

## 技术与方法

## 枸杞水提液对海洛因视网膜氧化损伤的影响

贾宗平<sup>1,2</sup> 苟陶然<sup>2</sup> 俞诗源<sup>2\*</sup><sup>1</sup>甘肃政法大学公安技术学院, 兰州 730070; <sup>2</sup>西北师范大学生命科学院, 兰州 730070

**摘要** 该研究探讨了枸杞水提液对海洛因视网膜氧化损伤的影响。实验将120只昆明小鼠随机分为对照组、海洛因组、枸杞1组和枸杞2组。用递增剂量的海洛因溶液对海洛因组、枸杞1组、枸杞2组小鼠腹腔连续注射15天(1~5天、6~10天、11~15天分别注射2.0 g/L、3.0 g/L、4.0 g/L的海洛因溶液, 每次0.2 mL, 每天两次), 对照组注射等量生理盐水。注射海洛因溶液1 h后, 枸杞1组、枸杞2组再分别灌胃0.2 mL枸杞水提液(枸杞1组、枸杞2组分别对应0.2 g/mL、0.4 g/mL的枸杞水提液), 对照组和海洛因组再分别灌胃等量生理盐水。称量小鼠体质量和眼珠重的变化, 用比色法检测小鼠血浆GSH含量、LDH活性和视网膜组织SOD活性、MDA含量的变化, 用免疫组织化学法检测视网膜组织Bax、TNF- $\alpha$ 蛋白表达的变化。结果表明, 与对照组相比, 海洛因组小鼠体质量和眼球重降低, 血浆GSH含量显著下降, LDH活性显著升高, 视网膜组织SOD活性降低, MDA含量升高, 视网膜组织Bax和TNF- $\alpha$ 蛋白的阳性表达量升高, 平均光密度值明显增大; 与海洛因组相比, 枸杞组小鼠体质量和眼球重有所增加, 血浆GSH含量有所升高, LDH活性显著降低, 视网膜组织SOD活性增加, MDA含量降低, 视网膜组织Bax和TNF- $\alpha$ 蛋白阳性表达有所降低。综上, 枸杞水提液能提高视网膜细胞的抗氧化能力和抗炎能力, 抑制视网膜组织Bax和TNF- $\alpha$ 蛋白的阳性表达, 对视网膜组织有一定的保护作用。

**关键词** 枸杞水提液; 海洛因; 视网膜; SOD; Bax; TNF- $\alpha$ ; LDH; 免疫组织化学

The Effect of *Lycium barbarum* Soup on Oxidative Damage of Heroin to RetinaJIA Zongping<sup>1,2</sup>, GOU Taoran<sup>2</sup>, YU Shiyuan<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Public Security and Technology, Gansu University of Political Science and Law, Lanzhou 730070, China;<sup>2</sup>College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract** The aim of this study was to explore the effects of *Lycium barbarum* soup on oxidative damage of heroin to retina. A total of 120 Kunming mice were randomly divided into control group, heroin group, *L. barbarum* 1 group and *L. barbarum* 2 group. The mice in heroin group, *L. barbarum* 1 group, and *L. barbarum* 2 group were intraperitoneally injected with increasing dose of heroin solution for 15 days (1-5, 6-10, and 11-15 days correspond to 2.0 g/L, 3.0 g/L, and 4.0 g/L heroin solution respectively, 0.2 mL each time, twice a day). In the control group, the same amount of normal saline was injected. After injecting heroin solution for 1 h, *L. barbarum* 1, 2 groups were given with 0.2 mL *L. barbarum* soup (*L. barbarum* 1 group and *L. barbarum* 2 group correspond to

收稿日期: 2020-08-09 接受日期: 2020-10-23

兰州市社会发展项目(批准号: 2014-1-102)和甘肃省高等学校科研项目(批准号: 2014A-086)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13088799651, E-mail: syu006@nwnu.edu.cn

Received: August 9, 2020 Accepted: October 23, 2020

This work was supported by Lanzhou Municipal Social Development Project (Grant No.2014-1-102) and Gansu Provincial Higher Education Scientific Research Project (Grant No.2014A-086)

\*Corresponding author. Tel: +86-13088799651, E-mail: syu006@nwnu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5403>

0.2 g/mL and 0.4 g/mL *L. barbarum* soup respectively) by intragastric administration. The control group and heroin group were given with the same amount of normal saline. The changes of body mass and eyeball weight of the mice were measured. The changes of GSH content and LDH activity in plasma, SOD activity and MDA content in retina were detected by colorimetry, and the levels of Bax and TNF- $\alpha$  proteins in retina were detected by immunohistochemistry. The results showed that compared with the control group, the body mass and eyeball weight of the mice in heroin group decreased, the content of GSH in plasma decreased significantly, the LDH activity of plasma increased significantly, the activity of SOD in retina decreased, the content of MDA increased, the positive level of Bax and TNF- $\alpha$  protein in retina increased, and the average optical density increased significantly. Compared with the heroin group, the body mass and eyeball weight of the mice in *L. barbarum* groups increased again, the content of GSH in plasma increased, the LDH activity of plasma decreased significantly, the activity of SOD in retina increased, the content of MDA decreased, and the levels of Bax and TNF- $\alpha$  proteins in retina decreased again. In conclusion, *L. barbarum* soup can improve the anti-oxidation and anti-inflammatory abilities of retina cells and inhibit the positive levels of Bax and TNF- $\alpha$  proteins in retina, which has a certain protective effect on the retina.

