

一种浆果草本饮料对视神经挤压伤小鼠视网膜细胞及其抗氧化能力的影响

徐文流, 翁少全, 徐海宁*

(广州王老吉大健康产业有限公司, 广东广州 510623)

摘要:为探究一款浆果草本饮料的护眼功效,采用视神经挤压伤模型小鼠,术前术后分别灌胃7 d,实验组灌胃饮料剂量为0.1、1、10、100 mg/kg,对照组灌胃磷酸盐缓冲溶液,利用视网膜平铺免疫荧光染色、视网膜蛋白免疫印迹检测和活性氧(ROS)荧光探针检测方法,测定灌胃14 d后小鼠视网膜神经节细胞的存活数目、视网膜蛋白表达情况和视网膜氧化应激水平。结果表明,该护眼功能饮料对视神经节细胞(RGCs)存活量的影响是浓度依赖性的,4个剂量组中只有10 mg/kg剂量组RGCs存活量与对照组相比显著增加($P < 0.05$),提高了约8.25%;在此剂量下,视网膜的免疫炎症细胞小胶质细胞的激活和极化无明显变化;但视网膜内抗氧化应激相关蛋白锰超氧化物歧化酶(MnSOD)、血红素氧合酶1(HO-1)和核因子样蛋白(Nrf-2)有明显提升;同时实验组挤压伤眼与自身对照对侧眼的视网膜的ROS水平分别降低约25.62%与16.95%。表明此护眼功能饮料可通过保持视网膜神经节细胞活性,增强视网膜的抗氧化能力及降低视网膜活性氧水平从而达到护眼功效。

关键词:护眼功效,视网膜神经节细胞,小胶质细胞,活性氧,抗氧化应激,药食同源,枸杞

Effects of One Berry Herbal Beverage on Retinal Cells and Antioxidant Capacity in Optic Nerve Crushed Mice

XU Wenliu, WENG Shaoquan, XU Haining*

(Guangzhou Wanglaoji Health Industry Co., Ltd., Guangzhou 510623, China)

Abstract:To explore the eye protection effect of one berry herbal beverage, optic nerve crush model mice were used. The beverage was administered intragastrically daily for 7 days before and after optic nerve crushed, respectively. The gavage dose of the experimental group was 0.1, 1, 10, 100 mg/kg, and the control group was gavage with phosphate buffer solution. Immunofluorescence staining of retinal stretching preparation, western blot analysis and reactive oxygen species (ROS) fluorescent probe were applied to determine the survival of retinal ganglion cells, retinal protein expression and retinal oxidative stress level of mice after 14 days' intragastric administration. The results showed that this eye-protecting beverage affected retinal ganglion cells (RGCs) in a dose-dependent manner. Among the 4 dose groups, only 10 mg/kg group significantly increased the survival of retinal ganglion cells (RGCs) by about 8.25% compared with the control group ($P < 0.05$). Under the above-mentioned dosage, there was no significant change observed in the activation and polarization of microglia, a retinal immunoinflammatory cell. But the content of some oxidative stress related proteins in retina, including manganese superoxide dismutase (MnSOD), heme oxygenase 1 (HO-1) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2), increased significantly. Meanwhile, the ROS level of retina of experimental group was decreased by about 25.62% and 16.95% for crush injured eye and self-control contralateral eye respectively. Therefore, this beverage could protect eyes by maintaining the activity of retinal ganglion cells, enhancing the antioxidant capacity of retina and reducing the level of reactive oxygen species of retina.

Key words: eye protection efficacy; retinal ganglion cells; microglia; reactive oxygen species; anti-oxidative stress; medicine food homology; wolfberry

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)04-0288-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050301

引文格式:徐文流,翁少全,徐海宁.一种浆果草本饮料对视神经挤压伤小鼠视网膜细胞及其抗氧化能力的影响[J].食品工业科技,2021,42(4):288-294.

XU Wenliu, WENG Shaoquan, XU Haining. Effects of One Berry Herbal Beverage on Retinal Cells and Antioxidant

收稿日期: 2020-05-26

作者简介: 徐文流(1963-),男,硕士研究生,高级工程师,研究方向:临床药理, E-mail: wljdjx@126.com。

* 通信作者: 徐海宁(1986-),男,博士,研究方向:食品科学, E-mail: xhn_0605@163.com。

Capacity in Optic Nerve Crushed Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 288-294. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

随着手机、电脑、电视等视频终端的广泛普及和应用,人们从事近距离精细用眼的工作越来越多,过度用眼的状况也越来越严重,这使得眼睛出现了眼酸胀痛、干湿流泪等不适症状,这些症状严重影响了人们的身心健康及生活质量。

