

· 实验研究 ·

柚皮素 β -环糊精包合物对大鼠实验性脉络膜新生血管的抑制作用

徐新荣 于海涛 杭丽 邵雁 丁淑华 杨学文

【摘要】 背景 脉络膜新生血管(CNV)是导致多种眼底疾病致盲的主要原因,目前仍无有效的治疗方法。研究表明柚皮素能够抑制 CNV 的发生和发展,但由于其水溶性差而影响其生物利用度。 β -环糊精(β -CD)可提高药物的水溶解度,但其与柚皮素包合后是否能改善柚皮素抑制 CNV 的作用尚不清楚。**目的** 制备柚皮素 β -CD 包合物,比较其与柚皮素对大鼠 CNV 的抑制作用。**方法** 采用饱和溶液法制备柚皮素 β -CD 包合物,依据标准曲线法测定包合物中柚皮素的水溶解度。采用随机数字表法将 32 只 SPF 级健康雄性 Brown-Norway 大鼠分为正常对照组、模型对照组、柚皮素组和柚皮素 β -CD 组,每组 8 只。采用氮激光法在模型对照组、柚皮素组及柚皮素 β -CD 组大鼠右眼制作 CNV 模型。于视网膜光凝当天起柚皮素组和柚皮素 β -CD 组大鼠腹腔内分别注射 20 mg/kg 柚皮素和相同质量浓度柚皮素的 β -CD 包合物,每日 1 次,连续 4 周,模型对照组大鼠腹腔注射等容积的 DMSO。给药后第 4 周经大鼠食下静脉注射荧光素异硫氰酸酯葡聚糖(FITC-D),制备脉络膜铺片,测量大鼠 CNV 面积;从各组大鼠实验眼分离出视网膜色素上皮(RPE)-脉络膜-巩膜复合组织标本,分别采用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测标本组织中血管内皮生长因子(VEGF)、环氧化酶-2(COX-2)、磷脂酰肌醇(-3)激酶(PI3K)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 mRNA 及其蛋白的相对表达量。**结果** 柚皮素经 β -CD 包合后在水中的溶解度较原药提高了 11.8 倍。模型对照组、柚皮素组和柚皮素 β -CD 组 CNV 面积分别为 (34.56 ± 1.67) 、 (20.90 ± 1.47) 和 $(13.20 \pm 1.38) \times 10^3 \mu\text{m}^2$,柚皮素组、柚皮素 β -CD 组大鼠 CNV 面积明显小于模型对照组,差异均有统计学意义($t=3.973, P<0.05$; $t=5.532, P<0.01$),柚皮素 β -CD 组大鼠 CNV 面积小于柚皮素组,差异有统计学意义($t=3.605, P<0.05$)。正常对照组、柚皮素组和柚皮素 β -CD 组标本组织中 VEGF、COX-2、PI3K、p38MAPK、MMP-2、MMP-9 mRNA 及其蛋白的相对表达量明显低于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);柚皮素 β -CD 组标本组织中 VEGF 和 COX-2 mRNA 及其蛋白的相对表达量明显低于柚皮素组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 柚皮素经 β -CD 包合后水溶性显著增加,其对大鼠 CNV 的抑制作用较原药显著增强,柚皮素对 CNV 的抑制可能是通过其对炎症信号通路的抑制作用来实现的。

【关键词】 柚皮素; β -环糊精包合物; 脉络膜新生血管

Inhibition of naringenin complex with β -cyclodextrin on experimental choroidal neovascularization in rats

Xu Xinrong, Yu Haitao, Hang Li, Shao Yan, Ding Shuhua, Yang Xuewen. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Xu Xinrong, Email: xinrong_xu@aliyun.com

[Abstract] Background Choroidal neovascularization (CNV) leads to blindness in many fundus diseases. Study showed that naringenin suppresses CNV, but it presents with poor bioavailability because of its poor solubility in water. β -cyclodextrin (β -CD) can increase the water-solubility of drugs, however, whether the inhibitory effect of naringenin on CNV can be improved after clathrated with β -CD remains unclear. **Objective** This study was to compare the inhibitory effects of naringenin with naringenin/ β -CD compounds on CNV in rats. **Methods** Naringenin/ β -CD clathrate compounds were prepared with saturated solution, the solubility of naringenin in water was