**Keywords** *Lycium barbarum* soup; heroin; retina; SOD; Bax; TNF- $\alpha$ ; LDH; immunohistochemistry

反兴奋剂是当今世界最重要的任务之一。海洛因是吗啡二乙酰的衍生物,由于其成瘾性强,被世界各国列为一级管制毒品<sup>[1]</sup>。青少年的神经和思想正处于快速发展和完善期,如果接触毒品等化学物质容易造成神经生理过程的损害和思维的紊乱,滥用海洛因会导致机体器官功能的损伤<sup>[2]</sup>,影响机体神经、免疫及心肺等器官的结构与功能<sup>[3-5]</sup>,会降低视网膜组织的抗氧化能力,促进细胞的脂质过氧化反应,诱导视网膜细胞凋亡和炎症反应的发生<sup>[5-6]</sup>,若眼眶中直接注射海洛因会引起视力下降、眼肌瘫痪、球结膜水肿等临床症状<sup>[7]</sup>,严重影响机体的行为活动和社会安定。日前,有关抗海洛因成瘾的研究极少,有研究表明,美沙酮、曲唑酮在实践中可被用于治疗海洛因等依赖者的戒断症状与焦虑、抑郁症<sup>[8]</sup>,但美沙酮和曲唑酮本身也有依赖性。中药能有效安全地为海洛因等依赖者脱毒<sup>[9]</sup>,当归多糖能减轻麻黄素对小鼠肝组织的损伤<sup>[10]</sup>,丹参、黄芪复方液能抑制吗啡依赖者的复吸行为<sup>[11]</sup>,枸杞具有抗氧化、延缓衰老和抗肿瘤<sup>[12-14]</sup>作用,枸杞多糖可调节机体的免疫功能<sup>[13]</sup>,但枸杞对海洛因引起的视网膜氧化损伤是否有影响鲜有报道。为了弄清楚枸杞对海洛因视网膜组织氧化损伤的影响,本研究先给小鼠注射海洛因再灌胃枸杞水提液,实验检测血浆谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性的变化、视网膜组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性与丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化及B淋巴细胞癌-2基因相关X

蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )蛋白表达的变化,分析枸杞水溶液对海洛因视网膜氧化损伤的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品及动物处理

盐酸海洛因由甘肃省公安厅提供;宁夏枸杞购自兰州市安宁医药有限责任公司;GSH、LDH、SOD和MDA试剂盒购自南京建成生物工程研究所;兔抗Bax、TNF- $\alpha$ 单克隆抗体免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;昆明小鼠由兰州大学实验动物中心提供,且本研究已通过西北师范大学伦理委员会审批(伦理号:2018-0012)。

将盐酸海洛因用蒸馏水配成2.0、3.0、4.0 g/L的水溶液保存备用。宁夏枸杞100 g,根据文献方法<sup>[9]</sup>加1 L蒸馏水浸泡1 h后用温火煎煮30 min,过滤取汁,药渣再加蒸馏水浸泡煎煮后过滤取汁,将两次药汁合并后用蒸发仪浓缩成0.4 g/mL的枸杞水提液,保存于4 °C冰箱备用。

出生7天的昆明小鼠(约5~6 g) 120只,饲养1周后随机分为对照组、海洛因组、枸杞1组(LB1)和枸杞2组(LB2) 4个组,每组30只。根据相关文献方法<sup>[10]</sup>用递增剂量给枸杞1组、枸杞2组和海洛因组小鼠腹腔连续注射海洛因溶液,1~5天注射浓度为2.0 g/L、6~10天注射浓度为3.0 g/L、11~15天注射浓度为4.0 g/L(根据小鼠半数致死剂量和成瘾剂量

设定), 每次0.2 mL, 每天两次, 对照组小鼠注射等量的生理盐水; 枸杞1、2组小鼠于每次注射海洛因溶液1 h后再分别灌胃0.2 g/mL、0.4 g/mL的枸杞水提液0.2 mL, 给对照组和海洛因组小鼠灌胃等量的生理盐水, 实验小鼠仍由母鼠带养, 自由饮食饮水(枸杞水溶液抗海洛因视网膜损伤的作用已申报国家发明专利)。

在给药5、10、15天时, 用电子天平称量小鼠体质量并记录后, 从眼眶静脉采血(用肝素抗凝), 经3 500 r/min离心10 min后, 取其血浆保存于-20 °C冰箱备用。然后将实验动物断头处死, 摘除双侧眼球(在解剖显微镜下除去筋膜等眼球周围组织), 用预冷的生理盐水漂洗、滤纸吸干, 电子天平称量单个眼球重并记录, 将右眼于-20 °C冰箱冻存, 左眼投入10%的中性福尔马林液中固定备用。

## 1.2 眼球SOD活性和MDA含量检测

上述冻存的眼球用电子天平称重后滴加9倍的生理盐水, 经冰浴匀浆(5 min), 3 600 r/min离心10 min, 然后再取上清液, 按总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒说明书要求用全自动分光光度计(UV-VIS spectrophotometer, U-1800型, Shimadzu公司, 日本)分别在波长550 nm、532 nm处测定各组小鼠眼球组织SOD、MDA的吸光度( $D$ )值。

## 1.3 血浆GSH含量和LDH活性检测

上述冻存备用的血浆, 按还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒说明

书要求, 用分光光度计在420 nm、440 nm处检测各组小鼠血浆GSH和LDH的吸光度( $D$ )值。

## 1.4 视网膜Bax、TNF- $\alpha$ 蛋白的表达

根据文献方法<sup>[5]</sup>将上述各组小鼠视网膜的连续石蜡切片常规脱蜡至水、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育以灭活内源性酶、微波处理进行抗原修复, 5%山羊血清室温孵育封闭, 加兔抗Bax、TNF- $\alpha$ (1:100)于37 °C孵育后, 滴加生物素化羊抗兔IgG(1:100)孵育和链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物工作液室温孵育, 再用DAB显色, 苏木精复染, 经脱水和透明后封片, 用显微镜观察、拍照, 每组随机抽取6张切片, 每张切片选5个视野用Image-proplus 6.0软件分析Bax和TNF- $\alpha$ 蛋白在视网膜中表达的平均光密度值。

