

引文格式: 刘海萍, 辛晓蓉. 黄芪复方对急性低压低氧大鼠视网膜线粒体损伤的保护作用[J]. 眼科新进展, 2020, 40(2): 110-114. doi: 10. 13389/j. cnki. rao. 2020. 0027

【实验研究】

黄芪复方对急性低压低氧大鼠视网膜线粒体损伤的保护作用[△]

刘海萍 辛晓蓉

【摘要】 目的 研究急性低压低氧环境对大鼠视网膜线粒体的影响及黄芪复方 (radix astragali seu hedysari compound, RAHC) 的干预作用。**方法** 将42只健康SD大鼠随机分为正常氧含量对照组(常氧组)、低氧组、RAHC干预组。低氧组和RAHC干预组在低压氧舱中模拟5000 m海拔的喂养环境, RAHC组在喂养中每天予以RAHC汤药0.1 g·kg⁻¹灌胃, 低氧组予以同等剂量生理盐水灌胃。各组在上述条件处理7 d后剥离视网膜, HE染色后光学显微镜下观察大鼠视网膜组织形态变化, RT-PCR法检测锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, Mn-SOD)的表达, 比色法测定琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)水平, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞色素C氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)活性, 免疫组化方法检测细胞色素C(cytochrome C, Cytc)的表达。**结果** 光学显微镜下观察发现, 低氧组大鼠视网膜出现水肿, 经RAHC干预后水肿减轻; 低氧组Mn-SOD mRNA水平(0.811±0.057) U·mg⁻¹较常氧组(0.950±0.920) U·mg⁻¹下降($P<0.05$), RAHC干预组Mn-SOD mRNA水平(0.884±0.101) U·mg⁻¹较低氧组高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 低氧组SDH水平(22.009±0.384) U·mgprot⁻¹较常氧组(30.104±0.854) U·mgprot⁻¹低($P<0.05$), 且RAHC干预后无明显差异($P>0.05$); 低氧组COX水平(0.632±0.031) ng·mL⁻¹较常氧组(2.461±0.097) ng·mL⁻¹低($P<0.01$), RAHC干预组COX水平(1.204±0.037) ng·mL⁻¹较低氧组高, 差异有统计学意义($P<0.01$)。与常氧组相比, 低氧组大鼠Cytc在视网膜神经节细胞层、神经纤维层、内丛状层及外丛状层中棕色染色阳性表达增强, 但在RAHC干预组中的表达强度减弱。**结论** 急性低压低氧环境导致视网膜线粒体发生损伤, RAHC对急性低压低氧导致的视网膜损伤有保护作用, 可能与上调Mn-SOD、COX活性及减少Cytc的释放有关。

作者简介: 刘海萍, 女, 1993年8月出生, 甘肃人, 硕士。E-mail: 791063150@qq.com; ORCID: 0000-0002-6268-5047

通信作者: 辛晓蓉, 女, 1971年10月出生, 医学博士、主任医师、博士生导师。E-mail: xrgc19@hotmail.com; ORCID: 0000-0003-1593-4140

收稿日期: 2019-07-27

修回日期: 2019-09-17

本文编辑: 臧赫

△基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81460086); 留学人员科技活动择优资助项目

作者单位: 610000 四川省成都市, 四川省医学科学院·四川省人民医院眼科

△基金资助: 国家自然科学基金项目(编号: 81460086); 留学人员科技活动择优资助项目

【关键词】 黄芪复方; 急性低压低氧; 视网膜; 线粒体; 锰超氧化物歧化酶; 琥珀酸脱氢酶; 细胞色素C氧化酶; 细胞色素C

【中图分类号】 R774.1

低氧低温是高原环境的特点之一, 低氧对人体各部分组织尤其是耗氧量高的神经系统会产生一定的影响^[1]。视网膜作为神经系统的延伸部分, 对缺氧尤为敏感, 在急性低压低氧条件下, 视网膜会出现静脉扩张、出血、水肿和棉絮斑等现象^[2]。线粒体作为能量储存和供给的重要场所, 是参与视网膜细胞代谢的主要细胞器。低压低氧环境使细胞氧化磷酸化下降、线粒体电子传递链受阻, 从而影响有氧代谢^[3]。我们前期研究提示, 低压低氧通过调节缺氧相关因子和调控凋亡相关基因而影响视网膜功能^[4]。本研究进一步探讨低压低氧对视网膜线粒体功能的影响以及黄芪复方(radix astragali seu hedysari compound, RAHC)的干预作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性健康SD大鼠42只[实验动物许可证号SCXK(陕)2018-001], 由西安交通大学动物实验中心提供, 体质量(200±20)g。