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.12.007

基金项目:江苏省中医药领军人才资助项目(LJ200911);江苏省中医药局科技项目(LZ11041)

作者单位:210029 南京中医药大学附属医院眼科(徐新荣、杭丽、邵雁、丁淑华),检验科(杨学文);210023 南京中医药大学药学院(于海涛)

通信作者:徐新荣,Email: xinrong_xu@aliyun.com

calculated based on standard curve. Thirty-two male Brown Norway rats were randomized into normal control group, model control group, naringenin group and naringenin/ β -CD group. Laser-induced CNV models were created in the right eyes of rats from the model control group, naringenin group and naringenin/ β -CD group. Naringenin and naringenin/ β -CD clathrate compounds were intraperitoneally injected at a dose of 20 mg/kg in the rats of naringenin group and naringenin/ β -CD group since the day after modeling, respectively, once per day for 4 weeks, and equal volume of DMSO was injected in the same way in the model control group. Fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-D) was injected via rat hypoglossal vein for the preparation of flatmounts of choroid in the fourth week, and the areas of CNV were measured and compared among the groups. The retinal pigment epithelium (RPE)-choroid-sclera tissues were isolated from the rats, and the relative expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), cyclooxygenase-2 (COX-2), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), p38mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 mRNA and their proteins in RPE-choroid-sclera tissue were detected using real-time PCR and Western blot. **Results** The solubility of naringenin in water increased by 11.8 folds after encapsulated with β -CD. The CNV areas in the model control group, naringenin group and naringenin/ β -CD group were (34.56 ± 1.67) , (20.90 ± 1.47) and $(13.20 \pm 1.38) \times 10^3 \mu\text{m}^2$, respectively, showing significant reduces in the naringenin group and naringenin/ β -CD group compared with the model control group ($t=3.973$, $P<0.05$; $t=5.532$, $P<0.01$), and the CNV area in the naringenin/ β -CD group was significantly smaller than that in the naringenin group ($t=3.605$, $P<0.05$). The relative expression levels of VEGF, COX-2, PI3K, p38MAPK, MMP-2, MMP-9 mRNA and their proteins were significantly declined in the normal control group, naringenin group and naringenin/ β -CD group in comparison with the model control group (all at $P<0.05$). In addition, the expression levels of VEGF mRNA and COX-2 mRNA and their proteins were significantly lower in the naringenin/ β -CD group than those in the naringenin group (all at $P<0.05$). **Conclusions** The naringenin/ β -CD clathrate compounds can improve the water solubility of naringenin and enhance their inhibitory effect on rats CNV. The inhibitory effect of naringenin on rats CNV probably is associated with anti-inflammatory pathway.

[Key words] Naringenin; β -Cyclodextrin; Choroidal neovascularization

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 见于许多眼底疾病, 如年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、中心性浆液性脉络膜视网膜病变以及高度近视引起的黄斑病变等, 其中以 AMD 继发的 CNV 最常见。CNV 的药物治​​疗近年来取得了较大进展, 主要是糖皮质激素类药物和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 拮抗剂。但糖皮质激素类药物长期应用有导致眼压升高的风险, VEGF 拮抗剂存在需要反复眼内注射和费用高的问题, 且其长期应用的生物安全性尚待进一步观察。因此, 多途径寻找防治 CNV 药物有重要的临床意义。柚皮素是广泛存在于植物中的二氢黄酮类化合物。研究显示, 柚皮素具有抑制 CNV 的作用^[1], 但由于其水溶性差, 故生物利用度不高。 β -环糊精 (β -cyclodextrin, β -CD) 能改善药物的溶解度和稳定性, 增强药物生物利用度。本研究探讨柚皮素 β -CD 包合物对 CNV 形成的抑制作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 柚皮素 (纯度 >98%)、 β -CD (纯度 98%) (北京百灵威科技有限公司); Trizol 试剂

