

白蒺藜皂苷对慢性高眼压兔视网膜 SOD 活性和 MDA 含量的影响

李 诺¹, 黄丽娜², 曾 平²

作者单位:¹(430000) 中国湖北省武汉市, 湖北中医药大学;
²(518000) 中国广东省深圳市眼科医院

作者简介:李诺,女,湖北中医药大学 2010 级博士研究生,研究方向:青光眼、白内障。

通讯作者:黄丽娜,女,主任医师,博士研究生导师,研究方向:青光眼、白内障。linuo0419@163.com

收稿日期:2012-12-28 修回日期:2013-04-09

Influence of gross saponins from tribulus terrestris L on SOD activity and MDA content for chronic high intraocular pressure in rabbit

Nuo Li¹, Li-Na Huang², Ping Zeng²

¹Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, Hubei Province, China; ²Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Li - Na Huang. Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China. linuo0419@163.com
Received:2012-12-28 Accepted:2013-04-09

Abstract

• **AIM:** To observe influence of gross saponins from tribulus terrestris L (GSTT) on SOD activity and MDA content for chronic high intraocular pressure in rabbit, and discusses the retina oxidative damage inhibition on chronic high intraocular pressure model of rabbit.

• **METHODS:** Totally 24 healthy New Zealand rabbits were randomly divided into 4 groups: normal control group (A group); high intraocular pressure model blank group (B group); high intraocular pressure model with GSTT treated group (C group); high intraocular pressure model with Erigeron brevicapax hand mass (EBHM) treated group (D group). High intraocular pressure model was induced by 20g/L methylcellulose injection into the anterior chamber in B group, C group and D group. D group was injected 5 mg/kg GSTT and C group was injected 4.5mg/kg EBHM and measured intraocular pressure with Schiottz tonometer every day for 4 weeks. The retina tissue superoxide dismutase (SOD) and maleic dialdehyde(MDA) content were detected 28 days later.

• **RESULTS:** After glaucoma model of rabbit eyes were established, the intraocular pressure during observation period was maintained in 32-39mmHg; High intraocular pressure model blank group and normal control group,

EBHM treatment group, GSTT treatment group were compared, the differences of retina MDA, SOD content had statistical significance ($P < 0.05$); numerical difference between EBHM treatment group and GSTT group was not statistically significant ($P > 0.05$); EBHM treatment group, GSTT treatment group and normal control group were compared, the content of MDA in the retina was still slightly higher ($P < 0.05$), the content of SOD slightly lower ($P < 0.05$)

• **CONCLUSION:** GSTT can effectively improve the retina SOD activity of chronic high intraocular pressure in rabbit and reduce the content of MDA, which has a protective effect of persistent high intraocular retinal oxidative stress.

• **KEYWORDS:** gross saponins from tribulus terrestris L; chronic high intraocular pressure; superoxide dismutase; maleic dialdehyde; rabbits

Citation: Li N, Huang LN, Zeng P. Influence of gross saponins from tribulus terrestris L on SOD activity and MDA content for chronic high intraocular pressure in rabbit. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(5):854-856

摘要

目的: 观察白蒺藜皂苷对慢性高眼压兔 SOD 活性和 MDA 含量的影响,探讨其对兔慢性高眼压模型视网膜氧化损伤的抑制作用。

方法: 将 24 只健康新西兰白兔随机分为正常对照组(A 组),高眼压模型空白组(B 组),高眼压模型灯盏细辛(erigeron brevicapax hand mass,EBHM) 治疗组(C 组),高眼压模型蒺藜皂苷(gross saponins of tribulus terrestris, GSTT) 治疗组(D 组);以 20g/L 甲基纤维素前房注射建立兔慢性高眼压模型,EBHM 治疗组实验兔每日耳缘静脉推注 EBHM 注射液 4.5mg/kg, GSTT 治疗组实验兔每日耳缘静脉推注 GSTT 针剂 5mg/kg,连续用药 4wk 并每日测眼压,于第 28d 摘取眼球检测兔视网膜组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 活性和丙二醛(maleic dialdehyde,MDA) 含量。

