

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.03.018

杞灵颗粒对小鼠视网膜色素上皮细胞氧化应激损伤的影响

安娜^{1,2}, 庄曾渊¹, 梁丽娜^{*}, 陈强¹, 侯乐¹

(1. 中国中医科学院眼科医院, 北京市石景山区鲁谷路 33 号; 100040; 2. 国家食品药品监督管理总局药品审评中心)

摘要 目的 探讨杞灵颗粒治疗年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的可能作用机制。方法 小鼠予 0.8% 氢醌饮食饲养 5 个月建立小鼠 AMD 模型, 随机分为模型组、杞灵低剂量组、杞灵中剂量组、杞灵高剂量组和叶黄素组 (分别给予等体积蒸馏水, 杞灵颗粒干浸膏 3.75、7.5 和 15 g/kg, 叶黄素片水溶液 0.18 g/kg 灌胃), 每组 17 只。予灌胃治疗, 同时 18 只小鼠常规饲养作为正常组。观察各组小鼠视网膜病理形态, 视网膜色素上皮细胞 (RPE) -Bruch 膜-脉络膜超微结构, RPE 细胞凋亡率和 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 的表达, 以及血清总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 含量。结果 与模型组比较, 治疗 14 天时, 杞灵高、中、低剂量组和叶黄素组对 RPE 细胞数量有保护作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 28 天时, 杞灵低、中剂量组和叶黄素组对 RPE 细胞数量有明显保护作用 ($P < 0.01$)。透射电子显微镜观察, 模型组和叶黄素组 RPE 细胞内出现空泡样改变, 玻璃膜 (Bruch 膜) 比正常组厚, 外胶原层见层状沉积物。杞灵中剂量组超微结构基本正常。TUNEL 检测示, 与模型组比较, 14 天时杞灵低、中剂量组和叶黄素组及 28 天时杞灵中剂量组和叶黄素组对 RPE 细胞凋亡有抑制作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。8-OHdG 免疫荧光法发现, 与模型组比较, 14 天时, 杞灵低、中剂量组和叶黄素组对 RPE 细胞 DNA 有显著保护作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 28 天时, 杞灵低、中剂量组有保护作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。造模后 14 天和 28 天, 杞灵中剂量组 T-SOD 活性均高于模型组 ($P < 0.05$), 而在保护 GSH-PX 活性方面, 仅 28 天时叶黄素组 GSH-PX 活性高于模型组 ($P < 0.05$)。结论 杞灵颗粒可减轻 AMD 模型小鼠 RPE-Bruch 膜-脉络膜的损伤, 降低 RPE 细胞的凋亡率, 可能是其治疗 AMD 作用机制之一。

关键词 年龄相关性黄斑变性; 杞灵颗粒; 视网膜色素上皮细胞; 氧化应激

2013 年世界卫生组织 (WHO) 报道称, 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是全球排名第三的致盲原因, 也是发达国家发病率最高的致盲性疾病^[1]。中医学认为, AMD 的主要病机责之于衰老引起的肾精亏虚, 气血不足。我们临床采用杞灵颗粒治疗早、中期 AMD 患者具有一定疗效, 本研究通过建立早、中期 AMD 小鼠模型, 探讨杞灵颗粒治疗 AMD 的可能作用机制, 现报告如下。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 健康无眼疾小鼠 102 只, 体重 25 ~ 36 g, 6 ~ 7 月龄, 雌性, 购自北京维通利华实

验动物技术有限公司, 实验动物许可证编号: SCXK 京 2012-0001。适应性饲养 7 天后, 将毛发稀疏、反应和行动较迟钝、体质量在 27 ~ 33 g 范围以外的个体剔除, 共剔除 9 只小鼠。