传统中药中包含多种具有护眼功效的药食同源物质,近来许多研究进一步证实了其对眼睛的保护作用。枸杞子(*Lycium barbarum*)味甘、性平,归肝、肾经,具有滋补肝肾,益精明目的作用;Li等研究表明枸杞可提高大鼠视神经部分横断后视网膜神经节细胞(Retinal Ganglion Cells, RGCs)存活率,并影响小胶质细胞/巨噬细胞的极化和自噬,延缓视神经轴突的二次变性^[1-2];枸杞子所含的枸杞多糖被证明能够极大促进色素性视网膜炎模型小鼠的光感受器存活情况,延缓光感受器退化期间RGCs的功能衰退,同时能有效缓解与许多眼科疾病密切相关的视网膜缺血所引起的视网膜功能障碍^[3-4]。桑葚(*Morus alba* L.)味甘性寒,入心、肝、肾经,有滋阴补血作用;桑葚具有很好的抗氧化、抗自由基的功效^[5];Lee等发现长期摄入桑葚中提取的矢车菊素-3-葡萄糖苷可减轻N-甲基-N-亚硝基氧化诱导的大鼠视网膜退化^[6];Jang等发现从桑葚中提取的花青素可以保护视网膜神经免受亚硝基甲脲诱导的结构和功能损伤^[7]。覆盆子(*Rubus idaeus* L.),味甘、酸,性平,具有补肝肾,明目的作用;作为浆果类植物,其所富含的酚类物质,如酚酸、类黄酮-类黄酮醇、花青素、单宁酸和抗坏血酸等,具有很强的抗氧化性^[8];一项双盲安慰剂对照研究表明,口服花青素有助视紫红质的产生,而视紫红质有助于将光转化为大脑的电信号^[9];最近一些研究表明,覆盆子可改善高脂血症^[10],具有抗氧化应激的作用^[11]。菊花(*Chrysanthemum morifolium* Ramat)味甘、苦,微寒,归肺、肝经,具有散风清热、平肝明目的作用;研究表明菊花热水浸提液具有显著的抗氧化、抗炎等功效^[12];Shen等发现菊花中的香叶木素可通过减少DNA损伤和氧化应激来保护视网膜免受损伤^[13]。决明子(*Cassia semen*)味苦、甘、咸,性微寒,归肝、大肠经,可清热明目,润肠通便;Jang等发现决明子中的某些蒽醌类物质可以显著的抑制大鼠晶状体醛糖还原酶的活性及糖基化终末产物的形成^[7];决明子中的决明蒽醌可以抑制氧化改性DNA和亚硝基酪氨酸在视网膜中积累,对糖尿病导致的视网膜病变发挥有益影响^[14]。目前缓解视疲劳的功能性产品多是在基于传统中医学对视疲劳与肝关系密切的理论认识基础上,配方多从补肝明目入手选择原料,通过疏泻肝火而起到缓解视疲劳的作用。从肝论治视疲劳最具代表性的中药枸杞子、菊花、决明子恰是使用频次最高的3种药食同源类中药。

本研究拟对一款以浆果和草本为原料的护眼功能饮料进行功效评价,主要考察其对视网膜细胞及其抗氧化能力的影响。该护眼功能饮料由上述具有

护眼功效的原料(枸杞子、菊花、桑葚、覆盆子和决明子)经浸提后配制而成。本实验采用可造成RGCs进行性死亡的小鼠视神经挤压伤模型,给予小鼠护眼功能饮料灌胃,通过检测小鼠视网膜节细胞的存活数目、视网膜蛋白表达情况和视网膜氧化应激水平,对该饮料的护眼功效进行评价。

1 材料及方法

1.1 材料与仪器

5周龄的C57雄性小鼠(体重约为18~20g) 广东省医学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2018-0002;枸杞、桑葚、覆盆子、菊花、决明子 广州当地药材市场;抗体 goat anti mouse Brn3a、抗体 donkey anti goat 594 Abcam公司;ROS荧光探针-二氢乙啶(Dihydroethidium, DHE) 赛默飞世尔公司;血红素氧合酶-1(Heme Oxygenase 1, HO-1)抗体、核因子相关因子-2(Nuclear Factor Erythroid-2-related Factor 2, Nrf-2)抗体、钙离子结合蛋白(Ionized Calcium-binding Adapter Molecule 1, Iba-1)抗体、锰超氧歧化酶2(Manganese Superoxide Dismutase, MnSOD)抗体、精氨酸酶-1(Arginase-1, Arg-1)抗体、诱导性一氧化氮合酶(Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)抗体、白细胞介素(Interleukin-6, IL-6)抗体、分化群206蛋白(Cluster of Differentiation 206, CD206)抗体、微管蛋白(Tubulin)抗体、肌动蛋白(Actin)抗体 Sigma-Aldrich公司。

Avanti J-15R 高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司;Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽、PowerPac 基础电泳仪电源、Trans-Blot Turbo 转印系统 美国 Bio-Rad 公司;Tanon3500 凝胶图像分析系统 中国天能公司;CM3050S 冰冻切片机、正置荧光显微镜 德国 Leica 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 浆果草本护眼功能饮料制备 按照中医传统理论,选择三种最具代表性的具有护眼功效的3味药食同源类中药枸杞、菊花、决明子,辅以富含花青素的桑葚、覆盆子组方浸提作为基质,调配草本浆果护眼功能饮料。在前期感官评定实验的基础上,确定五种浆果草本原料的质量配比为枸杞60%、桑葚20%、菊花15%、覆盆子2.5%、决明子2.5%。将上述物料按比例混合,按照料液比1:18加入RO纯水,95℃保温浸提90min,随后经过滤、离心、浓缩得到护眼草本浓缩汁,其可溶固形物含量为11%,最终将4.5%护眼草本浓缩汁、8%白砂糖、0.2%柠檬酸、0.1%苹果酸等辅料混合调配杀菌制得浆果草本护眼功能饮料,其成品中浆果草本可溶固形物含量为0.5%。