结果: 兔眼造成青光眼模型后,其眼压在观察期内维持在 32~39mmHg;高眼压模型空白组与正常对照组、EBHM 治疗组、GSTT 组比较,视网膜中 MDA 和 SOD 的含量差异有统计学意义($P < 0.05$),EBHM 治疗组、GSTT 组之间数值差异无统计学意义($P > 0.05$),EBHM 治疗组、GSTT 组与正常对照组比较视网膜中 MDA 的含量仍略高($P < 0.05$),SOD 的含量略降低($P < 0.05$)。

结论: 白蒺藜皂苷能有效提高慢性高眼压下兔视网膜中 SOD 活性,降低 MDA 含量,从而对持续性高眼压视网膜

氧化应激具有保护作用。

关键词:白蒺藜皂苷;慢性高血压;SOD;MDA;兔

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.05.04

引用:李诺,黄丽娜,曾平.白蒺藜皂苷对慢性高血压兔视网膜SOD活性和MDA含量的影响.国际眼科杂志2013;13(5):854-856

0 引言

青光眼是一种以进行性视神经损害和视野缺损为特征的致盲性眼病,它导致视功能损害的病理基础是视网膜神经节细胞的进行性凋亡及视神经纤维的丢失。目前对青光眼的治疗方法主要是通过药物或手术降低眼压,以期达到保护视神经的目的,然而临床上很多病例在眼压降至正常水平后仍不能阻止视功能的进行性损害,因此如何阻止视网膜神经节细胞的死亡并有效保护和恢复青光眼患者的视功能成为当前青光眼治疗的重点。视网膜是全身需氧量最多的组织之一,对缺氧极其敏感。在高血压条件下缺血、缺氧造成组织损伤后会产生大量的自由基,直接与脂质及核酸蛋白发生反应,并增加兴奋性毒素的释放,加速神经元的死亡。因此,阻止氧自由基的生成及提高氧自由基的清除效率,阻止青光眼视网膜神经节细胞氧化应激引起的损害是青光眼视神经保护治疗的研究重点之一。我们用蒺藜皂苷(gross saponins of tribulus terrestris, GSTT)对慢性高血压模型动物进行治疗,观察其对高血压状态下视网膜丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)与超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)变化的影响,以了解其对青光眼的治疗作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰白兔24只,10~12月龄,体质量1.8~2.5kg,雌雄各半,由广东省医学动物实验中心提供(许可证号:粤监证字2008A049)。用裂隙灯显微镜、直接眼底镜检查眼前节及眼底无明显异常:外眼正常,角膜无充血,角膜清亮,房水清亮,虹膜淡粉色,放射状纹理清晰可见,瞳孔圆,晶状体正位,后节(-);以10g/L丁卡因滴眼液表面麻醉后, Schiotz 眼压计连续测量眼压3d,1次/d,眼压均<21mmHg(1mmHg=0.133kPa)的动物方可采用。白蒺藜皂苷粉剂(购自吉林敖东洮南药业股份有限公司)。灯盏细辛(erigeron brevicapax hand mass, EBHM)注射液(购自云南生物谷药业有限公司)。

1.2 方法 将24只健康新西兰白兔随机分为正常对照组(A组),高血压模型空白组(B组)和高血压模型EBHM治疗组(C组),高血压模型GSTT治疗组(D组)。每组6只兔12眼。

