膜中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)的表达,实时荧光定量RT-PCR法检测视网膜中Caspase-3的含量。**结果:**免疫组织化学和实时荧光定量RT-PCR法均显示模型对照组大鼠视网膜Caspase-3阳性表达在MNU处理后渐升高,第2天达顶峰,第5天有所下降;杞菊地黄汤组大鼠视网膜Caspase-3阳性表达第3天才达顶峰,且高峰值低于模型组。**结论:**杞菊地黄汤能延缓MNU ip所导致的大鼠视功能损害,其治疗机制与降低视网膜中Caspase-3的表达,从而抑制光感受器细胞的凋亡有关。

[关键词] 杞菊地黄汤; 视网膜变性; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0146-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.005 **[网络出版时间]** 2012-03-27 14:42

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1442.005.html>

Influence of Qiju Dihuang Decoction on Caspase-3 Expression in Retinal Degeneration Rats

CHEN Jin-mao^{1*}, YANG Jin-nan², LIN Shao-chun³, WU Kai-li³

(1. The First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China;

3. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the influence of Qiju Dihuang decoction on Caspase-3 expression in *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) -induced retinal degeneration rats. **Method:** Sprague Dawley rats were divided into three groups: the control group, the model group and the Qiju Dihuang decoction group. MNU at dose $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ was ip injected at 50 d after birth to induce retinal degeneration model. All rats were sacrificed at scheduled time points. The expression of Caspase-3 on the retina was detected by immuohistochemistry and Real-Time PCR. **Result:** The results were demonstrated by immuohistochemistry and Real-Time PCR. Positive Caspase-3 expression in the model group was detected at 12 h after ip MNU, reached to the peak at 2 d and gradually reduced, whereas Caspase-3 expression in the Qiju Dihuang decoction group reached to the peak at 3 d and the peak value was lower than the former. **Conclusion:** The positive expression of Caspase-3 was raised after MNU injection. Qiju Dihuang

[收稿日期] 20111024(017)

[基金项目] 国家自然科学基金(30300467);广西中医药管理局自筹经费课题(桂卫中 gzzc0963)

[通讯作者] * 陈金卯, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事眼科基础和临床研究, Tel: 13978652453, E-mail: sportscjm@163.com

decoction can restrain the apoptosis of photoreceptor cells by decreasing the expression of Caspase-3.

[Key words] Qiju Dihuang decoction; retinal degeneration; Caspase-3; apoptosis

视网膜变性是临床常见的一类眼科疾病,往往严重损伤患者的视功能,光感受器细胞凋亡是其共同的特征。杞菊地黄汤是临床常用的治疗眼科疾病的一个方剂,以往的实验证实杞菊地黄汤对实验性视网膜变性有效^[1],本实验拟从分子水平探讨其药理机制。

1 材料

1.1 动物 生后 45 d 的清洁级雌性 SD 大鼠 66 只,由中山大学北校区实验动物中心提供(动物合格证号 2003A070)。本研究所有方法步骤均严格按照 ARVO 关于实验动物使用的规定进行。

1.2 药物 杞菊地黄汤:熟地黄 24 g,枸杞 9 g,菊花 9 g,山茱萸 12 g,山药 12 g,泽泻 9 g,茯苓 9 g,丹皮 9 g。以上药方均利用广东一方制药有限公司生产的中药配方颗粒,按剂量配制组方,并加水煮沸,使之完全溶解,每付药均配制为 168 mL 药液。按人与大鼠体表面积 56:1 计算给药体积,则每 100 g 体重大鼠每天 ig 1.5 mL (168 ÷ 56 ÷ 2) 药液。各药液置 4 ℃ 冰箱保存备用,实验前用微波炉加热,放置变温后灌胃。

1.3 试剂 *N*-甲基-*N*-亚硝脲(*N*-methyl-*N*-nitrosourea, MNU),Sigma 公司产品,闭光保存在 -20 ℃ 冰箱内,临用前用生理盐水稀释至 4 g·L⁻¹ 质量浓度。大鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)多克隆抗体为 NeoMarkers 公司产品。博士德公司即用型 SABC 试剂盒和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒。