1.2.2 实验模型制作 制作视神经挤压伤模型小鼠,小鼠异氟烷气体吸入麻醉及眼表面麻醉后,剪开眼外侧皮肤暴露出外侧眼球,钝性分离并暴露视神经,在距视盘0.5mm处钳夹视神经10s,注意避免损

伤视神经下眼部血管。眼底镜检查确认视网膜血管的血流状态。均选择左眼为模型眼,右眼为对照。

1.2.3 实验分组和流程 实验组灌胃护眼功能饮料,剂量为 0.1、1、10、100 mg/kg(以饮料所含草本干物质计);对照组使用灭菌的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)灌胃。该实验从术前的-7 d 开始灌胃,直到术后取材前 6 d,共 14 d(图 1)。所有小鼠灌胃体积均为 0.4 mL,其中测试饮料使用灭菌的 0.01 mol/L PBS 稀释,每次灌胃前新鲜配制,现配现用。

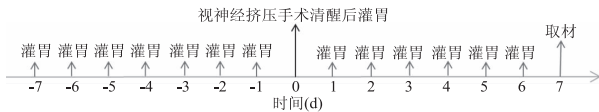


图 1 实验流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of experiment flow

1.2.4 护眼功能饮料对小鼠 RGCs 存活率的影响 采用视网膜平铺免疫荧光染色的方法测定。术后 7 d 处死小鼠,取出眼球于 4% 多聚甲醛中固定 1 h,在 0.01 mol/L PBS 中剥离视网膜并剪成四叶草状(即 4 个象限)。使用 10% BSA 封闭视网膜,goat anti mouse Brn3a 1:1000 作为一抗,donkey anti goat 594 1:500 作为二抗。最后使用荧光封片剂封片。在 400 倍显微镜下拍照,每个象限从视神经开始,沿正中线每隔 500 μm 拍一张($200 \times 200 \mu\text{m}^2$),一个视网膜 16 张(图 2),计数后平均为每平方毫米节细胞个数。



图 2 视网膜平铺免疫荧光染色处理示意图

Fig.2 Diagram of immunofluorescence staining of retinal stretching preparation

1.2.5 护眼功能饮料对小鼠视网膜蛋白的影响 采用蛋白免疫印迹检测。术后 7 d 处死小鼠,冰冻剥离新鲜视网膜后,超声破碎细胞并离心取上清,提取出视网膜内蛋白。按照蛋白免疫印迹检测(Western blot)步骤检测视网膜内相关蛋白质分子含量。主要检测蛋白:与小胶质细胞相关的 Iba-1(1:1000)、iNOS(1:500)、IL-6(1:1000)、CD206(1:1000)和 Arg-1(1:1000);与氧化应激相关的 HO-1(1:2000)、Nrf-2(1:1000)和 MnSOD(1:2000);内参蛋白包括微管蛋白(Tubulin,1:10000)和肌动蛋白(Actin,1:4000)。

1.2.6 ROS 荧光探针检测 将小鼠过量麻醉处死,取出眼球 PFA 固定 1 h,然后放入 30% 蔗糖在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱里面沉糖 2 d,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 包埋。将眼球包埋块冰冻切片,只取带视神经头的切片,每个视网膜至少 3 张切片。按照试剂盒说明,用 PBS 将二氢乙啶(DHE)荧光探针稀释到工作浓度,然后将冰冻切片在 37 $^{\circ}\text{C}$ 用稀释后的工作液孵育 30 min;DHE 会进入细胞内,被细胞内的活性氧化形成氧化乙啶,产生红色荧光。荧光越强代表细胞内氧化应激反应越强。封片

后,在 200 倍荧光显微镜视野下,选取距离视神经头 1 mm 处各拍一张照片($400 \times 400 \mu\text{m}^2$),每个视网膜 6 张(图 3)。使用 ImageJ 软件统计每张照片的阳性密度值,平均 6 张照片得出每个视网膜的阳性密度值。

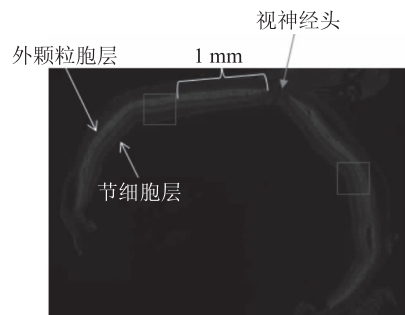


图 3 ROS 荧光探针-DHE 检测示意图

Fig.3 Diagram of ROS fluorescent probe-DHE detection

1.3 数据处理

统计分析及作图采用 GraphPad Prism 8 软件。测定结果以平均值 \pm 标准误差表示。所有比较均在两组之间进行(Student's T-test), $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 护眼功能饮料对小鼠视网膜神经节细胞(RGCs)存活率的影响