1.2 药物和试剂

杞灵颗粒干浸膏, 由枸杞子、淫羊藿、当归 (比例为 1.5 : 1 : 1) 等组成, 批号 20150727, 由中国中医科学院中药所提供。氢醌 (HQ), Sigma-Aldrich, 批号 BCBK0735V; 苏木素-伊红染色液 (HE), LEAGENE, 批号 201550730; 总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒, 南京建成生物科技有限公司, 批号 20150914; 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 试剂盒, 南京建成生物科技有限公司, 批号 20150908; 末端脱氧核苷酸转移酶标记法 (TUNEL) 试剂盒, Roche, 批号 11285100; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI), life Technologies, 批

基金项目: 国家自然科学基金 (81503621); 北京市中医药科技项目 (JJ2013-67)

* 通讯作者: lianglina163@163.com, (010) 68875526

号 1579625; 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OhdG), Abcam, 批号 AE042337; 二抗 (IgG/AF555), 北京博奥森生物技术有限公司, 批号 AE042337。叶黄素片 (博士伦, 批号 2813)。

1.3 实验仪器

RM2245 石蜡切片机 (Leica); JEM-1400 透射电子显微镜 (JEOL); CM1850 冰冻切片机 (Leica); 300BB 紫外/可见光分光光度计 (Thermo); IX2-ZDC 荧光显微镜 (OLYMPUS)。

2 方法

2.1 造模方法

参照文献 [2], 93 只 (剔除 9 只体重不符合要求) 小鼠被喂予基于基础纯净合成的氢醌饮食, 该食物能提供小鼠生长、发育、妊娠和哺乳所需的一切重要营养, 由质量分数 19.00% 蛋白质、4.50% 脂肪、4.29% 纤维、66.05% 碳水化合物、1.80% 亚油酸、0.40% 油酸、0.40% 棕榈酸和 1.05% 月桂酸组成, 同时含 0.80% 的氢醌, 0.5 ppm 维生素 K 和 0.02% 牛磺酸。饲料均由北京科奥协力饲料有限公司加工制作, 造模时间为 5 个月。

2.2 动物分组及处理

造模过程中, 死亡 8 只小鼠, 将余下的 85 只小鼠按随机数字表法分为模型组、杞灵低剂量组、杞灵中剂量组、杞灵高剂量组、叶黄素组, 每组 17 只。另设正常组小鼠 18 只, 饲料为不含氢醌的上述配方食物。杞灵低、中、高剂量组分别给予杞灵颗粒干浸膏 3.75、7.5 和 15 g/kg 灌胃, 叶黄素组给予叶黄素片水溶液 0.18 g/kg 灌胃, 模型组给予等体积蒸馏水灌胃, 正常组小鼠不予灌胃。各组均灌胃 28 天。

2.3 观察指标和方法

2.3.1 视网膜病理学检查 14 天和 28 天时处死小鼠, 迅速摘取左眼眼球, 立即置于 4℃、4% 多聚甲醛中固定 36 h, 经乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡后行石蜡包埋。石蜡切片机行垂直视网膜的连续 4 μm 切片, HE 染色后光学显微镜 (Lecia, DM2500) 下观察视网膜各层结构并拍照, 取视盘沿旁开 200 μm 的视网膜色素上皮细胞 (RPE) 区域, 计数该范围内形态正常者的 RPE 细胞数量, 计数随机数字表法选取的 10 张切片共 20 个 RPE 区域。

2.3.2 透射电子显微镜观察 RPE-Bruch 膜-脉络膜超微结构 14 天和 28 天时分别处死小鼠 3 只, 快速摘取左眼眼球, 即刻置于 4℃、2.5% 戊二醛中固定 0.5 h, 解剖显微镜 (苏州六六视觉科技股份

有限公司, YZ20T4) 下, 将视乳头颞侧 1 mm 上方全层眼球壁切成 1 mm × 1 mm × 2 mm 大小的长条形。经 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸固定后, 乙醇脱水, 环氧丙烷和树脂置换后聚合包埋, 修块, 半薄切片经光学显微镜 (Lecia, DM2500) 定位, 超薄切片后 JEM-1400 透射电子显微镜观察。