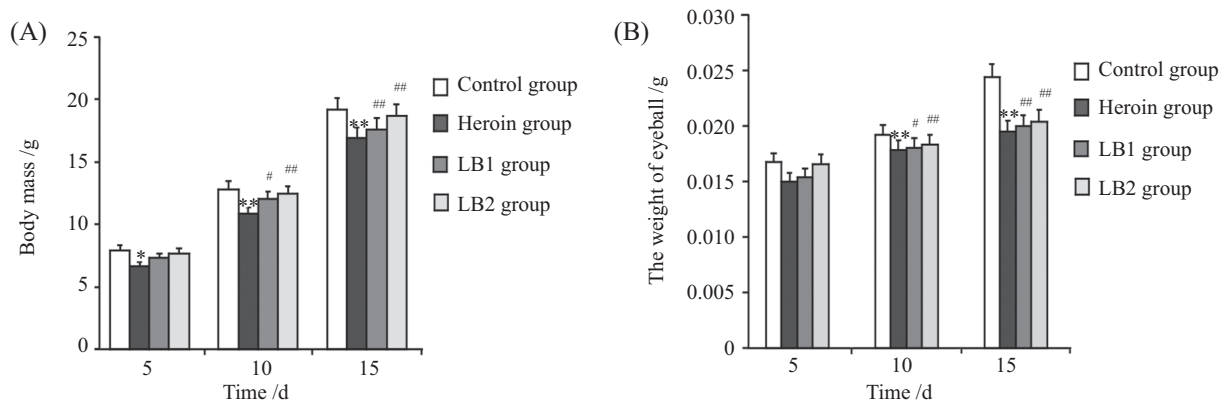
## 1.5 数据处理

实验数据用SPSS 17.0统计学软件进行单因素方差分析, 结果以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,  $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 枸杞水提液对海洛因损伤小鼠体质量的影响

注射海洛因再灌胃枸杞水提液影响小鼠的体质量(图1A)。给小鼠注射海洛因后, 海洛因组小鼠体质量降低, 与对照组相比, 5天时体质量差异显著( $P<0.05$ ), 10天、15天时体质量差异极显著( $P<0.01$ ); 灌胃不同剂量枸杞水提液后, 枸杞组小鼠的体质量又有不同程度的回升, 与海洛因组相比, 在10天、15天时体质量差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。



A: 各组小鼠在5天、10天、15天的体质量; B: 各组小鼠在5天、10天、15天的眼球重。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组相比较; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , 与海洛因组相比较。

A: body mass of each group at five, 10, and 15 days; B: the weight of each group's eyeballs at five, 10, and 15 days. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  compared with heroin group.

图1 小鼠体质量、眼球重的变化

Fig. 1 The change of body mass and eyeball weight in mice

## 2.2 枸杞水提液对海洛因损伤小鼠眼球重的影响

注射海洛因再灌胃枸杞水提液影响小鼠的眼球重(图1B)。给小鼠连续腹腔注射海洛因后,海洛因组小鼠的眼球重降低,与对照组相比,10天、15天时眼球重差异极显著( $P<0.01$ );灌胃不同剂量枸杞水提液后,枸杞组小鼠眼球重又有不同程度的回升,与海洛因组相比,10天、15天时差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

## 2.3 枸杞水提液对海洛因损伤小鼠血浆GSH含量的影响

注射海洛因再灌胃枸杞水提液影响小鼠血浆GSH的含量(表1)。小鼠连续腹腔注射海洛因后,海洛因组小鼠血浆GSH含量下降,与对照组相比,10天、15天时差异极显著( $P<0.01$ );灌胃不同剂量枸杞水提液后,枸杞组小鼠血浆GSH含量均有所回升,

与海洛因组相比,10天、15天时差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

## 2.4 枸杞水提液对海洛因损伤小鼠血浆LDH活性的影响

注射海洛因再灌胃枸杞水提液影响小鼠血浆LDH的活性(表1)。小鼠连续腹腔注射海洛因后,海洛因组小鼠血浆LDH活性增加,与对照组相比,LDH活性差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ );灌胃不同剂量枸杞水提液后,枸杞组小鼠血浆LDH活性均有不同程度下降,与海洛因组相比10天、15天时,LDH活性差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

## 2.5 枸杞水提液对海洛因损伤小鼠视网膜组织SOD活性的影响

注射海洛因再灌胃枸杞水提液影响小鼠视网膜组织的SOD活性(图2A)。小鼠连续腹腔注射海洛

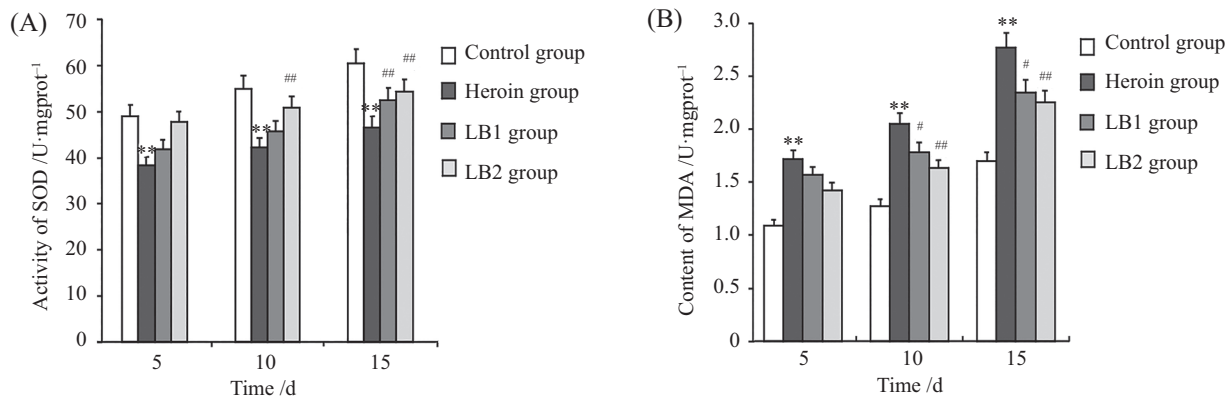
表1 血浆GSH含量和LDH活性的变化

Table 1 The changes of plasma GSH content and LDH activity

项目	时间/天	对照组	海洛因组	枸杞1组	枸杞2组
Project	Time /d	Control group	Heroin group	LB1 group	LB2 group
GSH /mg·L <sup>-1</sup>	5	8.510±0.08	7.031±0.19	7.890±0.12	8.112±0.04
	10	9.400±0.10	7.283±0.20**	8.292±0.11 <sup>#</sup>	8.3244±0.21 <sup>##</sup>
	15	9.501±0.09	7.413±0.17**	8.341±0.13 <sup>##</sup>	8.570±0.20 <sup>##</sup>
LDH /U·L <sup>-1</sup>	5	969.17±93.22	1318.19±128.38*	1174.00±200.06	1011.69±121.69 <sup>#</sup>
	10	1143.29±63.61	1686.27±148.87**	1373.15±117.42 <sup>#</sup>	1149.67±57.72 <sup>##</sup>
	15	1589.45±96.75	2165.30±104.12**	1894.34±86.51 <sup>##</sup>	1778.50±93.31 <sup>##</sup>

$n=30$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组相比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ , 与海洛因组相比较。GSH: 谷胱甘肽; LDH: 乳酸脱氢酶。

$n=30$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$  compared with heroin group. GSH: glutathione; LDH: lactate dehydrogenase.



