

本文引用:徐 剑,周亚莎,彭 俊,潘 坤,吴权龙,李建超,刘 悦,王 英,彭清华.枸杞子加丹参对 RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-})大鼠视网膜匀浆中 cAMP、cGMP 含量的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(7):784-787.

枸杞子加丹参对 RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-})大鼠视网膜匀浆中 cAMP、cGMP 含量的影响

徐 剑^{1,2},周亚莎¹,彭 俊^{3*},潘 坤¹,吴权龙³,李建超¹,刘 悦¹,王 英¹,彭清华^{1*}

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.上海市同济大学附属东方医院眼科中心,上海 200120;

3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 探讨枸杞子加丹参对视网膜色素变性模型大鼠 RCS(*rdy*^{-/-}, *p*^{-/-}) 视网膜匀浆中 cAMP 含量、cGMP 含量以及 cAMP/cGMP 值的影响。方法 实验动物随机分为 5 组:空白组为 RCS(*rdy*^{+/+}, *p*^{+/+}) 大鼠 8 只,模型组、枸杞子组、丹参组及枸杞子加丹参组(杞参组)为 RCS(*rdy*^{-/-}, *p*^{-/-}) 大鼠各 8 只,每组均雌雄各半。5 组大鼠分别给予生理盐水、生理盐水、枸杞子、丹参、枸杞子加丹参灌胃。灌胃 28 d 后,ELISA 法测定视网膜组织匀浆中 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值。结果 与空白组比较,模型组大鼠视网膜匀浆组织中 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值均增高,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,杞参组视网膜匀浆组织中 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值均明显降低,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。结论 “补虚活血”代表中药枸杞子加丹参可以降低 RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-}) 大鼠视网膜组织匀浆中 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值,改善其“虚”证指标。

[关键词] 视网膜色素变性;枸杞子;丹参;RCS 大鼠;cAMP;cGMP

[中图分类号] R276.7

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.07.002

Effects of *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* on Contents of cAMP and cGMP in Retinal Homogenate of RCS (*rdy*^{-/-}, *p*^{-/-}) Rats

XU Jian^{1,2}, ZHOU Yasha¹, PENG Jun^{3*}, PAN Kun¹, WU Quanlong³, LI Jianchao¹, LIU Yue¹, WANG Ying¹, PENG Qinghua^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Center of Ophthalmology, Oriental Hospital

Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese

Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* on the content of cAMP, cGMP and cAMP/cGMP retinal homogenate of RCS (*rdy*^{-/-}, *p*^{-/-}) rats. **Methods** The experimental animals were randomly divided into 5 group. The blank group had 8 RCS (*rdy*^{+/+}, *p*^{+/+}) rats. Each of the *Fructus Lycii* group, the *Radix Salviae Miltiorrhizae* group, the *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* (Qishen) group had 8 RCS (*rdy*^{-/-}, *p*^{-/-}) rats. Each group had half male and half female rats. The 5 groups were respectively filled the stomach with normal saline, normal saline, *Fructus Lycii*, *Radix Salviae Miltiorrhizae*, *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* by gavage. After 28 days' gavage, the content of cAMP, cGMP and cAMP/cGMP in retinal homogenate were determined by ELISA. **Results** Compared with the blank group, the content of cAMP,

[收稿日期] 2020-04-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81804150);湖南省自然科学基金资助项目(2019JJ40226);湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金优先资助项目(2015ZYZD02);湖南省教育厅创新平台开放基金项目(16K065);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目资助;中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);长沙市科技计划项目(kc1704005);中央财政支持地方高校建设项目;国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目;湖南省中医五官科学重点学科建设项目;湖南中医药大学中医学国内一流建设学科。

[作者简介] 徐 剑,女,博士,主任医师,研究方向:中西医结合防治眼底病。

[通讯作者] *彭清华,男,二级教授,主任医师,博士研究生导师,E-mail:pqh410007@126.com;彭 俊,男,硕士,医师,E-mail:154451101@qq.com。

cGMP and cAMP/cGMP in the retinal homogenate tissue of the model group were increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$); Compared with the model group, the content of cAMP and cGMP and the value of cAMP/cGMP in the retinal homogenate tissue of Qishen group were significantly reduced, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$).

