

硒性白内障的实验模型研究

濮祖茂 季晖¹ 龚国清¹ 周曙¹ 孙晓明¹ 李耐三¹ 徐黻本¹

(中国药科大学电镜室;¹药理学教研室,南京 210009)

摘要 0.1%亚硒酸钠 0.026 ml/kg 给 12 日龄大鼠一次性 sc 造成硒性白内障模型,用裂隙灯检分级记分,扫描电镜微观形态分析,测定晶体 MDA 含量及不溶性和高分子量蛋白病理生化测定等多项指标进行综合评价和分析,证实该模型成功率在 90%以上,为考察药物对不同类型白内障的防治作用奠定基础。

关键词 白内障; 亚硒酸钠; 扫描电镜; 裂隙灯镜检

白内障在临幊上分为先天性、老年性、代謝性、外伤性和并发性等多种,因此,白内障的动物模型就有多种^[1],但大多都有一定的局限性,且病理观察指征也各家不一。其中硒性白内障模型^[2]适于观察晶体蛋白的变化及药物对晶体蛋白的作用。本文报道了大鼠硒性白内障模型的建立及其形态学的宏观、微观检测和病理生化研究等。从三方面对该模型进行了综合评价和分析。其中包括用扫描电镜微观定量方法进行测定,这在本模型的应用资料中尚不多见。它比一般光镜检查更客观、精确。

1 材料和方法

1.1 药品及试剂

亚硒酸钠(CP,金山兴塔化工厂),临用前配成 0.1%灭菌生理盐水溶液;谷胱甘肽(BR,上海酵母厂),配成 2%灭菌生理盐水溶液,4℃冷藏不超过 2 d;阿托品硫酸盐(药用级),配成 1%滴眼液,其余试剂均为 AR 或 BR 级。

1.2 大鼠硒性白内障的建立

取 12 日龄 Wistar 大鼠 30 只,体重(25±2)g,随机均分为正常对照、病理模型和谷胱甘肽三组。病理模型和谷胱甘肽大鼠均在第

12 天 sc 0.1%亚硒酸钠溶液 0.26 ml/kg 一次造型。谷胱甘肽组同时每天 ip 谷胱甘肽 200 ml/kg·d⁻¹,连续 30 d。于造型后 5 d,即出生后 17 d,大鼠睁眼后,裂隙灯镜检、淘汰形成白内障未达到表 1 中第 V 阶段(即 4 分值)的个别动物。

Tab 1. Criterion of cataract grading by slit lamp in rats of selenite cataract model

Phase	Stage	Characteristic changes in lenses	Grading mark
Normal		Clear in lens	0
I	A	Peripheral vacuolation	0.1
	B	Vacuole in 1/3 anterior-cortex	0.4
	C	Vacuole in 2/3 anterior-cortex	0.7
II		Dusty turbid in nucleus	1
		Turbid in nucleus, semitransparent	2
III		Full turbid in nucleus, less transparent	3
V		Full turbid in nucleus, not transparent	4

1.3 裂隙灯镜检分级记分法

各组动物造型后,每周以 1%阿托品扩瞳,用手持式裂隙灯(YZ-2 型、苏州医疗器械厂)对各组动物逐一检查,参照 Shearer 方法^[3],按表 1 记分标准对每只晶体白内障程度分级记分。

1.4 扫描电镜组织结构定量分析

1.4.1 样品制备 每组随机取 6 只大鼠的一侧晶体,放入 4%戊二醛磷酸缓冲液(1/15 mol/L, pH 7.3)数日,4℃保存,1%锇酸后固定,丙酮梯度脱水,沿前后轴断裂样品,临界

收稿日期 1995-03-14

点干燥,粘台,SX-40 扫描电镜观察,加速电压 20 kV。

1.4.2 分析指标^[4] 硒性白内障主要病理变化在晶体的核部和前皮质部分。前皮质部分对药物疗效反应比较敏感,且容易取得数据进行分析,故本实验主要采取前皮质的数据。包括①计数一定范围内的前皮质晶体纤维的指突数。规定范围为长 8 μm,4 根晶体纤维计数其指突数(N),②测定 4 根晶体纤维的厚度(T),③10 μm 宽度上的纤维数即密度(D)。

1.5 晶体组织脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量测定^[5]

取各组剩余晶体 10 只,分别称重后置试管中,加入 3 ml HEPES 缓冲液(pH 7.4),电动匀浆,各取 0.5 ml,按 Bhuyan 等报道的硫代巴比妥酸显色法测定各个晶体组织脂质过氧化产物-MDA 含量,再除以各晶体湿重即得每毫克晶体中的 MDA 含量。

1.6 晶体不溶性蛋白及高分子量蛋白含量分析^[6]