1.2.1 高血压模型的制备 选用对眼压无明显影响的3g/L戊巴比妥钠1mL/kg肌注麻醉,眼部表面麻醉后,9:00位沿角巩膜缘内1mm抽出前房房水0.2mL后,高血压模型眼等量注入20g/L甲基纤维素,兔眼注射20g/L甲基纤维素后,外眼正常,睑结膜轻中度充血,球结膜混合充血,部分结膜血管充血、迂曲、扩张,角膜轻度水肿、雾化,前房加深,房水基本清亮,虹膜色淡,纹理不清,阶段性虹膜萎缩,瞳孔扩大,晶状体在位。如在实验周期中发现眼压有所下降(即眼压低于32mmHg),即予以模型眼前房

补注甲基纤维素0.1mL,使其观察期内眼压均维持在32~39mmHg^[1]。维持高血压状态达4wk。对照眼注入生理盐水,均在30min后测量眼压。

1.2.2 给药 正常对照组正常喂养,不做任何处理。高血压模型组造成高血压模型。EBHM治疗组造成高血压模型,将给药组动物称质量,每日耳缘静脉给药4.5mg/kg(约等于成人用量),1次/d。GSTT治疗组正常喂养,制成高血压模型,将给药组动物称质量, GSTT粉剂溶于生理盐水中,每日耳缘静脉给药5mg/kg(约等于成人用量),1次/d。连续用药4wk。

1.2.3 取材及标本制作 连续用药28d后,分别空气栓塞处死兔子。眼球12:00位缝线标记后,立即完整摘除(包括球后视神经2mm),沿标记缝线-视神经连线对剖眼球,去除眼内容物,分离视网膜及视神经,保存于-80℃冰箱待检MDA及SOD含量。

1.2.4 眼压测量 采用Schiotz眼压计,分别于造模前3d、造模后30min、造模后每日测量眼压并记录,共计1mo^[2]。测前校正眼压计,以避免人为误差。

1.2.5 各组兔眼超氧化物歧化酶(SOD)的检测 造模后4wk,称取组织重量,按重量体积比加入19倍生理盐水制成5%的组织匀浆,2500r/min,离心10min,取上清组织匀浆,用旋涡混匀器充分混匀,置37℃恒温水浴40min,加入显色剂考马斯亮蓝1mL并混匀,室温放置10min,于波长550nm处,使用1cm光径4mm内径比色杯,蒸馏水调零比色,采用SOD试剂盒(南京建成生物研究所生产)检测^[3]。计算公式(OD为光密度):

$$\text{蛋白含量} = \frac{\text{测定管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \frac{\text{蛋白标准浓度}}{0.563 \text{ mgprot/mL}} \times \frac{\text{样本测定前}}{\text{稀释倍数}}$$

$$\text{组织匀浆中 SOD 活力 (U/mgprot)} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量 (mL)}} \div \text{组织中蛋白含量 (mgprot/mL)}$$

1.2.6 各组兔眼丙二醛(MDA)含量的检测 取视网膜组织加入300μL冷生理盐水,用玻璃匀浆管在冰浴中匀浆3~5min,制成的组织匀浆2500r/min,离心10min,取上清再用生理盐水10倍稀释后取样50μL待测。混匀,静置10min,于595nm波长,1cm光径,蒸馏水调零,测定各管OD值。取上述剩余上清组织匀浆旋涡混匀器混匀,试管口用保鲜薄膜扎紧,用针头刺一小孔,沸水浴40min,取出后流水冷却,然后3500r/min,离心10min,取上清,532nm处,1cm光径,蒸馏水调零,测各管吸光度值。采用MDA试剂盒(南京建成生物研究所生产)检测^[4]。计算公式(OD为光密度):

$$\text{蛋白含量} = \frac{\text{测定管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \frac{\text{蛋白标准浓度}}{0.563 \text{ mgprot/mL}} \times \frac{\text{样本测定前}}{\text{稀释倍数}}$$

$$\text{组织 MDA 含量 (nmol/mgprot)} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{管空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{对照管吸光度}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{10 \text{ nmol/mL}} \div \text{待测样本蛋白含量 (mgprot/mL)}$$