A: 各组小鼠在5天、10天、15天视网膜组织的SOD活性; B: 各组小鼠在5天、10天、15天视网膜组织的MDA含量。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组相比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ , 与海洛因组相比较。

A: SOD activity in retinal tissue of each group at five, 10 and 15 days; B: MDA content in retinal tissue of each group at five, 10, and 15 days in each group. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$  compared with heroin group.

图2 SOD活性、MDA含量的变化

Fig.2 The changes of SOD activity and MDA content



因后, 海洛因组小鼠视网膜组织SOD活性下降, 与对照组相比SOD活性差异极显著( $P<0.01$ ); 灌胃不同剂量枸杞水提液后, 枸杞组小鼠视网膜组织SOD活性又有所回升, 与海洛因组相比, 10天、15天时SOD活性差异极显著( $P<0.01$ )。

## 2.6 枸杞水提液对海洛因损伤小鼠视网膜组织MDA含量的影响

注射海洛因再灌胃枸杞水提液影响小鼠视网膜组织的MDA含量(图2B)。小鼠连续腹腔注射海洛因后, 海洛因组小鼠视网膜组织MDA含量增加, 与对照组相比MDA含量差异极显著( $P<0.01$ ); 灌胃不同剂量枸杞水提液后, 枸杞组小鼠视网膜组织MDA含量均又下降, 与海洛因组相比, 10天、15天时MDA含量差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

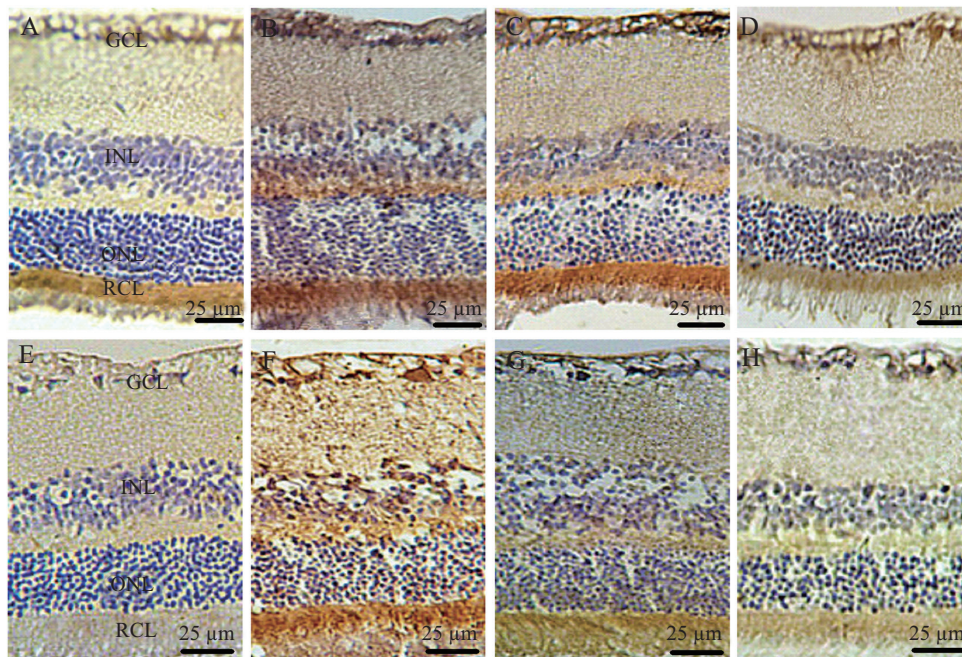
## 2.7 枸杞水提液对海洛因损伤小鼠视网膜组织Bax蛋白表达的影响

注射海洛因再灌胃枸杞水提液影响小鼠视网膜组织Bax蛋白的表达(图3)。免疫组织化学结果显示, Bax蛋白在视网膜组织中的阳性表达呈棕黄色或棕色, 主要集中在节细胞层(ganglion cell layer,

GCL)、内核层(inner nuclear layer, INL)、外核层(outer nuclear layer, ONL)、视锥视杆层(rod and cone layer, RCL)等处。对照组小鼠视网膜组织Bax蛋白阳性细胞数量少、染色浅(图3A); 而海洛因组小鼠视网膜组织Bax蛋白阳性表达明显增强, 阳性细胞密集且数量多, 染色较深(图3B), 与对照组相比Bax蛋白阳性表达差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ ); 但给小鼠灌胃枸杞水提液后, 枸杞组小鼠视网膜组织Bax蛋白阳性表达有所降低, 阳性细胞数量较少, 染色较浅(图3C和图3D), 与海洛因组相比, 10天、15天时Bax蛋白阳性表达差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。免疫组织化学检测的视网膜组织Bax蛋白表达的平均吸光度值如图4A所示。

## 2.8 枸杞水提液对海洛因损伤视网膜组织TNF- $\alpha$ 蛋白表达的影响

注射海洛因再灌胃枸杞水提液影响小鼠视网膜组织TNF- $\alpha$ 蛋白的表达(图3)。免疫组织化学结果显示, TNF- $\alpha$ 蛋白在视网膜组织中的阳性表达呈棕黄色或棕色, 主要集中在节细胞层(GCL)、内核层(INL)、外核层(ONL)、视锥视杆层(RCL)等处。对