2.3.3 TUNEL 检测细胞凋亡 14 天和 28 天时分别处死小鼠 8 只, 快速摘取右眼眼球, 置于 4℃、4% 多聚甲醛中固定, 蔗糖置换后 OCT 包埋, 液氮冷冻。使用冰冻切片机在 -23℃ 下行垂直于视网膜的 8 μm 冰冻切片, 按照 TUNEL 试剂盒说明进行检测, DAPI 复染。荧光显微镜下观察, 每组随机数字表法选取 3 张片子, 每张片子随机 (抽签法) 选取 4 个视野, 计数 RPE 凋亡细胞和 RPE 细胞总数, 计算凋亡率。

2.3.4 T-SOD 和 GSH-PX 活力检测 14 天和 28 天时分别取小鼠外周血清样本, 按照 T-SOD 试剂盒和 GSH-PX 试剂盒进行操作, 紫外/可见光分光光度计分别于 550 nm 和 412 nm 波长处, 1 cm 光径比色杯, 双蒸水调零, 比色测出各组小鼠血清 OD 值。

2.3.5 RPE 细胞中 8-OhdG 检测 14 天和 28 天时分别冰冻切片经 1% TritonX-100 溶液打孔, 体积分数 10% 山羊血清封闭, 加入一抗鼠抗 8-OhdG (1 : 500, 0.25% TritonX-100 溶液稀释), 23 ~ 25℃ 湿盒内孵育过夜, PBST 浸洗后, 加入二抗羊抗鼠 AF555 (1 : 400, PBS 溶液稀释), 20 ~ 25℃ 暗湿盒内孵育 2 h, DAPI 复染, 荧光显微镜下观察, 每组随机数字表法选取 3 张片子, 每张片子随机 (抽签法) 选取 4 个视野, 计数 RPE 细胞中 8-OhdG 阳性表达细胞及 RPE 细胞总数, 计算损伤率。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件, 数据用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。符合方差齐性的数据多组间的比较采用单因素方差分析, 不符合方差齐性的多组间的比较采用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠不同时间视网膜病理结构比较

HE 染色后光学显微镜下观察, 正常组小鼠视网膜各层次分明, RPE 细胞为边界平直的四边形, 排列整齐, 形态规则, 内外核层排列整齐; 模型组可见 RPE 细胞结构不完整, 伴有空泡样改变, 形态不规则, 色素紊乱, 数量较少, 细胞核呈椭圆形、肾形等不规则形。

表 1 示, 模型组 14、28 天 RPE 细胞数量均较正常组显著减少 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 14 天时杞灵高、中、低剂量组和叶黄素组 RPE 细胞数量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 28 天时杞灵低、中剂量组和叶黄素组 RPE 细胞数量亦升高 ($P < 0.01$)。28 天时杞灵中剂量组 RPE 细胞数目高于杞灵高剂量组 ($P < 0.01$)。

3.2 各组小鼠 28 天时 RPE-Bruch 膜-脉络膜超微结构的比较

图 1 示, 正常组 RPE 细胞质中含有丰富的线粒体, 较多的色素颗粒, 细胞顶部微绒毛数目多, 比较长; Bruch 膜结构规整, 厚度均匀。模型组 RPE 细胞微绒毛变短, 部分消失; 胞浆中可见空

泡样改变; Bruch 膜不规则增厚, 外胶原层见层状沉积物, 成纤维状及无定形状, 脉络膜毛细血管基底膜可见突起的内皮细胞。杞灵低剂量组 RPE 细胞质中见大量空泡样改变, 微绒毛明显变短、缺失, Bruch 膜形态不规则, 层内有组织缺失样改变。杞灵中剂量组 RPE 细胞超微结构基本正常, Bruch 较正常稍微增厚, 层内可见膜包裹结合体。杞灵高剂量组 RPE 细胞微绒毛数目较多、长, 形态规整, RPE 细胞质内可见少量空泡样改变; Bruch 膜轻度增厚, 层内结构不均匀, 可见组织缺失样改变。叶黄素组 RPE 微绒毛明显减少, 细胞质空泡样改变; Bruch 膜增厚, 层内可见颗粒状及团状沉积物。