RGCs 提供了将视网膜处理的所有视觉信息传输到大脑的最后一个公共通道^[15]。因此,RGCs 变性具有重要的视觉影响,可导致多种疾病,包括青光眼、遗传性视神经病变、缺血性视神经病变和脱髓鞘病,是世界范围内不可逆失明的主要原因。视神经挤压伤小鼠模型是国际上广泛使用的 RGCs 死亡的动物模型,通过钳夹视神经一段时间造成部分 RGCs 的进行性死亡。实验通过视网膜平铺免疫荧光染色计数存活的 RGCs(图 4),在视神经挤压损伤 7 d 后,0.1、1、10、100 mg/kg 四个剂量组中,10 mg/kg 剂量实验组小鼠视网膜神经节细胞存活量 $1024 \text{ cell}/\text{mm}^2$ 高于对照组 $946 \text{ cell}/\text{mm}^2$ ($P < 0.05$),提高了约 8.25%;而 0.1、1 和 100 mg/kg 剂量组与对照组相比无显著差异($P > 0.05$)(图 5)。因此相较于空白对照组,4 个剂量组中只有 10 mg/kg 剂量组 RGCs 存活量显著增加($P < 0.05$),而在较低或较高的摄入量下,护眼功能饮料对 RGCs 的存活量影响不显著,这说明护眼功能饮料对 RGCs 存活量的影响是浓度依赖的。由于本次测定剂量选择范围较宽,依次 10 倍递增,最大剂量是最小剂量的 1000 倍,因此 0.1 和 1 mg/kg 的低摄入量不足以明显改善 RGCs 的存活情况,而过高的摄入量 100 mg/kg 可能超出小鼠的耐受程度,也不利于其功效的发挥。这表明在适度的剂量下该护眼饮料对 RGCs 发挥了一定保护作用。Li 等采用视神经横断模型小鼠,发现枸杞多糖可以延缓视神经损伤后 RGCs 的继发性退变^[1],这与本文结论一致,特别考虑到测定饮料中枸杞占草本植物原料的比例达到 60%。

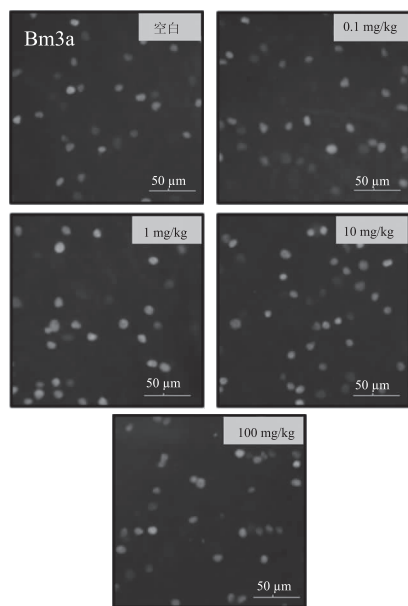


图4 不同灌胃剂量小鼠视网膜免疫荧光染色图

Fig.4 Immunofluorescence staining of retinal stretching preparation of mouse with different intragastrical administration dosage

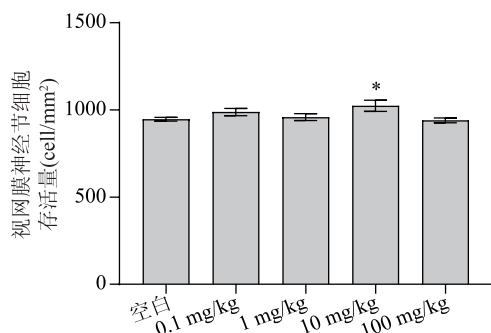


图5 不同灌胃剂量小鼠视网膜神经节细胞存活量

Fig.5 Survival of retinal ganglion cells (RGCs) of mouse with different intragastrical administration dosage

注: * 表示与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$), 各组样本数 $N = 7$ 。

导致 RGCs 死亡的因素非常复杂,例如在不健康用眼导致的青光眼中,因素包括小胶质细胞的激活、自噬作用、钙调节紊乱、细胞凋亡、氧化应激、促凋亡蛋白表达等。而已有的研究表明枸杞所含的枸杞多糖能够调节小胶质细胞的激活和极化且具有良好的抗氧化应激作用^[4],浆果草本提取液中的酚酸、类黄酮、花青素、单宁等也都具有很强的抗氧化性。因此可推测该护眼功能饮料中所含的枸杞多糖、天然抗氧化物质等多种功效成分,通过调节小胶质细胞生理功能和抗氧化应激等途径,对 RGCs 产生一定的保护作用。

2.2 护眼功能饮料对小鼠视网膜小胶质细胞的影响

视网膜是具有高度有序的多细胞层的复杂组织。它的精细复杂结构导致其对内部和外部超出自稳范围的扰动极为敏感。这就需要对视网膜进行连续监视,以发现有害的刺激。这一任务主要由小胶质细胞执行,它是视网膜组织的常驻巨噬细胞,提供