(美国 Invitrogen 公司); 苯甲基磺酰氟化物 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、Triton-X100、三羟甲基氨基甲烷、甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝 (美国 AMRESCO 公司); 逆转录试剂盒、哺乳动物细胞蛋白质抽提试剂盒 (上海申能博彩生物科技有限公司); 2 倍 iQTM SYBR Green supermix (大连宝生物工程有限公司); BCA 试剂盒、化学发光试剂盒 (美国 PIERCE 公司); 聚二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜 (瑞士 Roche 公司); 荧光素异硫氰酸酯葡聚糖 (FITC-D, 相对分子质量 2×10^6) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 小鼠抗大鼠 β -actin 抗体 (1:1 000)、兔抗大鼠环氧氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抗体 (1:1 000)、兔抗大鼠丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 抗体 (1:1 000, 美国 CST 公司); 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 羊抗大鼠 VEGF 抗体 (AF564, 美国 R&D 公司); 小鼠抗大鼠磷脂酰肌醇-3-激酶抗体 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) (1:200, sc1637)、HRP 键合羊抗鼠二抗 (1:5 000, sc-2005)、HRP 键合羊抗兔二抗 (1:5 000, sc-2030) (美国 Santa Cruz 公司); 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 兔抗大鼠基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2) 抗体 (AV33090)、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 兔抗大鼠 MMP-9 抗体 (AV20016) (美国 Sigma 公司)。氩黄激光仪 (美国科以人公司); BX51

型荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);SMA4000 紫外/可见光分光光度计(美国 Merinton 公司)。

1.1.2 实验动物 SPF 级健康雄性 Brown-Norway 大鼠(北京维通利华公司)32 只,体质量 150 ~ 180 g。实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明。

1.2 方法

1.2.1 柚皮素 β -CD 包合物的制备及水溶解度测定

柚皮素与 β -CD 按摩尔比 1:1 的比例准确称取,先把柚皮素用少量乙醇溶解,缓慢加入等摩尔质量 β -CD 饱和水溶液均匀搅拌,于 60 °C 下搅拌 30 min,停止加热并继续搅拌 5 h,自然降温后 4 °C 冷藏过夜,0.45 μ m 微孔滤膜过滤。滤液经冷冻干燥机干燥 24 h 后得到柚皮素 β -CD 包合物。标准曲线法测定包合物中柚皮素在水中的溶解度。

1.2.2 大鼠 CNV 模型制作及给药 采用随机数字表法将大鼠分为正常对照组、模型对照组、柚皮素组和柚皮素 β -CD 组,每组 8 只。取模型对照组、柚皮素组及柚皮素 β -CD 组大鼠,按 50 mg/kg 的剂量氯胺酮肌肉注射麻醉,以右眼为实验眼,用质量分数 0.5% 托吡卡胺与盐酸去氧肾上腺素注射液混合滴眼液点眼扩瞳,采用波长 568 nm 的氦黄激光,在 120 D 专用前置镜下,距视盘 2 ~ 4 个视盘直径的视网膜大血管间围绕视盘光凝 8 个点,光斑直径为 100 μ m,曝光时间 0.1 s,功率 150 ~ 200 mW,Bruch 膜被击破后产生小气泡视为有效光凝点,剔除光凝后有视网膜、脉络膜或玻璃体出血的大鼠并及时补充相应数量大鼠。柚皮素组和柚皮素 β -CD 组大鼠于视网膜光凝后分别于腹腔注射质量分数 2% 柚皮素和 2% 柚皮素 β -CD 包合物(均以 DMSO 为溶媒),剂量均为 20 mg/kg,模型对照组大鼠以相同方式注射等容量 DMSO;每日给药 1 次,连续给药 4 周。

1.2.3 脉络膜铺片法测量 CNV 面积 动物给药后 4 周各组任意取 3 只大鼠,经食下静脉注射质量分数 10% FITC-D 0.2 ml,注射 1 h 后过量麻醉法处死大鼠并摘取眼球,于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 1 h。手术显微镜下沿眼球赤道部剪开眼球,去除眼前节组织,撕除视网膜神经上皮层,获取视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)-脉络膜-巩膜复合体标本,以视神经为中心,放射状剪开,将 RPE 面向下置于载玻片上,封片、烤片。置于 40 倍荧光显微镜下观察并对每个光凝点拍照,用 Image J 图像分析软件(美国国立卫生研究院)进行分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠视网膜和脉络膜中目的基因的表达 各组任意取 2 只大鼠,过量