表 1 各组不同时间 RPE 细胞数目、凋亡率、8-OHdG 表达率以及 T-SOD、GSH-PX 活力的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	RPE 细胞数目(个)	RPE 细胞凋亡率(%)	RPE 细胞 8-OHdG 表达率(%)	T-SOD(U/ml)	GSH-PX(U/ml)
正常组	14 天	7.050 ± 1.55** (20)	0** (12)	1.391 ± 2.55** (12)	154.116 ± 14.82** (8)	218.408 ± 53.24 (8)
	28 天	6.850 ± 1.98** (20)	0** (12)	0.842 ± 1.78** (12)	124.508 ± 4.99* (8)	288.072 ± 63.59 (8)
模型组	14 天	3.900 ± 1.21 (20)	8.692 ± 4.86 (12)	38.786 ± 7.66 (12)	127.086 ± 16.62 (8)	155.358 ± 36.83 (8)
	28 天	3.050 ± 1.64 (20)	7.747 ± 3.76 (12)	33.347 ± 11.16 (12)	104.545 ± 14.49 (8)	149.963 ± 62.82 (8)
杞灵低剂量组	14 天	5.200 ± 1.58* (20)	4.362 ± 3.71* (12)	28.323 ± 8.35* (12)	143.455 ± 13.71 (8)	208.343 ± 45.21 (8)
	28 天	4.750 ± 1.16** (20)	4.472 ± 2.91 (12)	23.117 ± 10.56* (12)	118.790 ± 16.64 (8)	195.458 ± 68.62 (8)
杞灵中剂量组	14 天	5.750 ± 1.41** (20)	3.498 ± 2.63** (12)	20.016 ± 9.39** (12)	151.974 ± 12.57* (8)	217.529 ± 69.29 (8)
	28 天	5.400 ± 1.96** (20)	2.368 ± 2.49** (12)	17.998 ± 6.87** (12)	122.416 ± 11.71* (8)	223.675 ± 48.62 (8)
杞灵高剂量组	14 天	5.300 ± 1.81* (20)	6.155 ± 3.60 (12)	33.347 ± 11.16 (12)	143.566 ± 17.61 (8)	190.236 ± 25.20 (8)
	28 天	3.800 ± 1.70 ^{△△} (20)	5.236 ± 3.07 (12)	28.561 ± 9.30 (12)	107.633 ± 15.36 (8)	180.619 ± 72.55 (8)
叶黄素组	14 天	5.150 ± 1.50* (20)	4.471 ± 2.43* (12)	30.310 ± 10.16* (12)	143.047 ± 18.41 (8)	213.941 ± 53.24 (8)
	28 天	4.800 ± 1.36** (20)	4.100 ± 2.51* (12)	27.256 ± 10.24 (12)	118.570 ± 13.89 (8)	241.808 ± 75.66* (8)

注: RPE, 视网膜色素上皮细胞; 8-OHdG, 8-羟基脱氧鸟苷; T-SOD, 总超氧化物歧化酶; GSH-PX, 谷胱甘肽过氧化物酶; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与杞灵中剂量比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; () 内为标本数, 其中 RPE 细胞数目列为 RPE 区域数