Conclusion The representative Chinese materia medica for “tonifying deficiency and activating blood circulation” *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* can reduce the contents of cAMP, cGMP and cAMP/cGMP in the retinal homogenate tissue of RCS (*rdy*^{-/-},*p*^{-/-}) rats and improve the index of “deficiency”.

[**Keywords**] retinitis pigmentosa; *Fructus Lycii*; *Radix Salviae Miltiorrhizae*; RCS rats; cAMP; cGMP

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是以夜盲和视野逐渐缩窄为特征的眼底疾病。中医学认为该病主要由先天禀赋不足、肝肾亏虚、脾脏虚弱和血脉瘀滞等导致^[1]。上世纪90年代,本研究团队成员经过大量的临床观察和机制研究证实RP患者的病机为本虚标实、虚中夹瘀,且血瘀贯穿本病始终^[2],由此创造性提出以“补虚活血”为基本治则治疗RP患者。

基于团队前期对RP病机及治法的认识^[3-8],我们选用两味具有补虚活血作用的代表性中药——枸杞子和丹参,来研究补虚活血法对RP模型大鼠的影响。枸杞子有滋补肝肾、益精明目之效;丹参可活血调经、祛瘀止痛,常用治各种瘀血病证。两药合用可共奏益肾养肝、活血明目之功。

为了深入地阐明枸杞子加丹参对RP的作用机制,本实验以已验证的“虚中夹瘀”证RP模型大鼠RCS(*rdy*^{-/-}, *p*^{-/-})^[9]为研究对象,分组给予生理盐水、枸杞子、丹参、枸杞子加丹参灌胃,观察不同药物干预后RCS大鼠视网膜组织匀浆中环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)含量、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)含量及cAMP/cGMP值的变化,以探讨补虚活血法对RP虚中夹瘀证模型中“虚证”证候的影响。

1 材料

1.1 动物

RCS(*rdy*^{+/+},*p*^{+/+})大鼠8只,雌雄各半,体质量200~240 g,鼠龄28~42 d,SPF级;RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-})大鼠,32只,雌雄各半,体质量140~160 g,鼠龄28~42 d。均由昭衍(苏州)新药研究中心有限公司提供,动物许可证号:SCXK(苏)2013-003。均饲养于湖南中医药大学实验动物中心,室温(22±2)℃,湿度50%~55%。

1.2 主要药物及试剂

枸杞子中药配方颗粒,每袋装3.0 g(相当于临

床使用量饮片10 g),生产厂家:广东一方制药有限公司,许可证号:粤20110214,产品批号:5103761。丹参中药配方颗粒,每袋装1.8 g(相当于临床使用量饮片10 g),生产厂家:广东一方制药有限公司,产品批号:5100631。苯巴比妥钠由湖南中医药大学病理实验室提供。cAMP-ELISA试剂盒、cGMP-ELISA试剂盒均由武汉华美生物工程有限公司提供。

1.3 仪器

TGL-16台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);PW-812全自动酶标洗板机、MB-530酶标仪(深圳市汇松科技发展有限公司);-80℃冰箱(中科美菱公司);常规手术台、手术器械、移液枪等均由湖南中医药大学中医诊断学实验室提供。

2 方法

2.1 动物分组

采用随机数字表法将32只RCS(*rdy*^{-/-}, *p*^{-/-})大鼠随机分为4组,分别为:模型组、枸杞子组、丹参组及枸杞子加丹参组(简称杞参组)。RCS(*rdy*^{+/+}, *p*^{+/+})大鼠即为空白组。每组8只大鼠,均雌雄各半。

2.2 动物干预

所有大鼠适应性饲养1周后给予灌胃。

给药剂量按“人-动物体表面积等效剂量比值表”折算,折算系数 $W=0.018$,折算公式: $W \times$ 成人用量(g)/动物体质量(kg)。

枸杞子组大鼠灌胃剂量为1.08 g/(kg·d);丹参组大鼠灌胃剂量为1.35 g/(kg·d);杞参组大鼠灌胃剂量为2.43 g/(kg·d);空白组、模型组大鼠灌胃等量生理盐水。连续灌胃28 d后进行相应指标检测。