1.4 仪器 BX50 生物显微镜美国 Olympus; UV1700 紫外分光光度计(日本 Shimadzu); PE7000 全自动荧光定量 PCR 仪(美国 Pekin Elmer 公司);德国彩色图像摄录输入仪(Axioplan2 imaging)。

2 方法

2.1 分组与造模^[2] 生后 45 d 的 66 只雌性 SD 鼠随机分为以下 3 大组 11 小组:正常组 6 只,模型对照组(MNU 造模后 12 h,1,2,3,5 d 各小组 6 只),杞菊地黄汤组(灌服中药并行 MNU 造模后 12 h,1,2,3,5 d 各小组 6 只)。除正常组外,其他各组均于生后 47 d 开始 ig,中药组大鼠 ig 杞菊地黄汤 8.3 g·kg⁻¹ (15 mL·kg⁻¹),模型对照组 ig 等体积生理盐水,第 50 天行 ip MNU 40 mg·kg⁻¹ 造成视网膜变性模型,正常组第 55 天处死,后 2 组大鼠分别按造模后 12 h,1,2,3,5 d 处死,摘除双眼球,其中左眼投入

固定液中固定,拟行免疫组织化学法检测视网膜中 Caspase-3 的表达;右眼摘除后,立即分离视网膜,提取总 RNA,用 Real-Time RT-PCR 法检测视网膜中 Caspase-3 的含量。

2.2 眼球病理切片 按时处死大鼠,摘出双眼球,注意保留部分视神经作为参照物,立即投入混合固定液中(冰乙酸、甲醛、蒸馏水和 95% 乙醇按 1:2:7:10 配制),3 h 后转移至 10% 中性甲醛溶液中固定过夜,沿纵轴将眼球两边开窗,除去晶状体,组织脱水,然后行石蜡包埋,选取包含视神经的纵切面切片行 HE 染色,切片厚度 4 μm。

2.3 免疫组织化学分析 常规切片脱蜡、水化 2 h,微波修复 10 min,冷却后 3% 过氧化氢封闭 15 min,5% BSA 封闭血清 37 ℃ 10 min,加 Caspase-3 羊抗大鼠多克隆抗体(1:100),4 ℃ 过夜,室温解冻 30 min,按博士德公司说明加二抗和 DAB 显色剂。最后苏木素复染、树胶封片。胞浆棕黄色为阳性。

计数方法:参照 Jiangmei^[3] 的方法并加以改进,400 倍镜下,自视盘旁开始向锯齿缘方向连续取 4 个视野,记录每个视野中免疫组织化学阳性细胞数。取每个样本的平均值进行分析。

2.4 Real-Time RT-PCR 检测 RNA 的提取:在预定时间分组处死动物,迅速摘取眼球,分离并收集视网膜,11 组共 11 个样本。每个视网膜组织样本中加入 1 mL Trizol 试剂匀浆,室温下放置 5 min 后,加入 0.2 mL 氯仿剧烈振荡 15 s,室温下再放置 3 min,于 4 ℃ 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,将上部水相转入新的 Eppendorf 管,每个样本加入 0.5 mL 异丙醇沉淀 RNA,摇匀,室温下放置 10 min 后,于 4 ℃ 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,凝胶样沉淀物为 RNA;吸去上清,并用 1 mL 75% 乙醇在涡旋振荡器上洗 RNA 1 次,随后 4 ℃ 下 7 500 r·min⁻¹ 离心 5 min;晾干 RNA 沉淀,然后用无 RNA 酶的水溶至 30 μL, -70 ℃ 下保存。

RNA 样品鉴定:每样品取 5 μL RNA 置 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,泳毕,溴化乙锭染色观察带型。同时在紫外分光光度计上测定波长为 260 nm 和 280 nm 时的吸光度(A),计算样品的浓度和纯度。 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$,说明 RNA 纯度好。