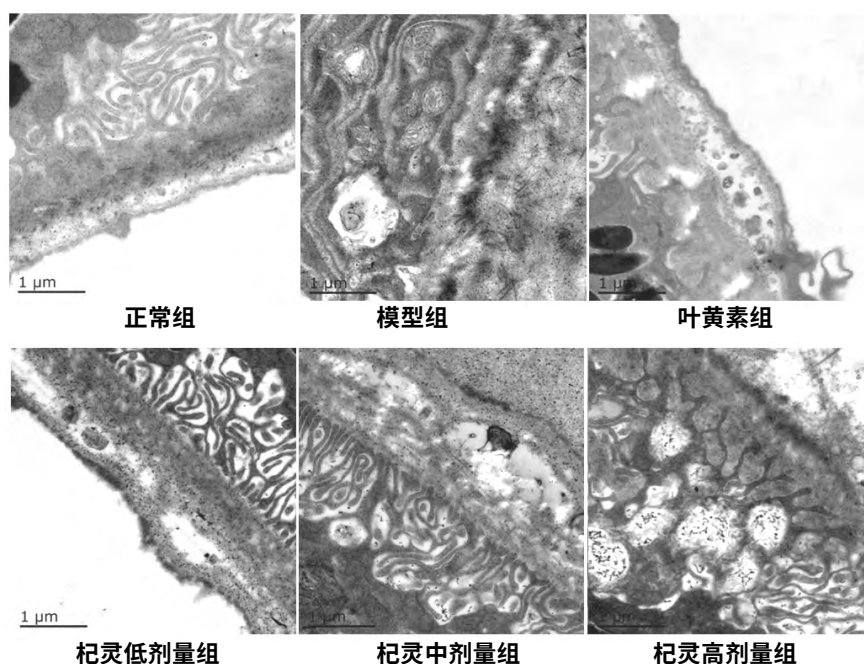


图 1 各组小鼠 28 天时 RPE-Bruch 膜-脉络膜超微结构图 ($\times 25000$)

3.3 各组小鼠不同时间 RPE 细胞凋亡比较

双染后的凋亡细胞显紫红色，形态呈环状、月牙状和均匀固缩状。14 天和 28 天时，模型组可见较多 RPE 细胞凋亡，内、外核层散在细胞凋亡，各给药组 RPE 细胞凋亡较模型组减少，未见内、外核层细胞凋亡，其中杞灵中剂量组凋亡细胞最少。表 1 示，与模型组比较，14 天时杞灵中、低剂量组和叶黄素组 RPE 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)，而杞灵高剂量组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。28 天时，杞灵中剂量组和叶黄素组 RPE 细胞凋亡率较模型组亦降低 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)，杞灵低、高剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.4 各组小鼠不同时间 RPE 细胞 8-OHdG 表达比较

14 天时，模型组 RPE 细胞可见较多的 8-OHdG 阳性染色，内、外核层散在阳性染色，用药组阳性表达较模型组少，叶黄素组和杞灵高剂量组内外核层见阳性染色，杞灵低、中剂量组未见，其中杞灵中剂量组阳性表达最少。28 天时，除正常组外各组均见 RPE 细胞，内、外核层细胞阳性染色，其中杞灵中剂量组表达最少，模型组表达最多。正常组 RPE 细胞散在微弱的 8-OHdG 表达，内、外核层未见阳性染色。

表 1 示，与模型组比较，14 天时，杞灵低、中剂量组和叶黄素组 RPE 细胞 8-OHdG 表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，而杞灵高剂量组无明显变化 ($P > 0.05$)。28 天时，杞灵中、低剂量组 8-OHdG 表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，叶黄素组和杞灵高剂量组无变化 ($P > 0.05$)。

3.5 各组小鼠不同时间血清 T-SOD 和 GSH-PX 活力比较

表 1 示，造模后 14 天和 28 天时模型组 T-SOD 活力较正常组降低，杞灵中剂量组 T-SOD 活性均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，而杞灵低、高剂量组、叶黄素组与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，杞灵高、中、低剂量组和叶黄素组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。14 天时与模型组比较，杞灵高、中、低剂量组和叶黄素组 GSH-PX 活性差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)；28 天时叶黄素组 GSH-PX 活性高于模型组 ($P < 0.05$)，杞灵低、中、高剂量组与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，杞灵高、中、低剂量组和叶黄素组间差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 讨论