神经保护,以应对瞬时的病理生理损伤^[16]。

在本研究中,利用免疫印迹分析,测定与小胶质细胞的活化及分化密切相关的蛋白的表达情况,推测摄入该饮料对小胶质细胞的影响。测定结果显示 10 mg/kg 饮料剂量组 Iba-1、iNOS、Arg-1 和 CD206 四种蛋白的含量较对照组无显著差异 ($P > 0.05$) (图 6)。其中 Iba-1 是小胶质细胞激活后高度表达的一种蛋白,可表征小胶质细胞的活化情况^[17]。在小胶质细胞激活后,可极化为 M1 型和 M2 型;M1 型细胞表达包括 iNOS 与 IL-6 在内的促炎细胞因子,以消灭致病性微生物,抑制细胞增殖,诱导组织损伤;另一方面,M2 型小胶质细胞表达 Arg-1 与 CD206 等抗炎因子,下调炎症反应,促进血管生成,参与组织重塑和修复^[18]。因此 iNOS 与 IL-6 可表征 M1 型极化情况,Arg-1 与 CD206 可表征 M2 型极化情况。在长期炎症刺激下,M1/M2 型小胶质细胞的平衡被打破,小胶质细胞逐渐转化为 M1 型,释放大量的炎症因子,参与视网膜疾病的发生发展^[19]。研究表明,视网膜黄斑变性、遗传性视网膜病变、青光眼、糖尿病视网膜病变等不同视网膜退化疾病都与小胶质细胞的反应活性和慢性炎症反应密切相关,并且通过药理靶向作用于过度反应的小胶质细胞可以改善上述疾病的发病机制^[20]。因此虽然摄食该护眼饮料不会显著影响小鼠视网膜中免疫炎症细胞小胶质细胞的激活和极化情况,但是 Arg-1 与 CD206 的表达均出现一定程度上升(图 6),表明在一定程度上促进了小胶质细胞的 M2 型极化,促进了组织修复,也即该护眼饮料在一定程度上促进了小胶质细胞活化和促组织修复的 M2 型极化。与本文研究结论类似,Li 等分别利用分化群 68 蛋白(CD68)与 Arg-1 表征小胶质细胞

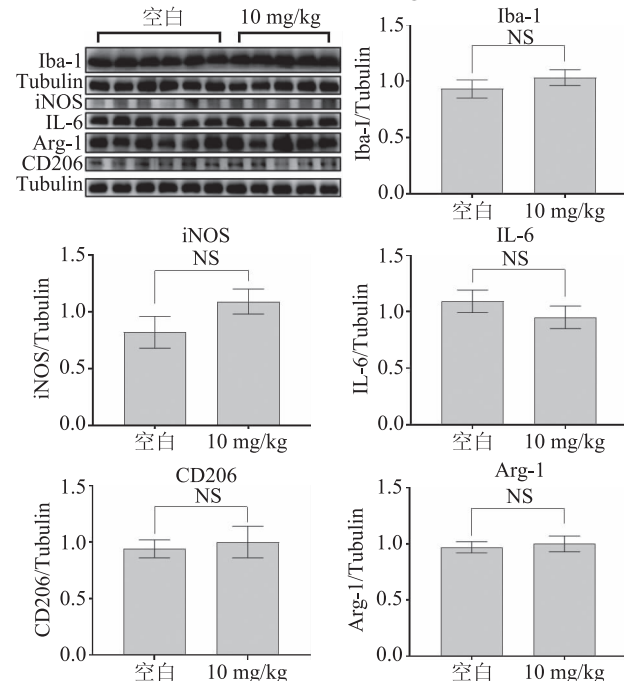


图6 小胶质细胞激活与极化相关蛋白免疫印迹检测结果

Fig.6 Western blot result of activation and polarization related protein of microglial

注:样本数 $N_{\text{control}} = 6, N_{10 \text{ mg/kg}} = 5$, NS 表示差异不显著。

细胞的激活和 M2 极化情况,发现枸杞多糖可以显著促进小胶质细胞的激活和 M2 型极化^[1]。

由于小胶质细胞维持眼部正常生理时发挥的调节作用比较复杂,既可以因自噬水平的提高促进 RGCs 的死亡,又可以通过自噬对 RGCs 产生保护作用。在持续的病理刺激下,小胶质细胞的炎症应答反应变得失调,经常恶化疾病。小胶质细胞的双刃剑作用导致其激活在不同的病理阶段发挥完全不同甚至相反的作用,因此后续的研究将测定术后不同病理期内的的小胶质细胞活性情况,可以更好的了解所测护眼饮料的护眼作用机理。

2.3 护眼功能饮料对小鼠视网膜抗氧化应激相关蛋白的影响

视网膜因其高耗氧量和比例的多不饱和脂肪酸含量而特别容易受到氧化应激的影响。细胞内 ROS 平衡被打破时,ROS 在细胞内积累并最终导致氧化应激反应,进一步引起炎症反应,炎症反应又能够促进活性氧的产生^[21]。特别是视网膜色素上皮细胞(RPE)细胞长期暴露在光刺激、接受丰富灌注和吞噬脂类物质环境中,日积月累的氧化损伤最终导致 RPE 细胞功能障碍甚至是凋亡^[22-23]。因此,抑制氧化应激和炎症反应的发生是预防视网膜退化等相关眼部疾病发生的一个有效方法。为了测定摄入该护眼饮料对小鼠视网膜氧化应激水平的影响,利用免疫印迹分析,测定与氧化应激密切相关的蛋白酶及因子 MnSOD、HO-1 与 Nrf-2 的表达情况。实验结果表明,10 mg/kg 剂量组 MnSOD 表达显著提升($P < 0.05$)表达显著提升($P < 0.05$),HO-1 和 Nrf-2 的表达有极显著提升($P < 0.01$),分别增加约 33.73%、45.78% 和 200.00% (图 7)。