将上述 MDA 含量测定中剩余的各晶体匀浆,以 10000 r/min 4 ℃ 离心 30 min,沉淀为不溶性蛋白,取上清液再以 25000 r/min 4 ℃ 离心 15 min(HITACHI SCP 85 H 型超速离心机),沉淀为高分子量蛋白,将不溶性蛋白及高分子量蛋白分别用 7 mol/L 尿素溶

解,按 Lowry 法以 Folin-酚试剂测定该两种蛋白量,然后除以各晶体湿重即得每毫克晶体中的蛋白毫克数。

2 结 果

2.1 裂隙灯镜检

硒性白内障各组造型后 5 d 晶体核即完全混浊,至 30 d 病模组核仍完全混浊,分值为 3.4,与正常对照组 0.2 相比有非常显著性差异($P < 0.001$),谷胱甘肽组给药 10 d 后白内障程度即开始减轻,其中以皮质部混浊消失较快,核性白内障消失较慢,至给药 30 d 时皮质白内障基本消失,核仍混浊,分值为 2.4,较病模组减低 29.4% (见表 2)。

Tab 2. Results of cataract grading by slit lamp in selenite cataract model

Group	No. of lenses	Grading mark, $\bar{x} \pm s$	Change, %
Normal	18	0.20 ± 0.20	
Model	16	3.40 ± 0.60 **	+1600
Glutathione	16	2.40 ± 1.10 **	-29.4

Note: Model group compared with Normal; Glutathione group compared with Model; ** $P < 0.01$

2.2 扫描电镜组织结构定量分析结果

硒性白内障病模组前皮质深、浅部位指突数较正常对照组减少 39.2% 和 30.8%, 纤维厚度 T 增加, 纤维密度 D 降低, 谷胱甘肽组较病模组指突数增加,以前皮质深部尤为明显,具有显著性差异,结果见表 3。扫描电镜照片见附图。

Tab 3. Results of SEM analysis on selenite cataract model

Group	No. of lenses	No. of anterior cortex(200~500 μm)($\bar{x} \pm s$)			No. of Anterior cortex(0~200 μm)($\bar{x} \pm s$)		
		Interdigitation ^a	Thickness ^b	Density ^c	Interdigitation ^a	Thickness ^b	Density ^c
Normal	6	89.8 ± 4.7	7.3 ± 0.7	5.4 ± 0.6	115.2 ± 7.3	7.0 ± 0.5	5.6 ± 0.3
Model	6	54.6 ± 14.6 *	8.0 ± 1.5	5.1 ± 1.1	79.7 ± 10.9 *	8.7 ± 1.7 *	4.7 ± 1.0
		(-39.2%)	(+9.5%)	(-55.6%)	(-30.8%)	(+24.3%)	(-16.1%)
Glutathione	6	72.5 ± 10.6 *	6.0 ± 1.0 *	6.5 ± 1.1 *	87.5 ± 5.3	9.2 ± 1.1	4.4 ± 0.5
		(+32.8%)	(-25.2%)	(+27.5%)	(9.7%)	(+5.7%)	(-6.3%)

^ain 4 Fibers of 8 μm; ^bμm for each 4 fibers; ^cNumber of fibers in a 10 μm region of cortex

2.3 晶体组织 MDA 含量测定结果

硒性白内障病模组 MDA 含量较正常对照组增高 70.9%, 差异非常显著。谷胱甘肽给药组较各自病模组降低 48.1%, 亦差异显著(见表 4)。

Tab 4. Contents of MDA in selenite cataract lenses

Group	No. of lenses	MDA (10^{-5} mol/mg, $\bar{x} \pm s$)	Change, %
Normal	10	1.41 ± 0.52	
Model	10	2.41 ± 0.59 **	+70.9
Glutathione	10	1.25 ± 0.33 **	-48.1



2.4 晶体不溶性蛋白及高分子量蛋白含量分析结果

硒性白内障病模组较正常对照组晶体不溶性蛋白增加 45.2%, 高分子量蛋白增加 46.2%, 谷胱甘肽组较病模组不溶性蛋白降低 29.2%, 高分子量蛋白降低 35.9%, 均有非常显著性差异(见表 5)。

Tab 5. Contents of insoluble and high molecular weight protein in selenite cataract lenses

Group	No. of lenses	Insoluble protein, $\mu\text{g}/\text{mg}$, $\bar{x} \pm s$	High Mw protein, $\mu\text{g}/\text{mg}$, $\bar{x} \pm s$
Normal	10	80.75 \pm 24.08	13.00 \pm 3.12
Model	10	117.25 \pm 18.20** (+45.2%)	19.00 \pm 3.63** (+46.2%)
Glutathione	10	83.00 \pm 4.34** (-29.2%)	12.17 \pm 2.93** (-35.9%)