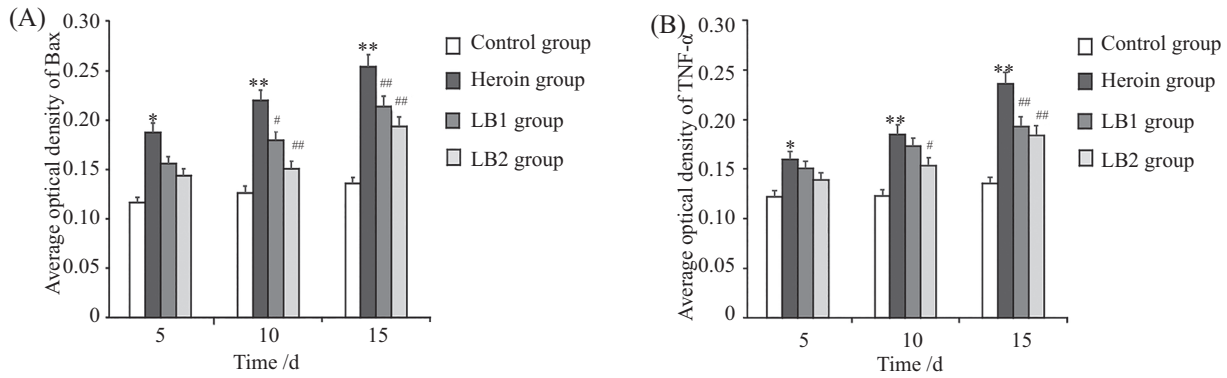


A~D: 实验15天时对照组、海洛因组、枸杞1组、枸杞2组小鼠视网膜组织Bax蛋白的表达; E~H: 实验15天时对照组、海洛因组、枸杞1组、枸杞2组小鼠视网膜组织TNF- $\alpha$ 蛋白的表达。GCL: 神经节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层; RCL: 视锥视杆层。

A~D: the retina Bax protein level of control group, heroin group, LB1 and LB2 groups at the 15 days. E~H: the retina TNF- $\alpha$  protein level of control group, heroin group, LB1 and LB2 groups at the 15 days. GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer; RCL: rod and cone layer.

图3 小鼠视网膜组织Bax、TNF- $\alpha$ 的表达

Fig.3 The Bax and TNF- $\alpha$  protein levels in mouse retina



A: 各组小鼠在5天、10天、15天视网膜组织Bax蛋白的平均光密度; B: 各组小鼠在5天、10天、15天视网膜组织TNF- $\alpha$ 蛋白的平均光密度。  
\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, 与对照组相比较; # $P$ <0.05, ## $P$ <0.01, 与海洛因组相比较。

A: the average optical density of Bax protein in retinal tissue of each group at five, 10, and 15 days; B: the average optical density of TNF- $\alpha$  protein in retinal tissue of each group at five, 10, and 15 days; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 compared with control group; # $P$ <0.05, ## $P$ <0.01 compared with heroin group.

图4 Bax、TNF- $\alpha$ 蛋白表达的平均光密度

Fig.4 Average optical density of Bax and TNF- $\alpha$  protein levels

照组小鼠视网膜组织TNF- $\alpha$ 蛋白阳性细胞数量少、染色浅(图3E); 而海洛因组小鼠视网膜组织TNF- $\alpha$ 蛋白阳性表达明显增强, 阳性细胞密集且数量多, 染色较深(图3F), 与对照组相比TNF- $\alpha$ 蛋白阳性表达差异显著( $P$ <0.05)或极显著( $P$ <0.01); 但给小鼠灌胃枸杞水提液后, 枸杞组小鼠视网膜组织TNF- $\alpha$ 蛋白阳性表达又降低, 阳性细胞数量较少, 染色较浅(图3G和图3H), 与海洛因组相比, 10天、15天时TNF- $\alpha$ 蛋白阳性表达差异显著( $P$ <0.05)或极显著( $P$ <0.01)。免疫组织化学检测的视网膜组织TNF- $\alpha$ 蛋白表达的平均吸光度值如图4B所示。

### 3 讨论

海洛因是阿片受体激动剂, 可作用于中枢神经和周围组织中的阿片受体, 注射海洛因可使动物的兴奋性增强、活动量增大、能量消耗加速, 同时, 海洛因在体内可被水解为吗啡, 对中枢有镇痛作用, 可抑制摄食中枢、减少胃肠蠕动<sup>[16]</sup>。持续注射海洛因会损伤小鼠的胃肠功能, 使其摄食量减少而出现体质量和器官重量下降<sup>[16]</sup>。另外, 海洛因及其代谢产物可通过血液循环进入组织器官, 造成有害物质在视网膜等器官组织中滞留, 影响该组织器官的代谢活动, 造成器官组织的严重损伤, 使眼球重量和体质量下降<sup>[16]</sup>。有研究表明, 枸杞含有多糖、黄酮类化合物、玉米黄素等, 具有抗氧化、增强免疫力等重要功效<sup>[15]</sup>, 枸杞煎液能显著增强小鼠细胞免疫和体液免疫功能, 具有很强的免疫调节作用<sup>[14]</sup>, 枸杞玉米黄素能够维持视网膜色素细胞层的色素密度, 对光所致的视网膜氧化损伤有一

定的保护作用<sup>[15]</sup>。给小鼠灌胃枸杞水提液, 增强了机体的代谢能力和免疫力, 降低了海洛因引起的炎症损伤, 使得动物体质量和眼球重逐渐增加, 表明枸杞水提液对动物有明显的保护作用。

GSH是广泛存在于生物体内的重要抗氧化剂, 能清除自由基, 降低细胞脂质过氧化反应从而保护生物膜。血浆GSH的水平变化反应机体氧化代谢的状态<sup>[17]</sup>, 视网膜中的GSH主要集中在胶质细胞的线粒体上, 如果GSH合成障碍就会造成视网膜的损伤<sup>[18]</sup>。给动物注射海洛因后体内代谢产生大量的氧自由基, 机体为清除体内过多的自由基, 使GSH被过度消耗, 造成血浆GSH水平急剧下降<sup>[5]</sup>。用GSH治疗脑脊髓炎模型大鼠, GSH能消除动物体内多余的氧自由基, 降低大鼠视网膜神经节细胞的凋亡<sup>[19]</sup>; 本实验给小鼠灌胃枸杞水提液后, 枸杞组GSH水平显著上升, 表明枸杞水提液能提高动物的抗氧化和抗炎能力, 减缓机体的氧化应激, 减轻炎症反应, 减少GSH的消耗, 使机体抗氧化剂水平升高。