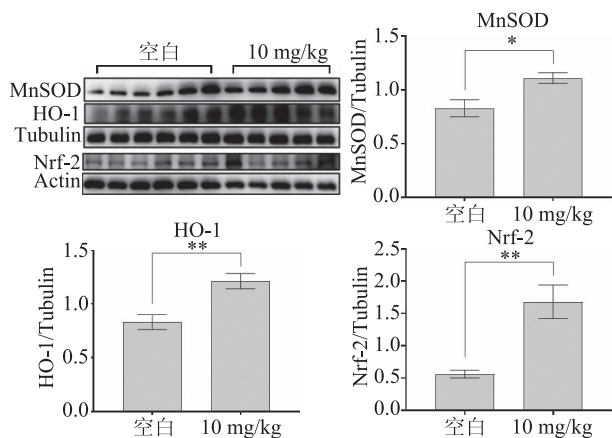


图7 视网膜内抗氧化应激相关蛋白免疫印迹分析

Fig.7 Western blot analysis of oxidative stress related protein in retina

注: * 表示差异显著($P < 0.05$),

** 表示差异极显著($P < 0.01$);图 8 同。

MnSOD 能够清除超氧化物保护细胞免受氧化损伤,HO-1 具有维持细胞稳态和抗氧化作用,Nrf-2 是内源性防御体系关键蛋白,调节抗氧化蛋白的表达,保护机体免受损伤和炎症引起的氧化损伤^[24]。研究表明,MnSOD 和 Nrf-2 在糖尿病视网膜病变中发挥

保护作用,通过降低视网膜内的 ROS 水平,从而维持血液-视网膜屏障及视神经的正常功能^[11]。HO-1 被证明在保护视网膜免受光损伤方面发挥重要的作用^[24]。由此推测该护眼饮料可能通过提升视网膜中氧化应激相关蛋白酶与因子 MnSOD、HO-1 与 Nrf-2 的表达水平,对视网膜产生一定保护作用。

2.4 护眼功能饮料对小鼠视网膜氧化反应水平的影响

天然产物中存在大量安全且有效的抗氧化剂,通过摄食可以改善机体的氧化还原水平^[25]。虽然近来许多研究为 ROS 在正常细胞功能中的重要生理作用提供了一些证据,但 ROS 普遍存在而引起的氧化应激以及浓度超过人体对它们的天然防御所导致的细胞稳态失衡一直被认为是各种眼病的发病机制之一^[26]。因此考察了摄食该护眼饮料对小鼠视网膜总体的氧化还原水平的影响,利用 ROS 荧光探针-DHE 测定了视网膜内总体 ROS 水平。DHE 可自由透过细胞膜,主要被超氧阴离子型 ROS 氧化为氧化乙啶,掺入染色体 DNA 中产生红色荧光。实验结果表明,对于 10 mg/kg 饮料剂量组,不管是钳夹视神经损伤左眼还是对照侧右眼,其视网膜的外核层(ONL)、内核层(INL)及节细胞层(RGCL)的红色荧光强度均肉眼可见低于相应对照组,方差分析表明其平均 DHE 阳性密度值均显著低于相应对照组($P < 0.05$) (图 8),表明实验组 ROS 水平显著低于对照组。经计算,左眼与自身对照右眼的 ROS 水平分别降低了约 25.62% 与 16.95%。这表明该护眼饮料可以降低视网膜中总体 ROS 水平,从而对视网膜起到一定的保护作用。

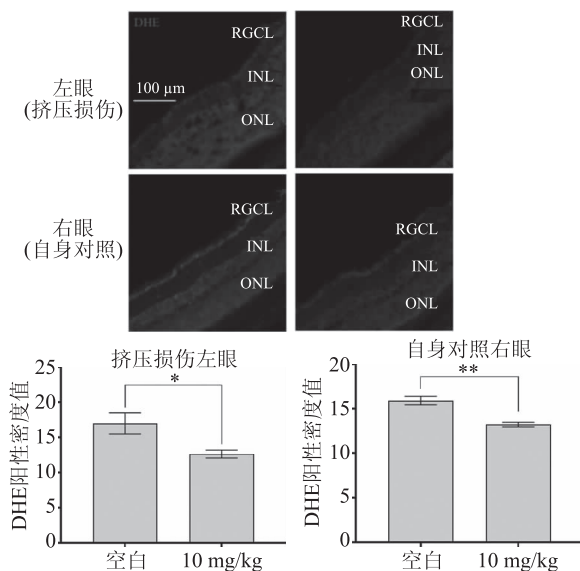


图8 视网膜冰冻切片 DHE 免疫荧光染色

Fig.8 DHE immunofluorescence staining of retinal frozen sections

注:各组样本数 N=5。

研究显示该护眼饮料所用的五种原料枸杞、桑葚、菊花、覆盆子和决明子均具有良好的体内和体外抗氧化能力。临床研究表明枸杞可以提高人体血清中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶水平,降低