统计学分析:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS 13.0软件包统计分析,采用独立样本t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔眼不同时间眼压测量值 各组兔眼不同时间眼压值比较,均具有显著统计学意义(P<0.01,表1);造模前及造模后不同时间比较,差异具有显著统计学意义

表1 各组兔眼造模前后眼压比较 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

分组	n(眼)	造模前	造模后 30min	造模后 2wk	造模后 4wk
对照组	12	12.6±1.1	33.4±3.0	12.4±1.5	12.9±1.2
模型组	12	11.6±1.1	37.6±2.8	38.4±2.9	38.9±2.4
EBHM 组	12	13.0±1.6	38.1±2.4	38.1±2.7	38.4±2.9
GSTT 组	12	13.4±1.8	37.3±2.4	38.7±3.1	37.8±2.7

($P < 0.01$);造模后 2wk 与造模后 4wk 比较,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。四组用同样方法造模,但 A 组兔眼前房注射生理盐水,B,C,D 组注射甲基纤维素,在注射后 30min,各组眼压均升高,但 A 组兔眼的生理盐水经循环代谢后,眼压降至正常,而 B 和 C 组眼压仍持续在高水平。

2.2 各组兔眼超氧化物歧化酶含量的变化 各组兔眼 SOD 含量的变化见表 2。除正常对照组外,兔视网膜中 SOD 含量均减少,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组与正常对照组比较,视网膜中 SOD 的含量差异有统计学意义($P < 0.05$)。给药组与模型组之间,数值差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模后 28d,正常对照组的兔视网膜神经节细胞中 SOD 的含量高于模型组及 EBHM 治疗组、GSTT 治疗组($P < 0.05$);药物治疗组的兔视网膜神经节细胞中 SOD 的含量高于模型组($P < 0.05$);两组药物治疗组的 SOD 含量无统计学差异($P > 0.05$);EBHM 及 GSTT 都可以提高慢性高血压视网膜 SOD 的活性。

2.3 各组兔眼丙二醛含量的变化 除 A 组外,兔视网膜中 MDA 含量均增加,B 组与 A 组比较,视网膜中 MDA 含量差异有统计学意义($P < 0.05$)。B 组与 C 组、D 组之间数值差异有统计学意义($P < 0.05$)。C 组与 D 组之间数值差异无统计学意义($P > 0.05$)。C 组、D 组与 A 组比较视网膜中 MDA 含量略增加($P < 0.05$)。造模后 28d,模型组及 EBHM 治疗组、GSTT 治疗组的兔视网膜神经节细胞中 MDA 的含量高于正常对照组($P < 0.05$);模型组的兔视网膜神经节细胞中 MDA 的含量高于药物治疗组($P < 0.05$);两组药物治疗组的 MDA 含量无统计学差异($P > 0.05$);EBHM 及 GSTT 都可以降低慢性高血压视网膜 MDA 的活性。

3 讨论

中药蒺藜是指蒺藜科蒺藜属植物蒺藜(Tribulus Terrestris L.)的果实,具有破症瘕积聚、补肝肾、平肝潜阳等功效。实验用 GSTT 是从蒺藜地上全草中提取的有效成分之一,是以甾体皂苷为主的十多种皂苷的混合物,主要包括呋甾醇和螺甾醇两类皂苷,为黄色粉末,易溶于水^[5,6]。研究表明刺蒺藜多糖可通过清除自由基和抗脂质氧化,对鼠脾细胞 DNA 损伤具有保护作用。EBHM 具有改善视神经轴浆运输^[7],抑制缺血诱导神经元凋亡的作用^[8]。氧自由基对青光眼发病具有关键性作用,一般来说,自由基通过 4 种途径损害机体:(1)核糖亚链断裂;(2)蛋白多肽链断裂;(3)脂质过氧化作用;(4)能量代谢障碍^[9]。视网膜神经节细胞富含不饱和脂肪酸,易受到自由基的攻击,同时自由基可促使兴奋性毒素的释放,两者共同作用对细胞有毒性,引起 RGCs 的凋亡。有效地清除视网膜中氧自由基,就可以对视网膜神经节细胞起到保护的作用。脂质过氧化是自由基攻击不饱和脂肪酸引起的。视网膜光感受器细胞外节膜盘中含有大量的多价不饱和脂肪酸,因而极易受到过氧化作用的损伤。MDA 是自由基脂质过氧化反应最终代谢产物,测定 MDA 的含量可以反映体内脂质过氧化的程度,间接反映出自由基对组织