LDH是活细胞无氧代谢的重要酶类, 广泛地存在于活细胞中, 当受损伤细胞的细胞膜通透性增大时, LDH就会渗漏到细胞外液中。有研究表明, 人或动物的视网膜内层细胞主要依靠无氧糖酵解供给能量, 如果体内缺氧或氧气不足, LDH就会通过糖酵解途径催化丙酮酸生成乳酸, 如果乳酸达到一定量时就会引起机体视网膜组织的病理变化<sup>[5,20]</sup>。研究显示, 新生儿缺氧缺血引起脑损伤时, 细胞内的LDH就会迅速渗漏到脑组织液中进入血液循环, 使血浆LDH活性升高<sup>[20]</sup>; 牛磺酸可影响高原缺氧大鼠视网



膜LDH的活性<sup>[21]</sup>。本实验中,注射海洛因溶液后,小鼠血浆LDH活性显著升高<sup>[5]</sup>,再灌胃枸杞水提液后,小鼠血浆LDH活性又显著降低,提示枸杞水提液能缓解视网膜的脂质过氧化反应,维持视网膜细胞膜的完整性,对小鼠视网膜有一定的保护作用。

SOD能清除超氧阴离子自由基,保护机体免受自由基攻击,是机体最主要的抗氧化酶;MDA是细胞脂质过氧化的终产物,可直接损伤生物膜,机体MDA含量的变化反映脂质过氧化的水平或细胞受损及老化的程度<sup>[4,22-23]</sup>;研究表明,视网膜受到光化学损伤后,SOD通过歧化反应被大量消耗,清除组织中的超氧阴离子自由基,减轻了视网膜组织的损伤,而光损伤使视网膜组织脂质过氧化反应加剧,增加了MDA的生成量,因而SOD活性降低而MDA含量增加<sup>[24]</sup>。给小鼠注射海洛因溶液后,视网膜组织SOD活性降低,MDA含量增加,是由于海洛因的毒性使视网膜组织内大量累积了活性氧自由基,为对抗自由基SOD被大量消耗,而MDA含量的增加进一步说明视网膜组织中的SOD不足以阻止MDA对细胞的损伤作用,使视网膜的脂类受到不可逆的损伤<sup>[6]</sup>。植物多糖对氧化损伤细胞具有保护和修复作用,给小鼠灌胃百合多糖后,麻黄素损伤小鼠肺组织中的抗氧化酶活性升高<sup>[9]</sup>。当归多糖能使麻黄素损伤小鼠肝组织中的SOD活性明显升高,MDA含量显著降低<sup>[10]</sup>,枸杞多糖具有抗氧化作用<sup>[12]</sup>,给小鼠灌胃枸杞水提液能清除机体内的活性氧自由基,增强组织SOD活性或机体的抗氧化能力,减轻细胞脂质过氧化反应使得组织MDA含量下降,表明枸杞水提液能有效减轻海洛因对小鼠视网膜细胞的氧化损伤,对小鼠视网膜有一定的保护作用。

Bax蛋白是Bcl-2家族的重要成员,该家族中的Bcl-2蛋白具有抗凋亡作用,而Bax蛋白具有促凋亡作用<sup>[25]</sup>。有研究表明,如果给大鼠缺血再灌注时,发现视网膜组织Bcl-2的表达减少而Bax的表达增加,视网膜细胞的凋亡增加<sup>[26]</sup>;百草枯诱导大鼠视网膜细胞凋亡中Bax表达增强,而Bcl-2表达量下降,使得Bcl-2/Bax的比值最低而凋亡指数最高<sup>[27]</sup>。海洛因诱导Bax基因的表达,使小鼠脑组织和肺组织发生损伤<sup>[16,28]</sup>。给小鼠注射海洛因,小鼠视网膜组织Bax蛋白的阳性表达增强,会启动下游凋亡执行的级联反应,导致细胞凋亡增加<sup>[6,29]</sup>。小鼠注射麻黄素后再灌胃百合多糖,可降低肺组织Bax蛋白的阳性表达<sup>[9]</sup>,当归多糖能使

麻黄素损伤肝组织中的Bax蛋白表达降低<sup>[10]</sup>,枸杞水提液能够通过抗自由基损伤而增强线粒体的能量代谢,促进视网膜神经细胞的活性和功能<sup>[30]</sup>。本实验中,枸杞组与海洛因组相比Bax蛋白的表达明显下降,表明枸杞水提液能够通过对抗自由基损伤而抑制线粒体凋亡,减少视网膜细胞的凋亡,另外,枸杞能促进B淋巴细胞和T淋巴细胞的增殖,增加血清中抗体的生成量<sup>[13]</sup>,减轻自由基对组织细胞的攻击,从而抑制Bax蛋白的表达,保护视网膜免受海洛因的损伤。

TNF- $\alpha$ 是一种促炎细胞因子,由内皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、淋巴细胞等分泌,参与机体的炎症反应和免疫应答<sup>[31]</sup>。活化的TNF- $\alpha$ 被释放后能产生多种作用,可使多型核白细胞活化并释放氧自由基和炎症介质,损伤视网膜组织,可激活组织中的小胶质细胞、内皮细胞及巨噬细胞生成炎症反应的中间代谢物,促进视网膜的炎症反应;可促进粒细胞-单核细胞集落刺激因子、IL-1及IL-6的表达,协同其他因子引发炎症反应<sup>[32]</sup>。TNF- $\alpha$ 能使鼠视网膜色素上皮细胞表达和分泌炎症因子,诱发炎症反应,促使视网膜损伤<sup>[33]</sup>。给小鼠注射海洛因,由于海洛因的毒性会促使TNF- $\alpha$ 活化和释放,进而调节下游多种炎症因子的活化和释放,使白细胞浸润、募集<sup>[33]</sup>,损伤视网膜细胞的结构和功能,使得海洛因组小鼠TNF- $\alpha$ 的表达显著增强<sup>[6]</sup>。当归多糖能够提高肝组织抗氧化酶活性,抑制肝组织TNF- $\alpha$ 的表达<sup>[34]</sup>。本实验灌胃枸杞水提液后,枸杞组小鼠视网膜TNF- $\alpha$ 的表达与海洛因组相比均显著降低,表明枸杞水提液能够下调TNF- $\alpha$ 的表达,可能通过提高免疫力、减缓氧化应激等方式阻断TNF- $\alpha$ 诱导炎症因子表达的反应链,降低炎症因子的含量,抑制视网膜炎症反应,对海洛因损伤的视网膜有一定的保护作用。