RNA 浓度 = $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40/1\ 000$ 纯度 = A_{260}/A_{280}

引物设计:上游引物 5'-AAT TCA AGG GAC

GGG TCA TG-3';下游引物 5'-GCT TGT GCG CGT ACA GTT TC-3';荧光探针 5'-FAM-CCA GTC ACT TTG CGC CAT GC-TAMRA-3'。

反转录反应:取 5 μL RNA 模板做反转录反应,仪器为 PE9600 聚合酶链反应仪,反应体系如下:5 × 反转录 buffer 4 μL,上游引物 0.4 μL,下游引物 0.4 μL,25 mmol·L⁻¹三磷酸脱氧核糖核酸 0.2 μL (华美),10 U·μL⁻¹反转录酶 1 μL,二乙基焦磷酸盐水 9 μL,RNA 模板 5 μL,总体积 20 μL。反转录 buffer 成分:50 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (pH 8.0),50 mmol·L⁻¹氯化钾,4 mmol·L⁻¹氯化镁,10 mmol·L⁻¹二硫代苏糖醇。反应条件:37 ℃ 1 h,然后 95 ℃ 3 min。

质量控制:分别完成 Caspase-3 样品的阳性质控对照品制备,步骤如下:样品 cDNA 5 μL,5 × 聚合酶链反应 buffer (QIAGEN) 10 μL,上游引物 (25 μmol·L⁻¹) 1 μL,下游引物 (25 μmol·L⁻¹) 1 μL,三磷酸脱氧核糖核酸 (华美公司,10 mmol·L⁻¹) 1 μL, Taq 酶 (达安公司,2 U·μL⁻¹) 2 μL,去离子水 30 μL。反应条件为 93 ℃ 2 min,然后 93 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 40 个循环,最后 72 ℃ 7 min 延伸。仪器为 PE9600 聚合酶链反应仪。扩增产物经电泳,割下目的条带,回收纯化。用 A₂₆₀ 和扩增片段长度数据换算出浓度 (拷贝数/μL),再做 10 倍梯度稀释,制备成阳性定量对照品。阴性质控对照品为灭菌超纯水。

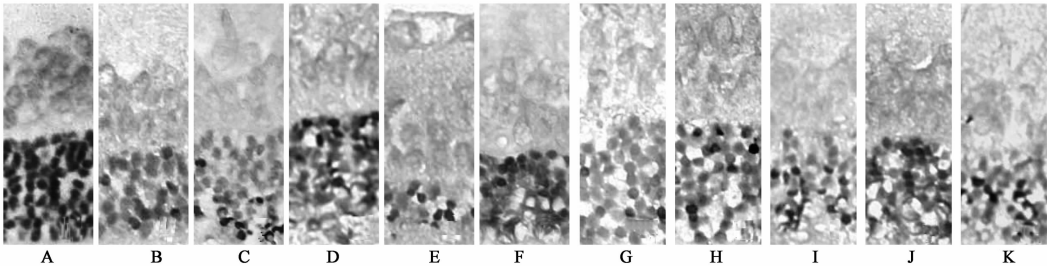
荧光定量 PCR 反应:阳性质控对照品和样本均

按以下反应体系进行:5 × 定量 PCR buffer (美国 ABI 公司) 10 μL,上游引物 F (25 nmol·L⁻¹) 1 μL,下游引物 R (25 nmol·L⁻¹) 1 μL,三磷酸脱氧核糖核酸 (10 mmol·L⁻¹) (Sigma 公司) 1 μL,荧光探针 (20 nmol·L⁻¹) (上海生工) 1 μL, Taq 酶 (美国 ABI 公司) 2 μL, cDNA 5 μL,去离子水 29 μL,聚合酶链反应 buffer 成分:10 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (pH 8.0),50 mmol·L⁻¹氯化钾,2 mmol·L⁻¹氯化镁。反应条件 93 ℃ 2 min,然后 93 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,共 40 个循环。反应结束后,电脑自动分析荧光信号并将其转换为样品的 Ct 值 (循环阈值) 及 Qty 值 (起始拷贝数/μL cDNA)。考虑到各个样本总 RNA 浓度的差异,最终计算结果按下列公式换算: A (拷贝数/μg 总 RNA) = Qty/A₂₆₀ × 5/6。