脂质过氧化水平来发挥其抗氧化效能^[27]。Wang 等研究发现菊花水提物可以通过与上述枸杞相似方式抑制高脂血症大鼠体内的氧化应激积聚^[28]。Raman 等发现桑葚的类黄酮提取物能够抑制小鼠肝脏、线粒体和微粒体中的脂质过氧化^[29]。Liu 等研究发现决明子多糖提取物的羟基和超氧化物自由基的体外清除能力优于抗坏血酸^[30]。大量的研究表明覆盆子所含的花青素可以通过清除自由基保护细胞和机体免受氧化损伤^[31]。因此该护眼功能饮料对视网膜氧化还原稳态的促进作用可能源于其高效的体内外抗氧化能力。有研究表明浆果植物越橘所含的 15 种花青素中的大部分可以完整的转运至活体动物的眼部或视网膜部位^[32]，因此可以合理推测本护眼饮料所含桑葚、覆盆子浆果浸提得到的花青素可部分直接在视网膜中发挥清除氧自由基、猝灭活性氧的作用，进而促进视网膜氧化还原稳态的维持，达到护目的功效。

3 结论

综上，为测定一款浆果草本饮料的护眼功效，采用视神经挤压伤模型小鼠，测定对视网膜神经节细胞存活情况、小胶质细胞激活与分化极化情况、氧化应激密切相关蛋白酶及活性因子的表达水平以及视网膜的总体活性氧化产物水平的影响，发现 10 mg/kg 护眼功能饮料剂量下，视网膜神经节细胞存活率提高了 8.25%，抗氧化蛋白酶及因子 MnSOD、HO-1 和 Nrf-2 的表达分别增加约 33.73%、45.78% 和 200.00%，挤压损伤左眼与自身对照右眼的 ROS 水平分别降低了约 25.62% 与 16.95%。因此该款以浆果草本为原料的护眼功能饮料可以通过提高视网膜神经节细胞的存活率，提高抗氧化蛋白酶及因子的表达增强视网膜的抗氧化能力，降低视网膜的活性氧化产物水平，达到对视网膜及视力的保护作用。

参考文献

[1] Li H-Y, Huang M, Luo Q-Y, et al. *Lycium barbarum* (wolfberry) increases retinal ganglion cell survival and affects both microglia/macrophage polarization and autophagy after rat partial optic nerve transection [J]. *Cell Transplantation*, 2019, 28 (5): 607-618.

[2] Li H-Y, Ruan Y-W, Kau P W-F, et al. Effect of *Lycium barbarum* (wolfberry) on alleviating axonal degeneration after partial optic nerve transection [J]. *Cell Transplantation*, 2015, 24 (3): 403-417.

[3] Liu F, Zhang J, Xiang Z, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect retina in rd1 mice during photoreceptor degeneration [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2018, 59 (1): 597.

[4] Yang D, So K-F, Lo A C. *Lycium barbarum* polysaccharide extracts preserve retinal function and attenuate inner retinal neuronal damage in a mouse model of transient retinal ischaemia; *Lycium barbarum* protect mouse retina [J]. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 2017, 45 (7): 717-729.

[5] Chen W, Li Y, Bao T, et al. Mulberry fruit extract affords protection against ethyl carbamate-induced cytotoxicity and

oxidative stress [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 1-12.

[6] Lee S H, Jeong E, Paik S-S, et al. Cyanidin-3-glucoside extracted from mulberry fruit can reduce N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats [J]. *Current Eye Research*, 2014, 39 (1): 79-87.

[7] Jang D S, Lee G Y, Kim Y S, et al. Anthraquinones from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on protein glycation and aldose reductase [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30 (11): 2207-2210.

[8] Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, et al. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16 (10): 24673-24706.

[9] Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51 (6): 675-683.

[10] Tu L, Sun H, Tang M, et al. Red raspberry extract (*Rubus idaeus* L. shrub) intake ameliorates hyperlipidemia in HFD-induced mice through PPAR signaling pathway [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 133: 110796.

[11] Chen L, Li K, Liu Q, et al. Protective effects of raspberry on the oxidative damage in HepG2 cells through Keap1/Nrf2-dependent signaling pathway [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 133: 110781.

[12] Li Y, Yang P, Luo Y, et al. Chemical compositions of chrysanthemum teas and their anti-inflammatory and antioxidant properties [J]. *Food Chemistry*, 2019, 286: 8-16.

[13] Shen Z, Shao J, Dai J, et al. Diosmetin protects against retinal injury via reduction of DNA damage and oxidative stress [J]. *Toxicology Reports*, 2016, 3: 78-86.

[14] Hou B, He S, Gong Y, et al. Effect of obtusifolin administration on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, 70 (3): 1655-1661.

[15] Isenmann S. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration [J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2003, 22 (4): 483-543.

[16] Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, et al. Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? [J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2015, 45: 30-57.

[17] Ahmed Z, Shaw G, Sharma V P, et al. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2007, 55 (7): 687-700.

[18] Zhou T, Huang Z, Sun X, et al. Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration [J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2017, 11: 77.

[19] Cherry J D, Olschowka J A, O'Banion M. Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2014, 11 (1): 98.

[20] Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T. Microglia in retinal degeneration [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1975.