综上所述,枸杞水提液可提高细胞的抗氧化能力和抗炎能力,抑制视网膜Bax和TNF- $\alpha$ 蛋白的表达,小鼠注射海洛因后再灌胃枸杞水提液,能减轻海洛因对视网膜的氧化损伤,但其具体过程及机制有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- [1] 彭之宇. 毒品犯罪量刑问题研究[J]. 中国刑事法杂志(PENG Z Y. Study on the problem of drug crime sentencing [J]. China Criminal Law Journal), 2014, 161(1): 59-62.
- [2] 杨波, 杨苏勇, 赵仑, 等. 海洛因成瘾者抑制控制加工异常的生理证据[J]. 中国科学(C辑:生命科学)(YANG B, YANG S Y,

- ZHAO L, et al. Heroin addicts control electrophysiological evidence of abnormal processing [J]. *Sci China Ser C*, 2009, 39(6): 601-10.
- [3] 刘徽婷, 王嘉军. 海洛因依赖者神经-内分泌-免疫功能损伤[J]. *中国药物依赖性杂志*(LIU H T, WANG J J. Function in jury of neuro-endocrine-immune system in heroin addicts [J]. *Chinese Journal of Drug Dependence*), 2009, 18(1): 10-2.
- [4] 冯红丽, 李重阳, 俞诗源, 等. 海洛因对仔鼠和母鼠肺中SOD、CAT活力和MDA含量及组织结构的影响[J]. *解剖学报*(FENG H L, LI C Y, YU S Y, et al. Effects of heroin on SOD and CAT activity and MDA content and histological structure in the lungs of the filial mice and mother mice [J]. *Acta Anatomica Sinica*), 2009, 40(2): 288-94.
- [5] 李重阳, 苟陶然, 俞诗源. 海洛因对仔鼠视网膜的氧化损伤和特异蛋白表达的影响[J]. *解剖学报*(LI C Y, GOU T R, YU S Y. Effect of heroin on oxidative damage and specific protein expression in retina of newborn mice [J]. *Acta Anatomica Sinica*), 2018, 49(6): 708-13.
- [6] 苟陶然, 李重阳, 欧锐, 等. 海洛因对小鼠视网膜结构和抗氧化物酶的影响[J]. *解剖学报*(GOU T R, LI C Y, OU R, et al. Effect of heroin on histological structure and its antioxidant enzyme in mice retina [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2017, 48(6): 663-8.
- [7] GHOSHEH F R, KATHURIA S S. Intraorbital heroin injection resulting in orbital cellulitis and superior ophthalmic vein thrombosis [J]. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 2006, 22(6): 473-5.
- [8] 陶用富, 赵智慧, 周豪, 等. 曲唑酮与丁丙诺啡治疗海洛因依赖者稽延性戒断症状的对照研究[J]. *中国药物滥用防治杂志*(TAO Y F, ZHAO Z H, ZHOU H, et al. A comparative study of trazodone and buprenorphine in the treatment of protracted withdrawal syndrome in heroin addicts [J]. *Chinese Journal of Drug Abuse Prevention and Treatment*), 2010, 16(5): 256-7.
- [9] 李重阳, 彭静, 俞诗源. 百合水溶液对麻黄素致损伤小鼠肺组织的影响[J]. *解剖学报*(LI C Y, PENG J, YU S Y. The effect of liliun soup on lung histological structure in mice injured by ephedrine [J]. *Acta Anatomica Sinica*), 2017, 48(6): 746-52.
- [10] 孟茹, 李重阳, 俞诗源, 等. 当归(粗)多糖对麻黄素肝组织损伤的保护作用[J]. *解剖学报*(MENG R, LI C Y, YU S Y, et al. The protection of *Angelica sinensis* polysaccharide on liver histological structure in mice injured by ephedrine [J]. *Acta Anatomica Sinica*), 2015, 46(3): 379-86.
- [11] 陈明珠, 陈少雅, 陈崇宏. 丹参、黄芪小复方对吗啡依赖小鼠复吸行为的抑制作用[J]. *中国药物依赖性杂志*(CHEN M Z, CHEN S Y, CHEN C H. Inhibition of small complex prescription of *salviamiltiorrhiza* and *radix astragali* on relapse behavior in morphine dependent mice [J]. *Chinese Journal of Drug Dependence*), 2008, 17(1): 32-5.
- [12] 李品, 欧芹, 孙洁. 枸杞多糖对衰老大鼠蛋白质氧化损伤影响的实验研究[J]. *中国老年学杂志*(LI P, OU Q, SUN J. Study of effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on protein oxidation damage in D-gal-induced aging rats [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2007, 27(24): 2384-5.
- [13] WANG J, HU Y, WANG D, et al. Sulfated modification can enhance the immune-enhancing activity of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. *Cell Immunol*, 2010, 263(2): 219-23.
- [14] 王君敏, 薛敬礼, 葛蓓蕾, 等. 枸杞多糖及其硫酸酯体外免疫及抗肿瘤活性[J]. *郑州大学学报(医学版)*(WANG J M, XUE J L, GE B L, et al. Immunomodulatory and antitumor activities of *Lycium barbarum* polysaccharides *in vitro* and their sulfates [J]. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*), 2015, 50(6): 809-13.
- [15] 孙甜甜, 高云航, 孙卓, 等. 枸杞多糖研究进展[J]. *中国兽药杂志*(SUN T T, GAO Y H, SUN Z, et al. Research advances of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*), 2018, 52(12): 75-80.
- [16] 俞诗源, 王悦, 郭婷婷, 等. 海洛因对母鼠体重、行为及肺中相关活性物质表达的影响[J]. *西北师范大学学报(自然科学版)*(YU S Y, WANG Y, GUO T T, et al. Effects of heroin on weight, behaviour and expression of interrelated polypeptides in the lungs of female mice [J]. *Journal of Northwest Normal University, Natural Science*), 2010, 46(2): 94-100.
- [17] 严洁, 王秋卉, 许红阳, 等. 强化谷氨酰胺对脓毒血症患者血浆谷胱甘肽浓度的影响[J]. *广东医学*(YAN J, WANG Q H, XU H Y, et al. Effect of fortified glutamine on plasma glutathione concentration in patients with sepsis [J]. *Guangdong Medicine*), 2013, 34(18): 2858-60.
- [18] HUSTER D, REICHENBACH A, REICHEL T W. The glutathione content of retinal Müller (glial) cells: effect of pathological conditions [J]. *Neurochem Int*, 2000, 36: 461-9.
- [19] 陆孟婷, 李平华. 还原型谷胱甘肽对实验性视神经炎视神经和视网膜的影响[J]. *第三军医大学学报*(LU M T, LI P H. Reduced glutathione protects retina and optic nerve of rats after optic neuritis [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*), 2009, 31(7): 604-7.
- [20] 邵惠敏, 魏红娟, 王伟烈, 等. 新生儿缺氧缺血性脑病血浆INS、NPY、LDH、CK水平检测的临床意义[J]. *临床医学研究与实践*(SHAO H M, WEI H J, WANG W L, et al. The clinical significance of the levels of INS, NPY, LDH and CK in the plasma of neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Clinical Medicine Research and Practice*), 2016, 1(3): 39.
- [21] 陈芳, 糜漫天, 白雪, 等. 牛磺酸对高原缺氧大鼠视网膜形态结构及SDH、LDH活性的影响[J]. *第三军医大学学报*(CHEN F, MI M T, BAI X, et al. Effects of taurine on high altitude hypoxia induced changes of retina morphology and SDH, LDH activity [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*), 2006, 28(6): 565-8.
- [22] 彭新明, 李军, 董玉芬, 等. NO、SOD及MDA在大鼠视网膜光损伤的水平变化及其意义[J]. *河北医科大学学报*(PENG X M, LI J, DONG Y F, et al. The variation of NO, SOD and MDA in rat retina after retinal photic injury [J]. *Journal of Hebei Medical University*), 2010, 32(1): 48-50.
- [23] 林美英, 林水龙, 赵晓馥, 等. 七叶皂苷钠对大鼠视网膜缺血再灌注损伤SOD和MDA的影响[J]. *中国伤残医学*(LIN M Y, LIN S L, ZHAO X F, et al. Effect of aescinate on SOD and MDA in rat retina after ischemia-reperfusion injury [J]. *Chinese Journal of Trauma and Disability Medicine*), 2014, 22(2): 20-1.
- [24] YAMAMOTO M, LIDIA K, GONG H, et al. Changes in manganese superoxide dismutase expression after exposure of the retina to intense light [J]. *Histochem J*, 1990, 31: 81-7.
- [25] BAZAN N G, MARCHESELLI V L, COLE-EDWARDS K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1053(1): 137-47.
- [26] 张玉, 颜华. 辛伐他汀对大鼠视网膜缺血再灌注中Bcl-2和Bax表达及细胞凋亡的影响[J]. *中华眼科杂志*(ZHANG Y, YAN