2.5 统计学方法 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12 医学统计软件进行处理,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 免疫组织化学 正常组大鼠视网膜各层细胞未见 Caspase-3 的阳性表达。模型对照组 ip MNU 后 12 h,外核层可见 Caspase-3 阳性表达,第 2 天达高峰,高峰后逐渐下降。杞菊地黄汤组 Caspase-3 阳性表达在 MNU 处理后渐升高,第 3 天达顶峰,第 5 天有所下降。将模型对照组和杞菊地黄汤组按不同时间点两两对比行 *t* 检验,除 3 d 组外,12 h,1,2,5 d 各组均 *P* < 0.05。见图 1,表 1。



A. 正常组;B~F. 模型对照组:分别为 MNU 处理后 12 h,1,2,3,5 d;
G~K. 杞菊地黄汤组:分别为灌服杞菊地黄汤并行 MNU 处理后 12 h,1,2,3,5 d
图 1 MNU 40 mg·kg⁻¹ ip 后不同时间大鼠视网膜中 Caspase-3 的表达 (免疫组织化学, × 400)

表 1 杞菊地黄汤对 MNU 40 mg·kg ⁻¹ ip 后不同时间各组大鼠视网膜外核层 Caspase-3 阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)							个
组别	剂量/g·kg ⁻¹	12 h	1 d	2 d	3 d	5 d	
模型对照	—	125 ± 68	178 ± 83	644 ± 136	432 ± 108	105 ± 58	
杞菊地黄汤	8.3	51 ± 21 ¹⁾	87 ± 36 ¹⁾	185 ± 73 ³⁾	496 ± 114	332 ± 95 ³⁾	

注:与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01, ³⁾ *P* < 0.001 (表 2 同)。

3.2 Real-time RT-PCR 正常组大鼠视网膜 Caspase-3 mRNA 的表达量为 1.52×10^5 ;模型对照组在 MNU 处理后第 2 天时最高,达正常组表达量的 19 倍,此后渐下降,第 5 天表达量仍为正常组的 8 倍。杞菊地黄汤组在 MNU 处理后早期 Caspase-3 mRNA 的表达量明显低于模型对照组,其高峰期推迟,第 3 天才达到最高,表达量达正常组的 16 倍,第 5 天表达量下降为正常组的 13 倍。见图 2,表 2。

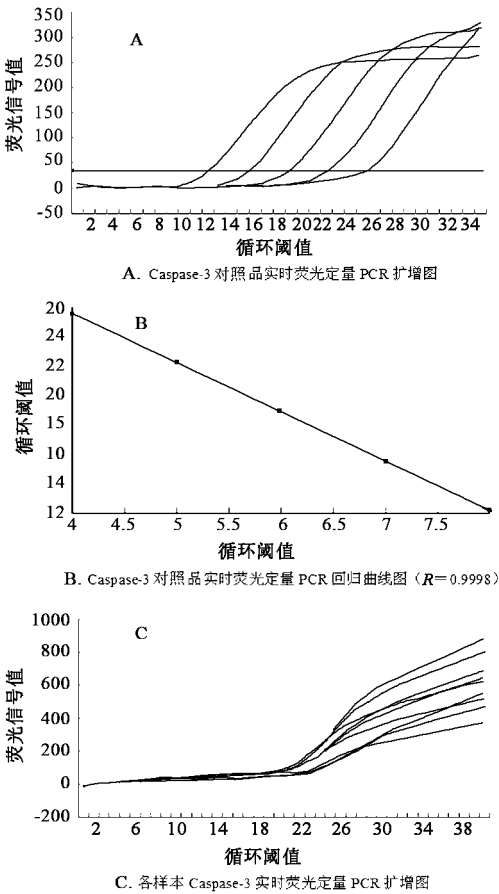


图 2 Real-Time RT-PCR 检测各组大鼠视网膜 Caspase-3 的表达

表 2 杞菊地黄汤对 MNU 40 mg·kg⁻¹ip 后不同时间各组大鼠视网膜 Caspase-3 表达拷贝数的影响($\bar{x} \pm s, n=26$) μg 总 RNA

