

# 阿司匹林对半乳糖性白内障抑制作用的实验研究

喻继兵 周 辉

## The prevention effect of aspirin on galactose cataract

Yu Jibing, Zhou Hui. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Medical College of Ningbo University, Ningbo 315020, China

**Abstract Objective** Experimental research demonstrated that oxidative damage leads to formation of cataract in rats and its mechanism is the decline of activities of superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-PX) and catalase(CAT). Aspirin can improve the antioxidative ability of lens. The purpose of this study was to observe the inhibition of aspirin on D-Galactose-induced cataractous lenses of rats. **Methods** Galactose cataract model was established in 40 cleaning Wistar rats by intraperitoneal injection of 20 mL/kg 80% D-Galactose for 10 days. The models were divided into model group(20 rats) and aspirin group(20 rats). 150 mg/kg of aspirin was administered immediately by gastrogavaging in aspirin group for 20 days. Other 20 normal Wistar rats were as control group. At day 3, 6, 10, 14, 20, the transparency of rat lenses was observed under the slit lamp microscopy. At day 5 after experiment, the ultrastructure of the lenses was examined and evaluated under the scanning electron microscopy. The activities of SOD, GSH-PX and CAT were detected by Coomassie Brilliant Blue color comparator, respectively. The use of experimental animal followed the Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** All lenses were transparent in the rats of control group. The degree of lens opacity was more mild in aspirin group compared with model group. 25.00%, 41.67%, 58.33%, 83.33% of lenses in aspirin group showed swelling at day 6, 10, 14, 20, respectively, but 65% lenses were opacity in model group on day 3 and 100% lenses were nuclear cataracts in 6 days. The structure of lenses was normal in control group, but the process number, fiber thickness and fiber density of lens were significantly increased in model group compared with control group( $P < 0.05$ ), and only process number was increased in aspirin group. The activities of SOD, GSH-PX and CAT in lens of model group were obviously lower than in normal control group( $P < 0.05$ ), but those in aspirin group were significantly increased in comparison with model group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Aspirin could protect lenses of rats against oxidative damage by elevating activities of SOD, GSH-PX and CAT in lens and inhibiting the generation and development of galactose-induced cataract at early stage of cataract.

**Key words** aspirin; cataract; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; catalase; ultrastructure; oxygen damage

**摘要 目的** 观察阿司匹林对大鼠半乳糖性白内障的抑制作用。**方法** 将 60 只 Wistar 大鼠分为 3 组:半乳糖组每日腹腔注射 80% 的 D-半乳糖(20 mL/kg),连续 10 d,制成白内障动物模型;阿司匹林组同半乳糖组处理的同时每日给予阿司匹林混悬液 150 mg/kg 灌胃至实验结束;对照组无特殊处理。实验前及造模起第 3、6、10、14、20 天行裂隙灯显微镜观察晶状体情况并拍照;造模起第 5 天各组随机处死 8 只大鼠,右眼晶状体匀浆检测超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)的活性,左侧晶状体行扫描电镜观察并定量分析。**结果** 对照组晶状体始终透明,实验第 3、6、10、14、20 天阿司匹林组白内障的发生率分别为 0、25%、41.67%、58.33%、83.33%,大多数为囊泡初期,而半乳糖组第 3 天白内障发生率达 65%,第 6 天后晶状体均发生混浊,最终发展为成熟期白内障;实验第 5 天扫描电镜下见对照组组织结构正常,半乳糖组损伤严重,阿司匹林组损伤较轻微;与对照组比较,半乳糖组 SOD、GSH-PX、CAT 活性明显降低( $P < 0.05$ ),阿司匹林组各酶活性强于半乳糖组( $P < 0.05$ )。**结论** 阿司匹林能增强晶状体中 SOD、GSH-PX、CAT 的活性,对大鼠半乳糖性白内障有抗氧化作用,从而延缓早期白内障的发生发展。