2.3 视网膜组织匀浆中cAMP、cGMP含量的测定

1%苯巴比妥钠3.5 mL/kg腹腔注射麻醉,麻醉满意后,眼科显微剪分离球周组织,剪断视神经后摘除眼球。将眼球用PBS溶液冲洗后放于玻璃皿中,在解剖显微镜下沿角巩膜缘剪开眼球,去除眼前节

及玻璃体,用显微镊子剥离出视网膜组织并称重。显微剪碎视网膜,用 PBS 溶液配制成 10% 的匀浆, 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,将视网膜匀浆样品标本分装,-80 °C 冰箱冻存。检测时室温自然解冻,采用 ELISA 法测定视网膜匀浆中 cAMP 及 cGMP 的含量。

2.4 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 23.0 分析实验数据,计量资料实验数据服从正态分布,用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,单因素设计,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,满足方差齐性,多重比较用 LSD 检验,方差不齐用 Dunnett T3 检验。计量资料不服从正态分布的,则采用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。所有的结果分析图由 GraphPad Prism 6.0 软件制作完成。

3 结果

与空白组相比,模型组、枸杞子组、丹参组大鼠视网膜组织匀浆中 cAMP、cGMP 含量和 cAMP/cGMP 值均增高,差异均有显著统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比,杞参组视网膜组织匀浆中 cAMP、cGMP 含量和 cAMP/cGMP 值均明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1、图 1-3。

表 1 各组小鼠灌胃后视网膜组织匀浆中 cAMP 含量、cGMP 含量、cAMP/cGMP 值比较 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	cAMP/(pg·mL ⁻¹)	cGMP/(pg·mL ⁻¹)	cAMP/cGMP
空白组	22.78±0.53	6.11±0.24	3.73±0.11
模型组	37.07±2.64 ^{△△}	8.19±0.36 ^{△△}	4.52±0.19 ^{△△}
枸杞子组	36.04±3.49 ^{△△}	7.90±0.49 ^{△△}	4.56±0.31 ^{△△}
丹参组	33.04±2.38 ^{△△}	7.25±0.79 ^{△△}	4.58±0.25 ^{△△}
杞参组	23.62±1.23 ^{**}	5.90±0.50 ^{**}	4.03±0.43 ^{**}