表2 各组造模后 28d SOD 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, U/mgprot)

分组	n(眼)	SOD
对照组	6	88.58±3.08
模型组	6	46.78±2.35
EBHM 组	6	66.21±2.89
GSTT 组	6	67.31±3.01

表3 各组兔眼造模后 28d MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, nmol/mgprot)

分组	n(眼)	MDA
对照组	6	7.015±0.344
模型组	6	18.009±0.276
EBHM 组	6	12.121±0.269
GSTT 组	6	13.153±0.266

细胞的损伤程度;SOD 是自由基清除剂,测定 SOD 的含量可以反映自由基的清除能力^[10,11]。本实验以 EBHM 作为对照药物,旨在证实白蒺藜皂苷具有保护视网膜神经节细胞、抑制其凋亡的作用。本实验表明,在慢性高血压持续状态下视网膜中 SOD 活性显著下降,MDA 含量明显升高,由此提示自由基损伤可能在青光眼的视网膜损伤中起重要作用。GSTT 与 EBHM 虽然无降眼压的作用,然而能有效地提高慢性高血压视网膜的 SOD 活性,降低 MDA 含量,从而清除自由基,达到保护视网膜功能的作用。我们将白蒺藜皂苷应用于清除视网膜中的氧自由基,检测其 SOD 活性和 MDA 含量变化,了解其抗视网膜细胞 DNA 氧化能力,对临床有重要的指导意义,其可作为青光眼神经保护候选药物之一,具有良好的临床应用前景。

参考文献

- 卢晓峰,阎元奎. bFGF 对高血压下兔视网膜神经节细胞的保护作用. 内蒙古医学院学报 2004;26(1):21-25
- 王强,魏厚仁,樊郑军. 家兔眼压测量的标定问题. 眼科研究 1994;12(4):224-226
- 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海:上海科学技术出版社 1991:114
- 杨新光,孙董洁,王颖维,等. 藏红花提取液对慢性高血压兔视网膜 SOD 和 MDA 的影响. 国际眼科杂志 2008;8(1):47-49
- 段金殿,周荣汉. 中国蒺藜科药用植物的研究现状及展望. 中草药 1993;21(6):320-323
- 侯俊英,王秀华,李红,等. 蒺藜皂苷对缺血再灌注损伤心肌细胞保护作用实验研究. 中国药理学通报 2004;20(2):418-420
- 朱益华,蒋幼芹,刘忠浩,等. 灯盏细辛注射液对鼠实验性高血压视神经轴浆运输的影响. 中华眼科杂志 2000;36(4):289-291
- 孙晖,李青春,李有杰,等. 灯盏细辛注射液对大鼠青光眼模型的保护作用. 滨州医学院学报 2007;30(5):330-332
- 孙为荣,赵桂秋,刘芳毅,等. 急性高血压视网膜的自由基损伤及自由基清除剂的应用. 中国实用眼科杂志 1995;13(5):293-295
- 谢佩玉,张晓梅,松仓诚,等. 高糖条件下糖康乐对兔视网膜色素上皮细胞超氧化物歧化酶表达的影响. 国际眼科杂志 2007;7(6):1584-1586
- Chang JR, Xu DQ. Effects of formaldehyde on the activity of superoxide dismutases and glutathione peroxidase and the concentration of malondialdehyde. WeiSheng YanJiu 2006;35(5):653-655