**关键词** 阿司匹林; 白内障; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 过氧化氢酶; 超微结构; 氧化损伤

**分类号** R 776.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-1015-04

白内障发病机制的研究表明:晶状体中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等酶活性的异常下降可致晶状体抗氧化能力降低,导致白内障形成<sup>[1-2]</sup>。通过药物来提高机体及晶状体的抗氧化能力应是防治白内障的一条可行的途径<sup>[3]</sup>。有研究认为阿司匹林可明显降低晶状体蛋白对微量元素诱发的氧化作用的敏感性<sup>[4-5]</sup>。但其对晶状体代谢过程中许多含有金属元素的关键抗氧化酶,如GSH-PX、SOD、CAT等的活性是否存在影响有待证实。本实验利用腹腔注射半乳糖法快速产生半乳糖性白内障动物模型,以阿司匹林进行干预,初步观察阿司匹林对早期半乳糖性白内障的影响作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 健康 Wistar 大鼠 60 只(清洁级),雌雄各半,鼠龄约 4 周,体重 50 ~ 60 g;无眼部疾患,按随机区组设计分为 3 组:正常对照组 20 只,无特殊处理;半乳糖组 20 只,每日上午腹腔注射 D-半乳糖溶液 20 mL/kg,连续 10 d;阿司匹林组 20 只,处理方法同半乳糖组,同时阿司匹林混悬液 150 mg/kg 灌胃至实验结束。实验动物的使用遵循国家《实验动物管理条例》。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 阿司匹林(美国 Sigma 公司);D-半乳糖、SOD 检测试剂盒、GSH-PX 检测试剂盒、CAT 检测试剂盒、考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);扫描电镜(南昌大学电镜室);721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

### 1.2 方法

**1.2.1 白内障动物模型的建立** 参照文献[6]的方法,并稍作改动,饮食中未加半乳糖而单纯腹腔注射给药以便控制剂量严格对照研究,每日人工腹腔注射 80% 的 D-半乳糖溶液 20 mL/kg,连续 10 d。

**1.2.2 检测指标** 造模起第 3、6、10、14、20 天,各组大鼠以阿托品散瞳行裂隙灯显微镜检查,并拍照。参照文献[7]的方法对晶状体混浊程度进行分期并计分:0 期,计 0 分;I 期为囊泡初期,计 1 分;II 期为囊泡期,计 2 分;III 期为皮质期,计 3 分;IV 期为核混浊期,计 4 分;V 期为成熟白内障期,计 5 分。造模起第 5 天各组随机取 8 只大鼠处死,一侧晶状体制成匀浆液检测抗氧化酶(SOD、GSH-PX、CAT)的活性;另一侧晶状体制成电镜标本行显微组织结构并定量分析。

**1.2.3 晶状体中抗氧化酶活性的测定** 各组大鼠颈

椎脱臼法处死,冰浴下摘除眼球,生理盐水漂洗后,从后路剖开眼球,去除眼球壁及玻璃体,剥离悬韧带,将晶状体置于匀浆器内,研磨并离心后,取上清液测定各指标。晶状体中蛋白含量用考马斯亮蓝比色法测定。以每毫克晶状体蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位;以每毫克晶状体蛋白每秒钟分解 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的量为 1 个 CAT 活力单位;规定每毫克蛋白每分钟扣除非酶反应的作用,使反应体系中浓度降低 1  $\mu\text{mol/L}$  为 1 个 GSH-PX 活力单位。

**1.2.4 电镜标本的制作及分析** 各组大鼠的另一侧晶状体,置于戊二醛溶液中固定,以磷酸缓冲液浸洗后锇酸液固定,乙醇-丙酮系列梯度脱水,醋酸异戊酯中间液中置换脱水剂。沿前后轴断裂样品,以  $\text{CO}_2$  为媒介液,干燥,镀膜。扫描电镜观察,记数一定范围内的前皮质深部(200 ~ 500  $\mu\text{m}$ )晶状体纤维的指突数,限定范围为长 8  $\mu\text{m}$ ,4 根晶状体纤维;测定 4 根晶状体纤维的厚度;记数 10  $\mu\text{m}$  宽度上的纤维数即密度。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 7.0 统计学软件对数据进行统计学处理。制作模型后白内障的发生情况以频数和百分数表示,各组间白内障发生情况的比较采用 Fisher 精确检验法。晶状体混浊程度评分、SOD、GSH-PX、CAT 的活性测定以及电镜下晶状体结构变化的指标以  $\bar{x} \pm s$  表示,3 个组中上述指标的总体比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 SNK- $q$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 晶状体混浊程度的观察

腹腔注射半乳糖后, Wistar 大鼠出现多饮、多尿、多食、体重停止增长、毛发干燥无光泽、晶状体混浊等半乳糖血症的临床表现。正常对照组大鼠在整个实验过程中晶状体始终保持完全透明;半乳糖组大鼠从实验第 3 天起大部分产生了白内障,第 6 天后均出现白内障;而阿司匹林组实验第 3 天无白内障出现,第 10 天白内障发生率约为 50%,第 20 天仍有部分晶状体完全透明;半乳糖组与阿司匹林组比较,第 3、6、10、14 天差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(表 1)。