组别	剂量/g·kg ⁻¹	12 h	1 d	2 d	3 d	5 d
模型对照	—	18.35×10^5	25.14×10^5	29.25×10^5	13.72×10^5	12.24×10^5
杞菊地黄汤	8.3	1.79×10^5 ¹⁾	3.43×10^5 ¹⁾	13.36×10^5	25.25×10^5 ¹⁾	19.19×10^5 ¹⁾

表明:MNUip 后 12 h,视网膜 Caspase-3 表达开始上升,第 2 天达高峰,其后渐下降;杞菊地黄汤组大鼠 Caspase-3 的表达量在 MNU 处理后 12 h,1,2 d 时低于模型组,表达高峰向后推移,第 3 天才达高峰,其变化与杞菊地黄汤治疗组大鼠外核层细胞凋亡程度一致^[1],说明杞菊地黄汤可能通过抑制 Caspase-3 的表达,从而推迟光感受器细胞凋亡发生的时间,并减

4 讨论

Caspase 在真核细胞凋亡中发挥极为重要的作用^[4]。迄今为止已鉴定了 18 种此类蛋白酶,按其被发现的前后顺序分别称为 Caspase1 ~ 18^[5-6]。Caspase 具有以下特点:①它是一种半胱氨酸蛋白酶,用半胱氨酸作为裂解底物的亲核基团。②其催化活性对底物的天冬氨酸有特异性要求,即催化时使底物的天冬氨酸残基羧基端的肽键断裂。③Caspase 以活性很低的酶原形式合成,通过蛋白酶水解去除氨基端的一段序列而被激活。④活化的 Caspase 能够特异地水解一套底物,从而导致细胞凋亡,此过程为不可逆反应。⑤正常情况下细胞内总存在有 Caspase 的抑制剂,以防止 Caspase 酶原偶然被激活而对正常细胞造成损伤。目前根据其结构同源性和功能的不同,Caspase 分为两大类:凋亡因子和炎症介导因子,凋亡因子又细分为凋亡启动因子和凋亡执行因子。凋亡启动因子由 Caspase-2,-8,-9,-10 组成,凋亡执行因子由 Caspase-3,-6,-7 组成,炎症介导因子包括 Caspase-1,-4,-5,-11,-12,-13,Caspase-14 ~ -18 的功能尚未确定。caspase-3 是 caspases 家族中重要的成员之一,大多数触发细胞凋亡的因素最终均需通过 Caspase-3 的活化来介导信号途径的传导^[7]。有证据表明,细胞凋亡的某些特征性标志,如染色体凝聚和 DNA 片段化等,均与 Caspase-3 有着直接的关系^[8-9]。

我们前期的实验证实 MNU 40 mg·kg⁻¹ ip 后,视网膜光感受器细胞发生凋亡,Caspase-3 表达量与外核层 TUNEL 阳性细胞数变化趋势一致,说明视网膜光感受器细胞凋亡与 Caspase-3 的表达变化有相关性^[10]。我们本次免疫组织化学和 Real-Time PCR 实验结果显示,Caspase-3 表达量的升降趋势在 2 种不同的检测方法中具有一致性,2 种检测结果均

轻光感受器细胞凋亡的程度。

[参考文献]

[1] 陈金卯,杨锦南,林少春,等. 杞菊地黄汤改善实验性大鼠视网膜变性的作用观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(23): 94.
[2] 陈金卯,杨锦南,李岱,等. 腹腔注射 MNU 对大鼠视网膜结构与功能的影响[J]. 眼科新进展,2004, 24(5): 349.