注:与空白组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$

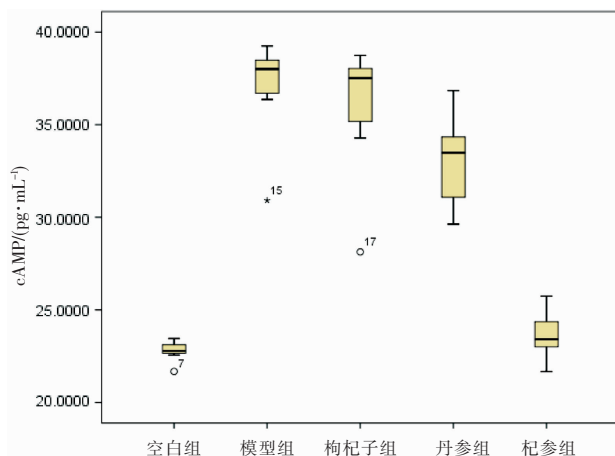


图 1 灌胃后各组大鼠视网膜中 cAMP 含量比较箱图

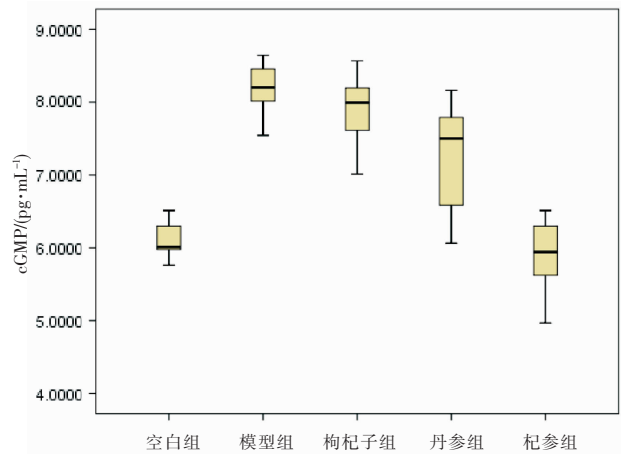


图 2 灌胃后各组大鼠视网膜中 cGMP 含量比较箱图

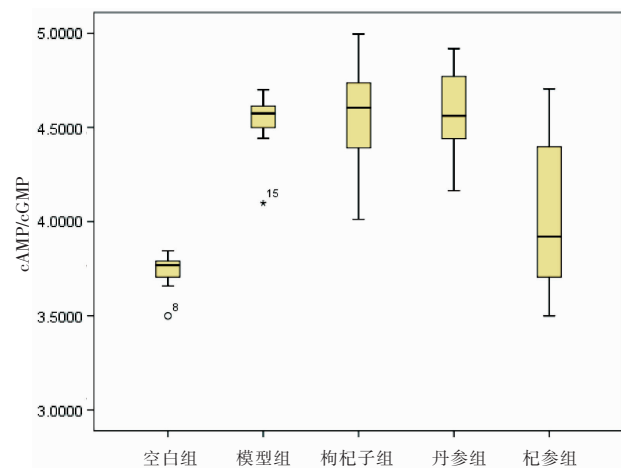


图 3 灌胃后各组大鼠视网膜中 cAMP/cGMP 值比较箱图

4 讨论

RP 是一种以进行性视细胞损害为特点的危害视功能的遗传性眼病,多为双眼发病,预后不良。本病确切发病原因与发病机制不明,尚无特效疗法,一般应用血管扩张药、营养神经药物等治疗,但效果不明显。随着国内外多年来对 RP 的深入探讨,干细胞治疗、基因治疗、视网膜移植等疗法取得了很大进展^[9]。干细胞治疗是将特定的干细胞分化诱导为感光细胞,理论上可以恢复患者视觉功能,但是如何确保顺利将干细胞诱导并输送到人体的靶组织是一项极其艰巨的任务。基因治疗是将外源性正常基因导入靶细胞,达到纠正或补偿缺陷和异常基因的目的。虽然动物实验研究取得较好的疗效且国外有报道用基因疗法治疗 Leber 遗传性视神经病的病例^[10-11]。但是,目前已知的与 RP 发病相关的基因有 200 余个^[12],更不用说未知的基因,加上人和动物基因突变表型不一定相同,这些都加剧了基因疗法在应用过程中的危险性,限制了它的推广。视网膜移植则由于治疗价格昂贵、移植物来源稀缺及保存

技术不成熟等问题,目前在临床应用较为困难。

中医药治疗 RP 不良反应小、价格低廉,在改善患者视野及视力方面有较好的疗效,值得临床推广。RP 属于中医学“高风内障”范畴,从明代著作《证治准绳》起就有对本病的记载。经过几个世纪的认识,广大中医学者普遍认为本病病机为虚,包括肝肾阴虚、脾气虚弱、肾阳不足。本课题组自 1987 年以来,采用中医综合疗法治疗本病的同时,从微量元素、免疫学、眼电生理、性激素、球结膜及甲皱微循环、血液流变学、舌下静脉等多种角度对 RP 发病机制进行了研究,发现本病虽以虚为本,但以实(瘀)为标,血瘀病理贯穿其发病的整个病理过程^[2,13-18]。

现代药理学研究表明,枸杞子含有丰富的胡萝卜素,胡萝卜素转化的维生素 A 对促进视网膜内视紫质的合成、调节视神经、维持正常视力有重要意义;丹参具有扩张血管、增加视网膜微血管血流量的作用^[19]。本研究即选用滋补肝肾和活血化瘀中药里的代表性药对枸杞子-丹参探讨补虚活血中药对 RP 大鼠“虚”证的影响。研究认为 cAMP 类似中医的阳,而 cGMP 类似中医的阴。cAMP 能促使脂肪分解、糖原分解、心肌收缩、溶酶体酶和组织胺减少,而 cGMP 的作用则相反^[20]。本研究在补虚活血治则指导下,对 RP 大鼠分别给予枸杞子、丹参治疗,选取 RCS 大鼠视网膜组织匀浆中 cAMP 及 cGMP 的含量作为评价阴阳虚证的生化指标。研究结果显示:相对于模型组大鼠,杞参组灌胃 28 d 后视网膜匀浆组织 cAMP、cGMP 含量和 cAMP/cGMP 值减少,由此,本研究认为枸杞子加丹参灌胃改善了 RP 经典动物模型 RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-})大鼠的阴阳两虚证候,为进一步开展补虚活血法治疗虚中夹瘀证 PR 模型鼠实验研究提供了支撑。