实验第 3 天,阿司匹林组与半乳糖组比较,晶状体混浊程度的平均分数差异有统计学意义( $F = 35.29$ ,  $P = 0.00$ ),实验第 6、10、14、20 天,半乳糖组与阿司匹林组比较,差异均有统计学意义( $F = 25.07、77.74、96.85、111.39$ ,  $P = 0.00$ )(表 2)。

表 1 各时间点不同组间鼠晶状体混浊的频数和百分数(n/%)

Table 1 The number and rate of lens opacity in different experiment time(n/%)

Group	N	Cataract status in different experiment time				
		3 d	6 d	10 d	14 d	20 d
Control	20	0/0.00	0/0.00	0/0.00	0/0.00	0/0.00
Model	20	13/65.00	12/100.00	12/100.00	12/100.00	12/100.00
Aspirin	20	0/0.00	3/25.00 <sup>e</sup>	5/41.67 <sup>e</sup>	7/58.33	10/83.33

<sup>e</sup>P < 0.01 vs respective model group (Fisher Exact test)

表 2 3 个组间在不同时间点鼠晶状体混浊的平均评分(x̄ ± s)

Table 2 Mean score of lens opacity in different experiment time

Group	N	Lens score in different experiment time				
		3 d	6 d	10 d	14 d	20 d
Control	12	0	0	0	0	0
Model	12	0.65 ± 0.49	1.42 ± 0.67	2.92 ± 0.67	4.00 ± 0.60	4.58 ± 0.51
Aspirin	12	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.25 ± 0.45 <sup>e</sup>	0.50 ± 0.67 <sup>e</sup>	0.83 ± 0.94 <sup>e</sup>	1.25 ± 0.97 <sup>e</sup>
F		35.29	25.07	77.74	96.85	111.39
P		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

<sup>e</sup>P < 0.01 vs respective model group (One-way ANOVA, SNK-q test)

## 2.2 晶状体抗氧化酶活性

半乳糖组 CAT、GSH-PX、SOD 活性均明显低于对照组 (P < 0.05), 阿司匹林组和半乳糖组比较, 3 种酶的活性均显著增强 (P < 0.05) (表 3)。

表 3 实验第 5 天各组鼠 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性(x̄ ± s, U/mg prot)

Table 3 The activities of SOD, GSH-PX and CAT at day 5(x̄ ± s, U/mg prot)

Group	CAT	GSH-PX	SOD
Control	18.43 ± 5.16	265.57 ± 63.41	83.72 ± 11.53
Model	4.58 ± 0.39 <sup>e</sup>	67.46 ± 13.32 <sup>e</sup>	17.06 ± 2.14 <sup>e</sup>
Aspirin	10.37 ± 1.65 <sup>f</sup>	152.30 ± 24.67 <sup>f</sup>	40.28 ± 7.87 <sup>f</sup>
F	7.96	11.94	5.98
P	0.00	0.00	0.02

<sup>e</sup>P < 0.05 vs respective control group, <sup>f</sup>P < 0.05 vs respective model group (One-way ANOVA, SNK-q test)

## 2.3 晶状体微观组织结构

电镜下观察见对照组晶状体透明, 皮质层纤维排列整齐, 指突清晰, 核部纤维轮廓清晰, 表面多皱褶; 半乳糖组晶状体混浊、皮质层纤维严重肿胀、指突消失或减少, 核部纤维界限不清并出现空洞等现象; 阿司匹林组晶状体小部分混浊, 其范围较半乳糖组显著减少, 皮质层排列整齐, 指突清晰, 核部纤维轮廓分明亦无空洞等现象, 表面皱褶形成脊状突起。半乳糖组和对照组比较, 前皮质指突数减少, 纤维厚度增加, 纤维密度减

低。而阿司匹林组较半乳糖组指突数增加, 差异有统计学意义(表 4)。

表 4 扫描电镜观察 3 组晶状体组织结构变化结果(x̄ ± s)

Table 4 The ultrastructure change of the lense in the rats in different groups(x̄ ± s)