1.1.2 主要试剂和仪器 RAHC(黄芪20 g、人参10 g、玉竹9 g、枸杞9 g、白术6 g、甘草6 g), 按传统方法煎煮过滤, 并于恒温水浴锅中浓缩成11.76

g·mL⁻¹的生药。BCA法蛋白测定试剂盒、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)测试盒(南京建成生物工程研究所)。大鼠细胞色素氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)联免疫试剂盒(武汉华美科技有限公司)。细胞色素C(cytochrome C, Cytc)抗体(美国proteintech公司); RNA逆转录试剂盒(TAKARA公司), SYBR GREEN试剂盒、384孔RT-PCR板、RT-PCR反应膜、荧光定量PCR仪(美国ABI公司), RT-PCR引物(上海生工生物工程有限公司), 光学显微镜(日本Nikon公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 将42只健康SD大鼠随机分成3组, 正常氧含量对照组(常氧组)、低氧组、RAHC干预组各14只。常氧组在正常氧环境下喂养, 低氧组和RAHC干预组置于模拟5000 m海拔环境的低压氧舱, 每天降舱后, 加食、喂水, RAHC干预组大鼠每天予以RAHC汤药0.1 g·kg⁻¹灌胃, 低氧组予以同等剂量生理盐水灌胃, 连续7 d。

1.2.2 HE染色 造模大鼠喂养7 d后, 腹腔注射100 g·L⁻¹水合氯醛麻醉, 麻醉完全后迅速取出眼球, 在40 g·L⁻¹多聚甲醛中固定充分后进行脱水与透明处理, 浸蜡包埋, 连续切片、烤片处理后HE

染色,光学显微镜下观察各组视网膜组织结构变化。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 Mn-SOD mRNA 的表达 大鼠腹腔注射 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛麻醉,麻醉完全后迅速取出眼球,沿着角巩膜交界处将眼球剪开去除晶状体与玻璃体,完整剥离视网膜,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。将完整的视网膜解冻后加入 1 mL RNAiso Plus 混匀,提取细胞总 RNA,按照 SYBR GREEN 试剂盒进行 RT-PCR。Mn-SOD 上游引物:ACCCAAAGGAGAGTTGCTG,下游引物:TGTA-AGCGACCTTGCTCTCT; GAPDH 上游引物:AGACAGCCGCATCTTCTTGT,下游引物:CTTGCCGTGGG-TAGAGTCAT。将提取的 RNA 逆转录合成 cDNA,以 cDNA 产物为模板,进行 PCR 循环,PCR 循环参数: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反转录 3 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 初始 PCR 活化 3 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , 循环 40 次。扩增后进行熔解曲线分析,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 Mn-SOD mRNA 含量进行相对定量分析。

1.2.4 比色法测定 SDH 水平 按照 BCA 法蛋白测定说明书准备视网膜匀浆,配液加样后混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min , 波长 562 nm , 酶标仪测定各孔吸光度 (A) 值。用比色法测定 SDH, 将可见分光光度计于 600 nm 处, 1 cm 光径比色皿, 以双蒸水调零, 加入待测样本及工作液, 混匀并计时, 先后读取 A 值 2 次 (A_1 值及 A_2 值), 求出 2 次吸光度差值 ($\Delta A = A_1 - A_2$), 根据公式计算 SDH 水平。

1.2.5 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 COX 活性 用纯化的抗体包被微孔板, 制成固相载体, 往包被

COX 抗体的微孔中依次加入视网膜标本、标准品、生物素化的抗 COX 抗体、HRP 标记的亲合素, 经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下最终转化成黄色, 颜色深浅和样本中 COX 呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定 A 值, 计算样本浓度。

1.2.6 免疫组织化学染色法检测 Cytc 表达 大鼠经不同处理 7 d 后, 腹腔注射 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛麻醉, 取出眼球固定于 $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛溶液, 常规脱水、浸蜡、包埋, 制成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 石蜡切片后贴片。常规二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 抗原修复, 封闭内源性过氧化物酶, 滴加 Cytc 一抗 ($1:500$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, 滴加辣根酶标记的二抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min , DAB 显色 $2\sim5\text{ min}$, 自来水终止显色。苏木素复染后脱水、透明, 中性树胶封片, 在光学显微镜下随机选取不同的视野观察结果。