红景天对自发性高血压大鼠血压的调节及机制

王孝琴¹, 王保和^{2*}, 李玉红³, 赵亚莉³, 汪元元¹, 王怡³
(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300193;
3. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193)

[摘要] 目的:探讨藏药红景天对自发性高血压大鼠(SHR)血压的调节,并探讨其作用机制。方法:将 13 周龄雄性 SHR 适应饲养 2 周后随机分为 5 组,空白模型对照组(0.5% CMC),藏药红景天高、中、低剂量组(生药 1.08,0.27,0.068 g·kg⁻¹·d⁻¹),卡托普利组(0.015 g·kg⁻¹·d⁻¹),另设同龄正常血压的 Wistar-kyoto(WKY)大鼠 12 只为 WKY 对照组(0.5% CMC),连续 ig 4 周,采用尾动脉测压法测量 ig 给药前和单次 ig 红景天 12 h 内及连续 ig 4 周大鼠血压,检测大鼠血脂、血清一氧化氮(NO)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性及计算左心室质量指数(LVWI)。结果:单次 ig 12 h 和连续 ig 4 周后各给药组收缩压较 SHR 模型组明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),而模型组收缩压明显高于 WKY 组($P<0.01$);与模型组比较,红景天各给药组能降低 SHR 血清低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)水平($P<0.05$, $P<0.01$),升高 SHR 血清高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)水平及降低游离脂肪酸(FFA)的趋势,低剂量组可降低 SHR 血清总胆固醇(TC)水平($P<0.05$);与模型组比较,红景天高、中剂量组 NO 含量有不同程度升高,红景天高、低剂量组 SOD 明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),各给药组均能降低左心室质量指数。结论:藏药红景天可能通过调节脂代谢、升高 NO 含量、提高 SOD 活性及改善左室肥厚发挥对 SHR 大鼠的降压效应。

[关键词] 红景天; 自发性高血压大鼠; 一氧化氮; 超氧化物歧化酶
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0150-05
[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.011 [网络出版时间] 2012-03-27 17:05
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1705.011.html>

Regulating Effect and its Mechanism of Tibet *Rhodiola crenulate* on Blood Pressure in Spontaneous Hypertension Rat

WANG Xiao-qin¹, WANG Bao-he^{2*}, LI Yu-hong³, ZHAO Ya-li³, WANG Yuan-yuan¹, WANG Yi³

[收稿日期] 20111011(021)
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB505104)
[第一作者] 王孝琴,硕士研究生,E-mail:wxqinxue@126.com
[通讯作者] * 王保和,教授,博士生导师,E-mail:wbh3423@sina.com

[3] Wu Jiangmei, Adrienne Gorman, Zhou Xinghua, et al. Involvement of Caspase-3 in photoreceptor cell apoptosis induced by *in vivo* blue light exposure [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 3349.

[4] Wang J, Lenardo M J. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies [J]. J cell Sci, 2000, 113 (5): 753.

[5] Sakamaki K, Satou Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates [J]. J Fish Biol, 2009, 74 (4): 727.

[6] Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G K. Caspases-an update [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008, 151 (1): 10.

[7] 陈旭,王娟,蒋晓山,等. 莪术醇对肺癌 A549 细胞凋亡诱导因子、聚 ADP 核糖聚合酶及 Caspase-3 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (19): 157.

[8] Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, et al. Apoptosis: definition, mechanism, and relevance to disease [J]. Am J Med, 1999, 107 (5): 489.

[9] Poter A G, Janicke R U. Emerging roles of Caspase-3 in apoptosis [J]. Cell Death Differ, 1999, 6 (2): 99.

[10] 陈金卯,胡世兴,邓新国,等. Caspase-3 在 MNU 诱导的视网膜变性大鼠中的作用 [J]. 眼科研究, 2005, 23 (3): 238.

[责任编辑 聂淑琴]