麻醉法处死,分离实验眼 RPE-脉络膜-巩膜复合体后采用 Trizol 法提取总 RNA,采用紫外/可见光分光光度计测定 RNA 纯度和含量,用质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳法检测 mRNA 完整性;用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录以获得 cDNA,以 cDNA 为模板,加入相应引物(表 1)配制反应体系(2 倍 SYBR Premix Ex Taq 10 μ l, Forward Primer (10 μ mol/L) 1 μ l, Reverse Primer (10 μ mol/L) 1 μ l, cDNA 8,总 20 μ l)。反应条件为:50 °C 2 min 激活 UNG 酶去除残余的产物污染;95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火及延伸 1 min,重复 40 个循环。每个循环结束后采集荧光信号,绘制熔解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各目的基因的相对表达量。每个样本重复测量 3 次,取平均值。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列	产物长度 (bp)
β -actin	F:5'-CCCATCTATGAGGTTACGC-3'	436
	R:5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	
COX-2	F:5'-TACGAAGACCCTGCCTACGA-3'	295
	R:5'-GTTGCTGGCAAGTGAAGCTG-3'	
VEGF	F:5'-CTTGACAGATGTGACAAGCCAAG-3'	332
	R:5'-GGTGTGCTGCTGACATGGTTA-3'	
PI3K	F:5'-CAGCACCTCGTATGGCTCAAT-3'	223
	R:5'-GTCCTCACTCTTGATCCCCAG-3'	
MMP-2	F:5'-CCGTTATGAGACCCTGAGCC-3'	369
	R:5'-CAGACCAATCGTGCTCCAT-3'	
MMP-9	F:5'-CGGATCCCCAACCTTTACC-3'	205
	R:5'-AGCCAGCTGAGTTCAATCCC-3'	
P38MAPK	F:5'-GTTGTCTCCTCCTCCTCGTTC-3'	636
	R:5'-GTTACCGCTCGACTTGTGCT-3'	

注:COX:环氧化酶;VEGF:血管内皮生长因子;PI3K:磷脂酰肌醇(-3)激酶;MMP:基质金属蛋白酶;MAPK:促分裂原活化蛋白激酶

1.2.5 Western blot 检测各组大鼠脉络膜视网膜组织中目的蛋白的表达 各组任意取 3 只大鼠,于给药后 4 周过量麻醉法处死,分离实验眼 RPE-脉络膜-巩膜复合体,每 100 mg 组织中加入 1 ml PBS,匀浆器研磨均匀并提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白质量浓度。取 50 μ g 总蛋白行 SDS-PAGE 电泳分离,将蛋白转印至 PVDF 膜;质量分数 10% 脱脂奶室温封闭 2 h,滴加一抗 4 °C 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,每次 5 min;加入相应的二抗,37 °C 下孵育 1 h,用 TBST 漂洗 3 次,每次 5 min;化学发光法显影、定影,将胶片进行扫描。以 β -actin 蛋白质作内参照,用 Quantity One 凝胶图像处理系统进行结果分析。每个样本重复测量 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件(SPSS Inc., Chicago, IL,

USA) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Bartlett 检验证实方差齐。采用完全随机分组单因素干预四水平实验设计, 正常对照组、模型对照组、柚皮素组和柚皮素 β -CD 组大鼠 CNV 面积、RPE-脉络膜-巩膜复合体中各目的基因及其蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 柚皮素在水中溶解度测定

柚皮素单体在水中的溶解度为 $71.85 \mu\text{g/ml}$, β -CD 包合后柚皮素的溶解度为 $846.28 \mu\text{g/ml}$, 溶解度提高约 11.8 倍。

2.2 各组大鼠 CNV 面积的比较

正常对照组大鼠脉络膜铺片中见脉络膜血管分布均匀, 走行清晰; 模型对照组、柚皮素组和柚皮素 β -CD 组大鼠脉络膜铺片中均可见明显的 CNV 形成 (图 1), 其面积分别为 (34.56 ± 1.67) 、 (20.90 ± 1.47) 和 $(13.20 \pm 1.38) \times 10^3 \mu\text{m}^2$, 3 个组间 CNV 面积总体比较差异有统计学意义 ($F = 4.115, P < 0.05$), 柚皮素组、柚皮素 β -CD 组大鼠 CNV 面积明显小于模型对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 3.973, P < 0.05$; $t = 5.532, P < 0.01$), 柚皮素 β -CD 组大鼠 CNV 面积小于柚皮素组, 差异有统计学意义 ($t = 3.605, P < 0.05$) (图 2)。