- H. Effect of simvastatin on retinal Bcl-2/Bax expression and cell apoptosis in rats with ischemia-reperfusion injury [J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 2014, 50(11): 826-32.
- [27] 刘海楠, 李生莹, 杨宇平, 等. Bcl-2、Bax在百草枯诱导大鼠视网膜损伤中的表达[J]. 中国药理学通报 (LIU H N, LI S Y, YANG Y P, et al. Expression of Bcl-2 and Bax in rat retina with retinal injury induced by paraquat [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2011, 27(3): 419-22.
- [28] 谢明仁, 李作平, 俞发荣, 等. 海洛因对小脑皮质Bax表达的影响[J]. 实验动物科学(XIE M R, LI Z P, YU F R, et al. Effect of heroin on Bax expression in cerebellar cortex in rat [J]. Laboratory Animal Science, 2013, 30(5): 6-8.
- [29] OSHITARI T, YAMAMOTO S, HATA N, et al. Mitochondria- and Caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy [J]. Br J Ophthalmol, 2008, 92(4): 552-6.
- [30] 沈志军, 王津津, 李根林, 等. 枸杞提取液对成人视网膜神经细胞活性的影响[J]. 中华眼科杂志 (SHEN Z J, WANG J J, LI G L, et al. Effect of extract of *Lycium barbarum* on adult human retinal nerve cells [J]. Chinese Journal of Ophthalmology), 2012, 48(9): 824-8.
- [31] ZHANG Y, LI Y M, WANG Y X, et al. Remifentanyl preconditioning alleviating brain damage of cerebral ischemia reperfusion rats by regulating the JNK signal pathway and TNF- $\alpha$ /TNFR1 signal pathway [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(12): 6997-7006.
- [32] 游志鹏, 陈珊, 赵菊莲, 等. TNF- $\alpha$ 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的表达及NAC对其表达的影响[J]. 眼科新进展 (YOU Z P, CHEN S, ZHAO J L, et al. Expression of TNF- $\alpha$  in retinal ischemia-reperfusion injury in rats and the effect of NAC on it [J]. Rec Adv Ophthalmol), 2006, 26(5): 351-3.
- [33] 谢芬高, 宋庆磊, 张希洲, 等. TNF- $\alpha$ 在视网膜神经变性性疾病中的作用[J]. 基础医学与临床 (XIE F G, SONG Q L, ZHANG X Z, et al. Role of TNF- $\alpha$  in retinal neural degeneration diseases [J]. Basic & Clinical Medicine), 2015, 35(2): 262-5.
- [34] 俞诗源, 孟茹, 李重阳, 等. 当归多糖对麻黄素小鼠肝组织抗氧化酶活性和NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 表达的影响[J]. 西北师范大学学报(自然科学版)(YU S Y, MENG R, LI C Y, et al. The effect of Angelica sinensis polysaccharide on activities of antioxidant enzyme and expressions of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  in liver tissue of the mice injured by ephedrine [J]. Journal of Northwest Normal University, Natural Science), 2015, 51(1): 75-81.