氢醌是吸烟时产生的主要有害物质，是一种促

氧化剂，HQ 进入细胞后可拮抗与电子转运相关的线粒体氧化酶的底物，导致线粒体内过氧化物大量增加，反过来破坏线粒体膜后释放到细胞质中，释放至细胞质中的过氧化物进一步转化为氢氧根负离子和羟基自由基，引起蛋白质氧化及脂质过氧化损伤^[5-4]。氢醌的靶细胞除了 RPE 外，还攻击脉络膜毛细血管内皮细胞，表现为内皮增厚、窗口样结构减少、细胞突起侵入 Bruch 膜，Gottsch 等^[5]认为，这些改变导致 RPE 下沉积物的形成，影响了 Bruch 膜的通透性，除此之外，感光细胞内亦含有大量的线粒体，因此可能是氧化损伤的另外靶细胞，其病变结果也参与了 RPE 下沉积物的形成。我们前期的实验发现，HQ 诱导的 C57BL/6 小鼠能在相对短的时间内造成 Bruch 膜类玻璃膜疣样沉积和 RPE 损伤凋亡，可作为研究早、中期 AMD 的理想模型^[6]。

AMD 属中医学“视瞻昏渺”范畴，《审视瑶函》谓其病机与“血少神劳与损元”相关，即元气虚，肾精不足导致视力下降。研究显示，本病因肝肾亏虚而起并贯穿整个进展过程，不论 AMD 为何种类型，中医辨证均应注意滋养精血，培元扶正^[7]。杞灵颗粒功效为补肾益精、养血明目，基本药物组成包括枸杞子、淫羊藿、当归等。现代药理学研究表明，枸杞子提取物及其成分叶黄素/玉米黄质可减轻氧化应激损伤引起的小鼠 RPE 细胞损害，其机制为抑制半胱氨酸组织蛋白酶 B (Cat B) 和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (Cys C) 的表达，提示本药具有较好的抗 AMD 作用^[8]。另外，枸杞子提取物可保护高脂饮食联合饮水中加入 0.8% 氢醌诱导的 C57BL/6 小鼠的 RPE 细胞，抑制 RPE 细胞下沉积物形成及 Bruch 膜增厚，其可能机制为通过减少活性氧介质产生，下调 Cat B、Cys C 的表达^[9]。淫羊藿苷可以明显减少糖尿病大鼠心肌胶原含量及心肌线粒体活性氧簇 (ROS) 水平，高剂量淫羊藿苷明显抑制了心肌线粒体丙二醛 (MDA) 含量，增加了线粒体 SOD 活性^[10]。当归多糖能通过抑制氧化损伤，减少 ROS 产量及下调 p16 mRNA 表达延缓小鼠造血干细胞衰老。8-OHdG 阳性表达是线粒体损伤的标志^[11]。线粒体损伤则可开启由线粒体介导的细胞凋亡途径，RPE 细胞凋亡是 AMD 重要的病理改变^[12-13]。本研究结果显示，本研究初步证明杞灵颗粒对 RPE 细胞氧化应激损伤有保护作用，其作用靶点可能基于线粒体途径发挥作用，其具体作用机制尚需进一步探讨。

参考文献

[1] World Health Organization (2013) Available at <http://>

www.who.int/en/. Accessed 10 Aug 2013.