- [21] Nicholls S J. The complex intersection of inflammation and oxidation [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 52(17): 1379–1380.
- [22] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function [J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(3): 845–881.
- [23] Garg T K, Chang J Y. Oxidative stress causes ERK phosphorylation and cell death in cultured retinal pigment epithelium: Prevention of cell death by AG126 and 15-deoxy-delta 12,14-PGJ2 [J]. *BMC Ophthalmology*, 2003, 3(1): 5.
- [24] Bajpai V K, Alam M B, Quan K T, et al. Antioxidant efficacy and the upregulation of Nrf2-mediated HO-1 expression by (+)-lariciresinol, a lignan isolated from *Rubia philippinensis*, through the activation of p38 [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 46035.
- [25] Cardoso S. Special Issue: The antioxidant capacities of natural products [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 492.
- [26] Ung L, Pattamatta U, Carnt N, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species: A review of their role in ocular disease [J]. *Clinical Science*, 2017, 131(24): 2865–2883.
- [27] Amagase H, Sun B, Borek C. *Lycium barbarum* (goji) juice

- improves *in vivo* antioxidant biomarkers in serum of healthy adults [J]. *Nutrition Research*, 2009, 29(1): 19–25.
- [28] Wang F, Miao M, Xia H, et al. Antioxidant activities of aqueous extracts from 12 Chinese edible flowers *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food & Nutrition Research*, 2017, 61(1): 1265324.
- [29] Raman S, Ganeshan A K G, Chen C, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of flavonoid extracted from mulberry fruit (*Morus alba* L.) [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2016, 12(46): 128.
- [30] Liu C, Liu Q, Sun J, et al. Extraction of water-soluble polysaccharide and the antioxidant activity from *Semen cassiae* [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2014, 22(4): 492–499.
- [31] Teng H, Fang T, Lin Q, et al. Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 66: 153–165.
- [32] Kalt W, Blumberg J B, McDonald J E, et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56: 705–712.

(上接第 180 页)

- [J]. *Food Chemistry*, 2019, 294: 209–215.
- [12] Liu J, Pu H M, Liu S, et al. Synthesis, characterization, bioactivity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 174: 999–1017.
- [13] Zhu F, Cai Y Z, Sun M, et al. Effect of phenolic compounds on the pasting and textural properties of wheat starch [J]. *Starch-Stärke*, 2008, 60(11): 609–616.
- [14] Liu J, Yong H M, Liu Y P, et al. Recent advances in the preparation, structural characteristics, biological properties and applications of Gallic acid grafted polysaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156: 1539–1555.
- [15] 王颖丽, 李福香, 杨雅轩, 等. 多糖与多酚相互作用机制及其对多酚特性的影响研究进展 [J]. *食品科学*, 2017, 38(11): 276–282.
- [16] Karunaratne R, Zhu F. Physicochemical interactions of maize starch with ferulic acid [J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 372–379.
- [17] Beta T, Corke H. Effect of ferulic acid and catechin on *Sorghum* and maize starch pasting properties [J]. *Cereal Chemistry Journal*, 2004, 81(3): 418–422.
- [18] Wu Y, Xu H L, Lin Q L, et al. Pasting, thermal and rheological properties of rice starch in aqueous solutions with different catechins [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2015, 39(6): 2074–2080.
- [19] Chi C D, Li X X, Zhang Y P, et al. Modulating the *in vitro* digestibility and predicted glycemic index of rice starch gels by complexation with Gallic acid [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 821–828.
- [20] Li M, Pernel C, Ferruzzi M G. Complexation with phenolic acids affect rheological properties and digestibility of potato starch and maize amylopectin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 77:

843–852.

- [21] Li S N, Wang C, Fu X, et al. Encapsulation of lutein into swelled cornstarch granules: Structure, stability and *in vitro* digestion [J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 362–368.
- [22] Feng H M, Li C, Tan C P, et al. Physicochemical properties and *in vitro* bioaccessibility of lutein loaded emulsions stabilized by corn fiber gums [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(61): 38243–38250.
- [23] 王哲, 白志明, 田娟娟, 等. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量 [J]. *中国油脂*, 2005, 30(1): 52–54.
- [24] American Association of Cereal Chemistry. *Methods 61–02 for RVA* [A]. 9th ed. Saint Paul: AACC, 2000.
- [25] Luo Y, Shen M Y, Li E P, et al. Effect of *Mesona chinensis* polysaccharide on pasting, rheological and structural properties of corn starches varying in amylose contents [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 230: 115713.
- [26] 任顺成, 孙晓莎. 芦丁和槲皮素对小麦淀粉理化特性的影响 [J]. *食品科学*, 2018, 39(2): 25–30.
- [27] 缪铭, 江波, 张涛. 淀粉的消化性能与 RVA 曲线特征值的相关性研究 [J]. *食品科学*, 2009, 30(5): 16–19.
- [28] Zhou D N, Zhang B, Chen B, et al. Effects of oligosaccharides on pasting, thermal and rheological properties of sweet potato starch [J]. *Food Chemistry*, 2017, 230: 516–523.
- [29] 张雅媛, 洪雁, 顾正彪, 等. 玉米淀粉与黄原胶复配体系流变和凝胶特性分析 [J]. *农业工程学报*, 2011, 27(9): 357–362.
- [30] 修琳, 张森, 许秀颖, 等. 绿豆蛋白对荞麦淀粉糊化和流变特性的影响 [J]. *食品科学*, 2020, 41(16): 57–61.
- [31] Chai Y W, Wang M Z, Zhang G Y. Interaction between amylose and tea polyphenols modulates the postprandial glycemic response to high-amylose maize starch [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(36): 8608–8615.