参考文献

[1] 邢 玥,李 霄.视网膜色素变性的中医药文献研究[J].生物技术世界,2012,9(2):88-89.
 [2] 彭清华,李传课.视网膜色素变性虚中夹瘀的机理研究小结[J].中国医药学报,1993,8(6):7-10.
 [3] 徐 剑,周亚莎,彭 俊,等.RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-})大鼠虚中夹瘀证实验评价[J].中华眼视光学与视觉科学杂志,2018,20(9):519-524.

[4] XU J, YANG Y J, QIN G Y, et al. Effects of lyciiFructuas and salviaeMiltiorrhizae on the syndrome of deficiency with blood stasis in RCS (*rdy*^{-/-}, *p*^{-/-}) rats with retinitis pigmentosa an Intervention study[J]. Digital Chinese Medicine, 2019, 2(3): 157-165.
 [5] 彭清华.视网膜色素变性的中西医结合治疗概况[J].中西医结合杂志,1989,9(8):512-513.
 [6] 蒋鹏飞,彭 俊,曾志成,等.益气明目丸对视网膜色素变性患者眼部血流动力学的影响[J].南京中医药大学学报,2020,36(1):24-27.
 [7] 刘家琪,王 英,蒋鹏飞,等.枸杞子丹参对视网膜色素变性大鼠视网膜组织形态学及 CRYAB mRNA 的影响 [J]. 中国医药导报, 2019,16(14):13-15,22.
 [8] 蒋鹏飞,王 英,潘坤,等.益气明目丸对视网膜色素变性大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白表达的影响[J].中医杂志,2019,60(4):327-332.
 [9] XU J, PENG Q H. Retinitis pigmentosa treatment with western medicine and traditional Chinese medicine therapies [J]. Journal of Ophthalmology, 2015,2015:1-6.
 [10] CIDECIYAN A V, HAUSWIRTH W W, ALEMAN T S, et al. Human RPE65 gene therapy for leber congenital amaurosis: Persistence of early visual improvements and safety at 1 year [J]. Human Gene Therapy, 2009,20(9):999-1004.
 [11] SIMONELLI F, MAGUIRE A M, TESTA F, et al. Gene therapy for leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration[J]. Molecular Therapy, 2010, 18(3): 643-650.
 [12] ALI M U, RAHMAN M S U, CAO J, et al. Genetic characterization and disease mechanism of retinitis pigmentosa; current scenario[J]. 3 Biotech, 2017, 7(4): 1-20.
 [13] 彭清华,胡欣平,曾自明,等.视网膜色素变性辨证论治与血清性激素关系的初步研究[J].中国中医眼科杂志,1993,3(2):80-83.
 [14] 彭清华,胡欣平,朱惠安,等.男性视网膜色素变性及其辨证分型与血清性激素关系的初步研究[J].辽宁中医杂志,1993,20(12): 1-5.
 [15] 彭清华,胡欣平.男性视网膜色素变性患者的血清性激素改变[J].眼科新进展,1993,13(2):8-10.
 [16] 彭清华,罗 萍,江晓芬,等.视网膜色素变性血瘀机理的初步研究[J].国医论坛,1993,8(1):37-40.
 [17] 彭清华.视网膜色素变性 228 例的舌象观察[J].辽宁中医杂志, 1991,18(5):20-25.
 [18] 彭清华.38 例日本籍视网膜色素变性舌下脉的临床观察[J].江苏中医,1990,22(5):43-45.
 [19] 宋厚盼,曾梅艳,彭 俊,等.枸杞子-丹参药对治疗视网膜色素变性的分子机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(14):199-206.
 [20] 占阮娟,陈素红,吕圭源,等.三味甘凉归肺经中药对肺阴虚模型大鼠 cAMP、cGMP 的影响[J].中药药理与临床,2012,28(6):85-87.

(本文编辑 匡静之)