- [2] ESPINOSA-HEIDMANN DG, SUNER IJ, CATANUTO P, et al. Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(2): 729-737.
- [3] KARI FW, BUCHER J, EUSTIS SL, et al. Toxicity and carcinogenicity of hydroquinone in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. Food Chem Toxicol, 1992, 30(9): 737-747.
- [4] MCCUE JM, LINK KL, EATON SS, et al. Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation [J]. J Immunol, 2000, 165(12): 6771-6775.
- [5] GOTTSCH JD, BYNOEL A, HARLANJ B, et al. Light-induced deposits in Bruch 16-month-old membrane of protoporphyric mice [J]. Arch Ophthalmol, 1993, 111(1): 126-129.
- [6] 安娜, 陈强, 梁丽娜, 等. 氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型的建立 [J]. 眼科新进展, 2016, 36(7): 5-8.
- [7] 赵素琴, 孙志贤, 赵林. 年龄相关性黄斑变性中医证型与西医临床分级的对应关系 [J]. 中医药临床杂志, 2014, 26(2): 141-143.
- [8] 黄冰林, 丁淑华, 杭丽, 等. 枸杞提取物及其成分叶黄素/玉米黄质在体内外对年龄相关性黄斑变性防治的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(4): 531-537.
- [9] 黄冰林, 杭丽, 郑仕中, 等. 枸杞提取物对小鼠视网膜色素上皮细胞下沉积物形成的抑制作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(1): 29-34.
- [10] 包慧兰, 陈黎. 淫羊藿苷抗糖尿病大鼠心肌线粒体氧化应激损伤作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1503-1507.
- [11] SCHÜTT F, ARETZ S, AUFFARTH GU, et al. Moderately reduced ATP levels promote oxidative stress and debilitate autophagic and phagocytic capacities in human RPE cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(9): 5354-5356.
- [12] DUNAIEF JL, DENTCHEV T, YING GS, et al. The role of apoptosis in age-related macular degeneration [J]. Arch Ophthalmol, 2002, 120(11): 1435-1442.
- [13] LI Z, DONG X, LIU H, et al. Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt [J]. Mol Vis, 2013, 25(19): 1656-1666.

Effect of Qiling Granule (杞灵颗粒) on Oxidative Stress Injury of Retinal Pigment Epithelium in Mice

AN Na^{1,2}, ZHUANG Zengyuan¹, LIANG Lina¹, CHEN Qiang¹, HOU Le¹

(1. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100040; 2. Center for Drug Evaluation, China Food and Drug Administration)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of Qiling Granule (QL, 杞灵颗粒) in the treatment of age-related macular degeneration (AMD). **Methods** The mice were given 0.8% hydroquinone (HQ) diet for 5 months to build AMD model then were randomized into model group, low dose QL group, medium dose QL group, high dose QL group and lutein group (respectively given the same volume of distilled water, Qiling Granule dry extract of 3.75, 7.5 and 15 g/kg and Lutein Tablet solution of 0.18 g/kg), 17 mice in each group. The drugs were administered by gavage, and another 18 mice were given conventional diet as control group. Then we observed the retinal pathological morphology of the mice, the ultrastructure of retinal pigment epithelium (RPE) - Bruch membrane choroid, the apoptosis rate of RPE, the expression of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and the volume of serum total superoxide dismutase and glutathione peroxidase (GSH-PX). **Results** Compared with the model group, on the 14th day of treatment, the low, medium dose QL group and the lutein group showed a protective action on RPE number ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); on the 28th day, they showed a significant protection action ($P < 0.01$). Under transmission electron microscope, RPE in the model group and the lutein group showed vacuolization, the Bruch membranes were thicker than those in the control group and layered sediments could be seen in the outer collagenous zone. The ultrastructure in medium dose QL group was normal basically. Through TUNEL method, compared with the model group, on the 14th day, the low dose, medium dose QL group and the lutein group and on the 28th day, the medium dose group and the lutein group showed suppression on the apoptosis of RPE ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). By 8-OHdG immunofluorescence method, compared with the model group, on the 14th day, the low, medium dose QL group and the lutein group, and on the 28th day, the low and medium dose QL group showed significant protective action on DNA of RPE ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). On the 14th and the 28th day after modeling, the T-SOD activity in the medium dose group was higher than that in the model group ($P < 0.05$); but for protecting GSH-PX, the GSH-PX activity in the lutein group was higher than that in the model group just on the 28th day ($P < 0.05$). **Conclusion** Qiling Granule could reduce the damage of RPE-Bruch membrane choroid and lower the apoptosis rate of RPE, which might be the mechanism in treating AMD.

Keywords age-related macular degeneration; Qiling Granule; retinal pigment epithelium; oxidative stress

(收稿日期: 2016-07-08; 修回日期: 2016-09-02)

编辑: 叶 晨