Group	Lens number	Process number	Fiber thickness(mm)	Fiber density
Control	8	117.32 ± 6.51	10.70 ± 3.53	9.57 ± 0.74
Model	8	53.43 ± 15.68 <sup>e</sup>	15.14 ± 1.19 <sup>e</sup>	5.49 ± 1.03 <sup>e</sup>
Aspirin	8	84.27 ± 13.17 <sup>f</sup>	11.84 ± 1.87	6.88 ± 0.56
F		6.80	5.52	4.52
P		0.001 1	0.005 2	0.029 1

<sup>e</sup>P < 0.05 vs respective control group, <sup>f</sup>P < 0.05 vs respective model group (One-way ANOVA, SNK-q test)

## 3 讨论

### 3.1 大鼠半乳糖性白内障模型的建立

Kinoshita<sup>[8]</sup> 研究发现, 用 50% 半乳糖喂养的大鼠晶状体内可以发生各种形态学和生物学变化, 第 19 天时晶状体出现了不可逆性混浊。董东生等<sup>[9]</sup> 利用晶状体体外培养技术制作体外半乳糖性白内障模型, 探讨了白内障早期, 即晶状体未混浊时, 可有生化改变, 与整体实验结果基本一致。本实验利用腹腔注射法建立半乳糖性白内障, 实验第 3 天即可见白内障的早期形态学改变: 晶状体赤道部周边可见散在细小囊泡; 第 6 天模型组大鼠全部出现了白内障; 第 10 天出现了典型的晶状体皮质混浊; 造模后 2 周多数晶状体核混浊, 第 20 天产生成熟期白内障。扫描电镜下半乳糖组晶状体蛋白纤维严重肿胀, 界限不清, 指突数明显稀少, 而正常 Wistar 大鼠晶状体纤维排列整齐, 轮廓分明, 指突清晰, 与 Unakar 等<sup>[10]</sup> 报道一致。

本研究发现腹腔注射半乳糖制作白内障活体动物模型, 比一般饮食半乳糖诱发白内障的时间要快, 病变进展更迅速, 且半乳糖的量容易控制, 便于对照研究。通过整体形态学观察, 微观组织结构定量分析和检测生化酶活性综合评价了大鼠半乳糖性白内障模型, 显示此种腹腔注射法诱发的白内障动物模型为探索白内障防治药物和研究白内障发病机制提供了实验基础。

### 3.2 阿司匹林对大鼠半乳糖性白内障的抑制作用

氧化应激在多种类型的白内障发病过程中发挥了重要作用<sup>[11-13]</sup>。Li 等<sup>[14-16]</sup> 研究认为, 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 凋亡是大多数白内障形成的细胞学基础和始动因素, 而氧化损伤是 LECs 凋亡的重要诱发因素。本实验也发现, 白内障形成过程中早期即有抗氧化酶活性的显著降低, 说明晶状体发生了氧化损伤。因此应用抗氧化剂来防治有关白内障

始终是必要的。从实验结果来看,半乳糖组抗氧化酶活性明显下降(CAT 均值下降了 3.0 倍、GSP-PX 下降了 2.9 倍、SOD 下降了 3.9 倍),存在严重的晶状体氧化损伤。

Swamy 等<sup>[17]</sup>用 4 周龄 SD 大鼠晶状体培养实验证实,阿司匹林抑制了葡萄糖诱发的晶状体蛋白变性及聚合物的生成,同时阿司匹林本身可能对晶状体蛋白存在微弱的损伤作用。此后一系列离体实验<sup>[18-20]</sup>证实了 Swamy 等<sup>[17]</sup>的结论。本研究中阿司匹林组延缓了白内障发生 3 d,第 6、10、14 天晶状体混浊率分别为 25%、41.67%、58.33%,且多限于轻度混浊,未出现晶状体核混浊,第 20 天实验结束时仍有部分晶状体保持透明,晶状体混浊程度明显轻于半乳糖组;第 5 天时电镜下见阿司匹林组晶状体结构损害轻微,纤维整齐、指突数明显增加;和半乳糖组比较 CAT、GSH-PX、SOD 活性分别升高了 1.27、1.26、1.36 倍,差异均有统计学意义,说明阿司匹林具有保护抗氧化酶使晶状体免受氧化损伤的作用,补充一定量的阿司匹林有明显延缓早期白内障形成的作用。另外,阿司匹林并未完全阻止高半乳糖血症大鼠白内障的发生,到实验结束时阿司匹林组 Wistar 大鼠的晶状体混浊率达 83.33%,参考以往的离体实验报道,推测阿司匹林本身对晶状体有轻度损伤作用。此负面影响可能与全身用药的剂量存在一定关系,寻找合适、有效且不良反应较小的给药剂量等问题,有待于进一步的研究。