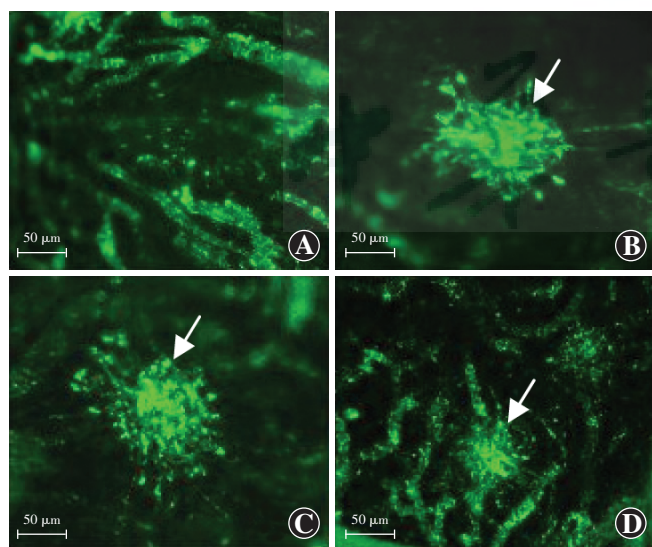


图 1 各组大鼠脉络膜铺片 (FITC-D 标尺 = $50 \mu\text{m}$) A: 正常对照组大鼠脉络膜血管清晰, 无 CNV 形成 B: 模型对照组大鼠可见明显的 CNV 形成 (箭头) C: 柚皮素组大鼠 CNV 区面积小于模型对照组 (箭头) D: 柚皮素 β -CD 组大鼠 CNV 区面积最小 (箭头)

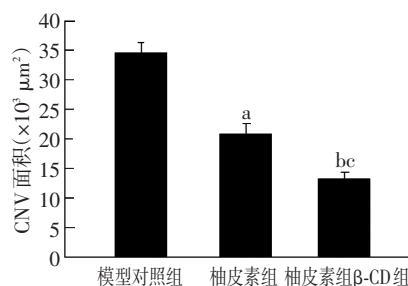


图 2 各组大鼠脉络膜铺片 CNV 面积的量化比较 $F = 4.115, P < 0.05$. 与模型对照组比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$; 与柚皮素组比较, $^c P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) CNV: 脉络膜新生血管; β -CD: β -环糊精

2.3 各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中各目的基因的相对表达量

4 个组间 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 VEGF、COX-2、PI3K、p38MAPK、MMP-2、MMP-9 mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F = 4.637, 5.231, 4.954, 3.846, 3.675, 3.702$, 均 $P < 0.05$); 与正常对照组比较, 模型组各目的基因 mRNA 的相对表达量均明显升高, 差异有统计学意义 (VEGF: $P = 0.009$; COX-2: $P = 0.008$; PI3K: $P = 0.009$; p38MAPK: $P = 0.009$; MMP-2: $P = 0.039$; MMP-9: $P = 0.011$); 与模型对照组比较, 柚皮素组各目的基因 mRNA 的相对表达量均明显下降, 差异有统计学意义 (VEGF: $P = 0.048$; COX-2: $P = 0.046$; PI3K: $P = 0.010$; p38MAPK: $P = 0.047$; MMP-2: $P = 0.049$; MMP-9: $P = 0.048$); 与柚皮素组比较, 柚皮素 β -CD 组 VEGF mRNA 及 COX-2 mRNA 相对表达量显著降低, 差异均有统计学意义 ($P = 0.048, 0.049$) (表 2)。