3 讨 论

白内障与微量元素的关系已日益引起了人们的关注, 有报道长期缺 Se 的兔晶体和肝中谷胱甘肽过氧化物酶活性分别下降 85% 和 100%, 而缺 Se 的第二代则产生白内障。反之, 高含量的 Se 亦可诱发白内障。用 0.1% 亚硒酸钠溶液 0.26 ml/mg 给 Wistar 大鼠一次性 sc 3~5 d 即迅速形成严重的核性白内障, 这比糖性白内障模型形成的速度(约 1~2 月)要快得多, 此模型还可反映晶体核病变的急性白内障过程。本试验设置了有抗氧自由基作用的谷胱甘肽阳性药物组, 试验结果表现有明显抗白内障效果, 我们还试验了对糖性白内障有效的中药, 在硒性模型中也有明显作用(另文报道)。从而可以认为硒

性模型用于药物防治药效的观察是有价值的。

裂隙灯镜检是白内障最常用的病理指征。但必须有统一的分级记分标准(如表 1), 以便于临床核对。应用扫描电镜在动物晶体上进行组织微观定量检测, 这是近年来研究应用的新指征, 可以得到多项病理统计分析数据, 补充裂隙灯宏观检测的不足。在病理生化方面可以检测的指征较多, 由于大鼠的晶体较小, 加之检测手段还不够超微量化, 我们仅选择了几项具有代表性的指征。其中脂质过氧化产物 MDA 是白内障病理变化的重要产物, 晶体组织中不溶性蛋白和高分子量蛋白是代表核性和皮质性白内障的生化基础, 其它指征如醛糖还原酶活性或半乳糖醇含量可在离体晶体培养研究药物作用机制时进一步采用。

参 考 文 献

- 1 诸葛国民, 李耐三, 徐献本. 白内障防治药物研究进展. 中国药科大学学报, 1992, 23(6): 382
- 2 Andersson RS, Trune DR, Shearer TR. Histologic changes in selenite cortical cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1988, 29: 1418
- 3 Shearer TR, Andersson RS, Britton TL. Influence of selenite and fourteen trace elements on cataractogenesis in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983, 24: 317
- 4 何守志, 严素云, 宋琛等. 大白鼠晶体纤维扫描电镜观察. 中华眼科杂志, 1986, 22(1): 40
- 5 Bhuyan KC, Bhuyan DK, Podos SM. Lipid peroxidation in cataract of the human. *Life Sci*, 1986, 38(16): 1463
- 6 黄庆玲, 胡天圣, 毛文书. 人晶体可溶性高分子量蛋白的分离和测定. 中华眼科杂志, 1984, 20(5): 257

Study on Experimental Cataract Model Induced by Selenite

Pu Zumao, Ji Hui¹, Gong Guoqing¹, Zhou Shu¹, Sun Xiaoming¹, Li Naisan¹, Xu Fuben¹

Electron Microscope Laboratory; ¹Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The selenite cataract model was made by means of subcutaneous injection at a single dose of 0.26 ml/kg to twelve-day old rats. The model was evaluated by slit lamp cataract grading, scanning electron microscopy and by biochemical measurement of the contents of MDA, insoluble protein and high molecular weight protein in lenses. The results showed that the successful rate of the model was higher than 90%, and suggested that the model could be used as an assessment of the prevention and treatment effects of drugs on various cataracts.

Key words Cataract; Selenite; Slit lamp; Cataract grading; Scanning Electron Microscopy(SEM)

雌酚酮合成新工艺研究通过鉴定

雌酚酮是合成雌激素类与19-去甲基甾体化合物的关键中间体。从雌酚酮合成的炔雌醇及其醚类,雌二醇及其酯类或雌三醇及其衍生物分别是妇女口服避孕药或更年期激素补充疗法的主要药物。雌酚酮合成新工艺研究由中国药科大学、上海医科大学和湖南药业公司联合攻关,由中国药科大学廖清江教授主持。合成路线为:从雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)经缩酮化、芳构化与水解三步反应制得,雌酚酮总收率达45%~50%,与国内现用11步反应的合成工艺相比,生产周期缩短,操作简便。该工艺不使用薯芋皂甙元为原料,可缓和国内薯芋皂素的供需矛盾,并可实现国产甾体资源使用的合理分流。

在中试规模中,雌酚酮的总收率、主要原料的消耗等方面都达到“八五”攻关考核目标,产品质量完全符合国内同品种质量标准,且能达到美国药典23版的要求,优于国内现行工艺产品的质量。

该项目已于1995年12月通过国家医药管理局组织的科技成果鉴定。