总之,本实验从晶状体的形态学、组织学及生化酶学等方面观察了全身补充阿司匹林对 Wistar 大鼠晶状体的保护作用,证实了阿司匹林具有保护晶状体抗氧化酶活性而产生抗氧化损伤作用,从而延缓早期白内障的发生发展。

参考文献

- 1 Padgaonkar VA, Leverenz VR, Fowler KE, et al. The effects of hyperbaric oxygen on the crystallins of cultured rabbit lenses: a possible catalytic role for copper [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 71(4): 373 - 383
- 2 Nabekura T, Koizumi Y, Nakao M, et al. Delay of cataract development in

- hereditary cataract UPL rats by disulfiram and aminoguanidine [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(2): 169 - 174
- 3 Harding JJ. Can drugs or micronutrients prevent cataract [J]? *Drugs Aging*, 2001, 18(7): 473 - 486
- 4 Mounsey A. Discontinuing aspirin or warfarin optional before cataract surgery [J]. *J Fam Pract*, 2003, 52(12): 933 - 935
- 5 Klein BE. Drug use and five-year incidence of age-related cataracts: The Beaver Dam Eye Study [J]. *Ophthalmology*, 2001, 108(9): 1670 - 1674
- 6 阎洪禄, 张昱. 牛磺酸抑制鼠糖性白内障形成的研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2003, 39: 44 - 45
- 7 何守志, 尹素云, 宋琛, 等. 半乳糖性白内障形成及逆转的实验研究 [J]. *中华眼科杂志*, 1987, 23: 39 - 42
- 8 Kinoshita JH. Mechanisms initiating cataract formation. *Prictir Lecture* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1976, 13: 713 - 721
- 9 董东生, 陆爱丽, 刘莹, 等. 体外培养大鼠白内障模型晶状体的早期生化改变 [J]. *中华眼科杂志*, 2000, 36(5): 344 - 347
- 10 Unakar NJ, Johnson M, Tsui J, et al. Effect of germanium-132 on galactose cataracts and glycation in rats [J]. *Exp Eye Res*, 1995, 61(2): 155 - 164
- 11 Giblin FJ. Glutathione: a vital lens antioxidant [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2000, 16: 121 - 135
- 12 Goswami S, Sheets NL, Zavadi J, et al. Spectrum and range of oxidative stress responses of human lens epithelial cells to H2O2 insult [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 2084 - 2093
- 13 Spector A, Li D, Ma W, et al. Differential amplification of gene expression in lens cell lines conditioned to survive peroxide stress [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 3251 - 3264
- 14 Li WC, Kuszak JR, Wang GM, et al. Calcimycin-induced lens epithelia cell apoptosis contributes to cataract formation [J]. *Exp Eye Res*, 1995, 61: 91 - 98
- 15 Li WC, Speter A. Lens epithelial cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract [J]. *Free Radical Biol Med*, 1996, 20: 301 - 311
- 16 Li WC, Kuszak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in human and animals [J]. *J Cell Biol*, 1995, 130: 169 - 181
- 17 Swamy MS, Abraham EC. Inhibition of lens crystalline glycation and high molecular weight aggregate formation by aspirin in vitro and in vivo [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989, 30: 1120 - 1126
- 18 Abraham EC. Nonenzymatic glycosylation (glycation) of lens crystallins in diabetes and aging [J]. *Prog Clin Biol Res*, 1989, 304: 123 - 139
- 19 Blakytyn R. Prevention of cataract in diabetic rats by aspirin, paracetamol (acetaminophen) and ibuprofen [J]. *Exp Eye Res*, 1992, 54(4): 509 - 518
- 20 Qin W. Reaction of aspirin with cysteinyl residues of lens gamma-crystallins: a mechanism for the proposed anti-cataract effect of aspirin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1181(2): 103 - 110

(收稿:2009-02-26 修回:2009-10-10)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊对论文所附照片的要求

论文所附照片如为组织切片、细胞培养图,投稿时应网上传输,稿件一经采用应将图片在专业洗像处洗成照片,并通过邮局寄至本刊编辑部。照片应清晰,对比度好,尺寸一致。其他类照片如网上发送则要求单位像素每英寸至少 300 线以上。请作者按此要求投稿,以免由于图片质量而影响刊出。

(本刊编辑部)