表 2 各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中各目的基因的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	VEGF mRNA	COX-2 mRNA	PI3K mRNA	p38MAPK mRNA	MMP-2 mRNA	MMP-9 mRNA
正常对照组	4	0.43 ± 0.04^a	0.28 ± 0.04^a	0.29 ± 0.02^a	0.44 ± 0.03^a	0.53 ± 0.06^b	0.44 ± 0.03^b
模型对照组	4	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
柚皮素组	4	0.71 ± 0.06^b	0.62 ± 0.04^b	0.58 ± 0.07^a	0.67 ± 0.06^b	0.72 ± 0.08^b	0.70 ± 0.06^b
柚皮素 β -CD 组	4	0.55 ± 0.04^c	0.41 ± 0.04^c	0.49 ± 0.03	0.64 ± 0.05	0.72 ± 0.06	0.70 ± 0.06
<i>F</i>		4.637	5.231	4.954	3.846	3.675	3.702
<i>P</i>		0.038	0.033	0.035	0.045	0.048	0.047

注: 与各自的模型对照组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$; 与各自的柚皮素组比较, $^c P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) RPE: 视网膜色素上皮; VEGF: 血管内皮生长因子; COX: 环氧化酶; PI3K: 磷脂酰肌醇 (3-) 激酶抗体; MAPK: 促分裂原活化蛋白激酶; MMP: 基质金属蛋白酶; β -CD: β -环糊精

2.4 各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中目的蛋白相对表达量的比较

正常对照组、模型对照组、柚皮素组和柚皮素 β -CD 组间 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 VEGF 蛋白相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F = 5.173$ 、

5.245、4.751、4.396、3.542、4.196, 均 $P < 0.05$), 其中正常对照组 VEGF、COX-2、PI3K、p38MAPK、MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量明显低于模型对照组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.008, 0.009, 0.007, 0.037, 0.046, 0.031$); 与模型对照组比较, 柚皮素及柚皮素 β -CD 组 VEGF、COX-2、PI3K、p38MAPK、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达量均明显下降, 差异均有统计学意义 (VEGF: $P = 0.034, 0.007$; COX-2: $P = 0.048, 0.009$; PI3K: $P = 0.041, 0.040$; p38MAPK: $P = 0.040, 0.042$; MMP-2: $P = 0.049, 0.048$; MMP-9: $P = 0.041, 0.040$); 与柚皮素组比较, 柚皮素 β -CD 组 VEGF 和 COX-2 蛋白相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ($P = 0.048, 0.049$) (图 3, 表 3)。

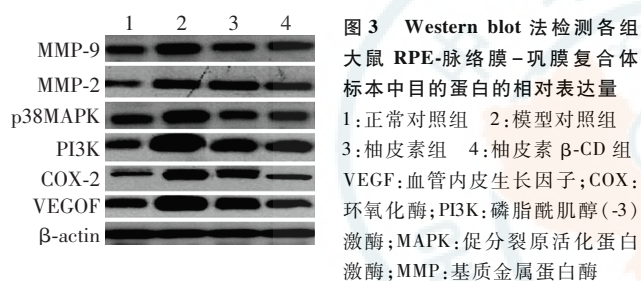


表 3 各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中目的蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	VEGF	COX-2	PI3K	p38MAPK	MMP-2	MMP-9
正常对照组	6	0.64±0.06 ^a	0.30±0.02 ^a	0.43±0.02 ^a	0.79±0.06 ^b	0.36±0.02 ^b	0.63±0.05 ^b
模型对照组	6	1.71±0.12	1.29±0.08	1.57±0.09	1.43±0.08	0.89±0.06	1.32±0.08
柚皮素组	6	1.15±0.08 ^b	0.89±0.07 ^b	0.97±0.06 ^b	0.83±0.06 ^b	0.57±0.04 ^b	0.76±0.07 ^b
柚皮素 β -CD 组	6	0.69±0.06 ^{ac}	0.54±0.05 ^{ac}	0.94±0.05 ^b	0.86±0.06 ^b	0.47±0.03 ^b	0.71±0.06 ^b
F		5.173	5.245	4.751	4.396	3.542	4.196
P		0.034	0.033	0.036	0.040	0.047	0.042

注: 与各自的模型对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与各自的柚皮素组比较, ^c $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验); RPE: 视网膜色素上皮; VEGF: 血管内皮生长因子; COX: 环氧化酶; PI3K: 磷脂酰肌醇 (-3) 激酶; MAPK: 促分裂原活化蛋白激酶; MMP: 基质金属蛋白酶; β -CD: β -环糊精

3 讨论

柚皮素是黄酮类物质, 广泛存在于柠檬、葡萄、橘子、枳壳、胡柚皮等, 具有抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗癌等生物活性。我们的前期研究显示, 柚皮素能改善脉络膜血流, 抑制 COX-2 和诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthetase, iNOS) 的表达, 从而下调 VEGF 的表达, 抑制 CNV 的形成^[2], 但柚皮素的水溶性差, 生物利用度低。环糊精分子具有富电性的疏水空腔和亲水性的外壁^[3-5], 常用作药物分子的载体, 克服药物分子的水溶性差和稳定性差等缺陷。齐

学洁等^[6]研究发现, 白藜芦醇/羟丙基- β -CD 包合物能显著提高白藜芦醇的溶解度、稳定性和溶出速率。陈水娟等^[7]研究发现, 新型抗乙肝病毒小分子化合物异吡啶-1,3-二酮与二甲基- β -CD 形成包合物后, 其口服生物利用度显著改善。张艳斌等^[8]研究发现盐酸小檗碱经羟丙基- β -CD 包合后在小肠中的吸收速率常数及有效渗透系数分别提高为原来的 5.31 和 5.05 倍。Shulman 等^[9]研究结果显示, 羟丙基- β -CD 包合的柚皮素溶解度提高 400 倍, 跨 Caco-2 细胞转运能力提高 11 倍, 在大鼠体内的生物利用度明显提高。本研究显示柚皮素与 β -CD 制备成包合物后在水中的溶解度提高 11.8 倍, 但是考虑到虽然柚皮素 β -CD 包合物水溶性良好, 但作为对照药的柚皮素水溶性差, 为了考察 β -CD 包合对柚皮素生物活性的影响。本研究采用安全剂量范围二甲基亚砜作为统一溶媒对激光诱发 CNV 大鼠模型进行在体研究, 以排除溶解度对实验的影响, 发现柚皮素 β -CD 包合物抑制 CNV 形成的作用强于柚皮素, 提示柚皮素经 β -CD 包合后生物活性得到显著提高。

研究表明, 炎症在 CNV 形成中起了重要作用^[10]。COX-2 是与炎症相关的重要调节酶, 且与眼部新生血管的形成有关^[11], COX-2 基因敲除小鼠能显著抑制激光诱发的 CNV, VEGF 表达也明显下调^[12], 其作用机制与前列腺素途径、血栓素 A2 途径、MMPs 途径的活性降低^[13-14]以及 VEGF-MMPs 系统促进内皮细胞新生、迁移、新生血管形成作用受到抑制等有关。Zarranz-Ventura 等^[15]研究发现, 转化生长因子- β 多肽抑制物可通过下调 VEGF、COX-2、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、MMP-2 和 MMP-9 的表达来抑制激光诱发的 CNV。本研究结果显示, CNV 模型动物 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 VEGF、MMP-2、MMP-9 mRNA 及其蛋白相对表达显著上调, 表明 VEGF-MMPs 系统在 CNV 形成中起重要作用, 同时, CNV 模型动物中 COX-2 的表达也显著上调, 提示 COX-2 可能通过上调 VEGF、MMPs 的表达来参与激光诱发 CNV 的形成。本研究结果还显示柚皮素及柚皮素 β -CD 包合物均能下调 CNV 中 COX-2、VEGF、MMP-2 和 MMP-9 的表达, CNV 面积缩小, 由于柚皮素具有抗炎作用, 推测其可能通过下调炎症因子 COX-2 的表达, 抑制 VEGF 和 MMPs 的表达, 继而抑制 CNV。本研究中还发现, 柚皮素 β -CD 包合物对 COX-2、VEGF 表达的抑制作用强于柚皮素, 推测 β -CD 可通过改善柚皮素的生物利用度而增强柚皮素对 COX-2 和 VEGF 表达的抑制作用。此外, PI3K、MAPK 信号转导系统可被炎症、损伤

激活,介导细胞增生、分化、运动和凋亡等,并与 COX-2 有关,其中 PI3K/Akt 通路是 PI3K 主要介导的下游信号传递途径,COX-2 能够活化丝氨酸-苏氨酸激酶,从而激活 Akt 信号转导通路。MAPK 也是生物体内重要的信号转导系统之一,其中 p38MAPK 途径主要被促炎因子、应激、脂多糖、蛋白合成抑制剂、细菌病原体及其产物等激活,p38 通路激活后能上调 IL-1 β 诱导的 COX 表达。本研究结果显示,大鼠 CNV 模型中 PI3K、p38MAPK 表达明显上调,表明 PI3K、p38MAPK 信号系统也参与 CNV 的形成,而柚皮素及其 β -CD 包合物均能下调 PI3K、p38MAPK 的表达,机制可能与 COX-2 表达受到抑制有关,但柚皮素是直接作用,还是通过其他途径调节 PI3K、p38MAPK 信号通道,有待进一步研究。

综上所述,柚皮素经 β -CD 包合后水溶性增加,对激光诱导的大鼠 CNV 的抑制作用增强,其机制与抗炎作用有关,尤其与 COX-2 表达受到抑制有关,从而使多个参与 CNV 形成的炎性通路活性下降。

参考文献

- [1] Ji J, Xu XR, Chiou GC. Effects of naringenin on ocular blood flow and choroidal neovascularization in experimental animals[J]. *Int J Ophthalmol*, 2009, 2(4): 320-323.
- [2] 吉洁,徐新荣. 柚皮素对激光诱导的大鼠脉络膜新生血管的抑制作用[J]. *中华眼底病杂志*, 2010, 26(1): 79-81. doi:10.3760/cma.j.issn.1015-1005.2010.01.23.
- [3] Wenz G. Cyclodextrins as building blocks for supramolecular structures and functional units[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1994, 33(8): 803-822. doi:10.1002/anie.199408031.
- [4] Harata K. Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state[J]. *Chem Rev*, 1998, 98(5): 1803-1828. doi:10.1021/cr9700134.
- [5] Connors KA. The stability of cyclodextrin complexes in solution[J]. *Chem Rev*, 1997, 97(5): 1325-1358. doi:10.1021/cr960371r.
- [6] 齐学洁,邱超,姜恒丽,等. 白藜芦醇/羟丙基- β -环糊精包合物的表征及体外溶出研究[J]. *天津中医药*, 2013, 30(8): 499-502. doi:10.11656/j.issn.1672-1519.2013.08.19.
- [7] 陈水娟,付栋君,高姗姗,等. 难溶性药物 BMCP25 二甲基- β -环糊精包合物的表征及在大鼠体内的药理学[J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(2): 171-174. doi:1001-8255(2013)02-0171-04.
- [8] 张艳斌,崔元璐. 环糊精包合作用对在体大鼠肠道 P-糖蛋白药泵的影响[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(10): 1318-1323. doi:1001-1978(2008)10-1318-06.
- [9] Shulman M, Cohen M, Soto-Gutierrez A, et al. Enhancement of naringenin bioavailability by complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18033 [2015-05-15]. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0018033>. doi:10.1371/journal.pone.0018033.
- [10] Bok D. Evidence for an inflammatory process in age-related macular degeneration gains new support[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(20): 7053-7054. doi:10.1073/pnas.0502819102.
- [11] Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79(2): 275-285. doi:10.1016/j.exer.2004.04.008.
- [12] Rezaei KA, Toma HS, Cai J, et al. Reduced choroidal neovascular membrane formation in cyclooxygenase-2 null mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(2): 701-707. doi:10.1167/iovs.10-6319.
- [13] Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, et al. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis[J]. *FASEB J*, 2004, 18(2): 300-310. doi:10.1096/fj.03-0473com.
- [14] Larkins TL, Nowell M, Singh S, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression[J/OL]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 181 [2015-05-04]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/181>. doi:10.1186/1471-2407-6-181.
- [15] Zarranz-Ventura J, Fernández-Robredo P, Recalde S, et al. Transforming growth factor-beta inhibition reduces progression of early choroidal neovascularization lesions in rats; P17 and P144 peptides[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e65434 [2015-05-11]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065434>. doi:10.1371/journal.pone.0065434.

(收稿日期:2015-06-11)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

读者·作者·编者

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再版的稿件,如 2 个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过 Email 发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知

(本刊编辑部)