1.3 统计学方法 使用 SPASS 19.0 统计学软件进行处理。实验数据经 W 检验后用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 levene 检验方差齐性, 使用单因素方差分析, 组间多重比较采用 $LSD-t$ 检验。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 低压低氧及 RAHC 干预对视网膜的影响 在光学显微镜下, 常氧组大鼠视网膜各层组织结构清楚 (图 1A)。低压低氧引起低氧组大鼠视网膜水肿, 其中以神经纤维层及内丛状层最为明显, 神经节细胞肿胀 (图 1B)。RAHC 干预组神经节细胞肿胀较低氧组减轻 (图 1C)。

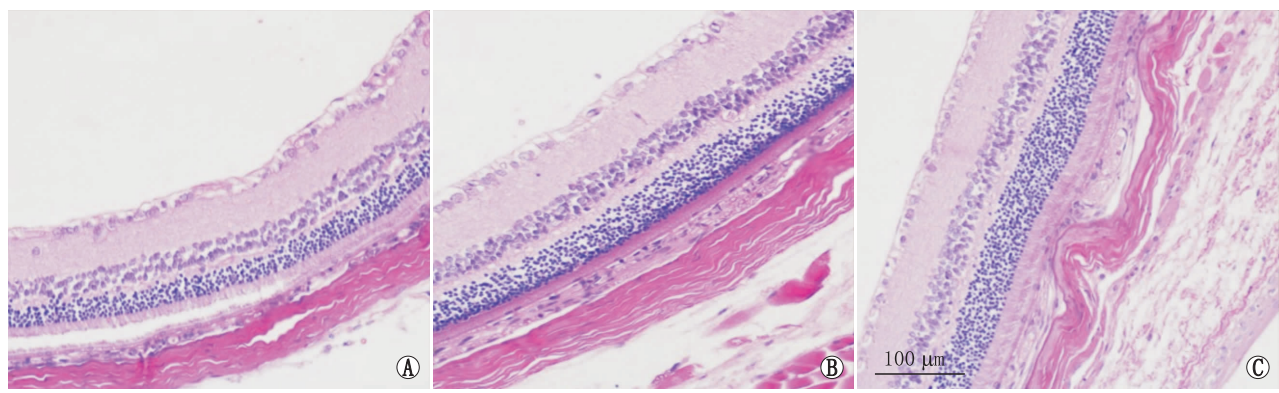


图 1 不同条件处理的大鼠视网膜组织 HE 染色结果 A:常氧组;B:低氧组;C:RAHC 干预组

2.2 低压低氧及 RAHC 干预对视网膜 Mn-SOD mRNA 表达的影响 低氧组视网膜细胞线粒体 Mn-SOD 活性 [$(0.811 \pm 0.057)\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$] 较常氧组 [$(0.950 \pm 0.920)\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$] 低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 经 RAHC 干预后, 视网膜细胞线粒体 Mn-SOD [$(0.884 \pm 0.101)\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$] 活性较低氧组高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 RAHC 的干预可增强低压低氧环境下视网膜细胞线粒体 Mn-

SOD 的活性。

2.3 低压低氧及 RAHC 干预对视网膜 SDH 水平及 COX 活性的影响 低氧组视网膜细胞线粒体 SDH 活性较常氧组低 ($P < 0.05$), RAHC 干预组与低氧组相比, SDH 表达无统计学差异 ($P = 0.761$); 相较于常氧组视网膜细胞线粒体 COX 活性, 低氧组 COX 活性下调明显 ($P < 0.01$), 视网膜细胞有氧代谢程度较弱, 而 RAHC 干预组视网膜受损减轻, COX

的相对表达量较低氧组上调,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表1。

2.4 低压低氧及 RAHC 干预对视网膜 Cytc 表达的影响 免疫组化检测结果显示,常氧组视网膜神经节细胞层、神经纤维层、内丛状层及外丛状层 Cytc 呈弱阳性表达,低氧组以上各层视网膜 Cytc 阳性表达增强,而 RAHC 干预组视网膜 Cytc 阳性表达较低氧

组减弱。见图2。

表1 各组 SDH 与 COX 活性水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SDH/U · mgprot ⁻¹	COX/ng · mL ⁻¹
常氧组	6	30.104 ± 0.854	2.461 ± 0.097
低氧组	6	22.009 ± 0.384 *	0.632 ± 0.031 *
RAHC 干预组	6	22.108 ± 0.445	1.204 ± 0.037 #

注:与常氧对照组相比,* $P<0.05$;与低氧组相比,# $P<0.05$

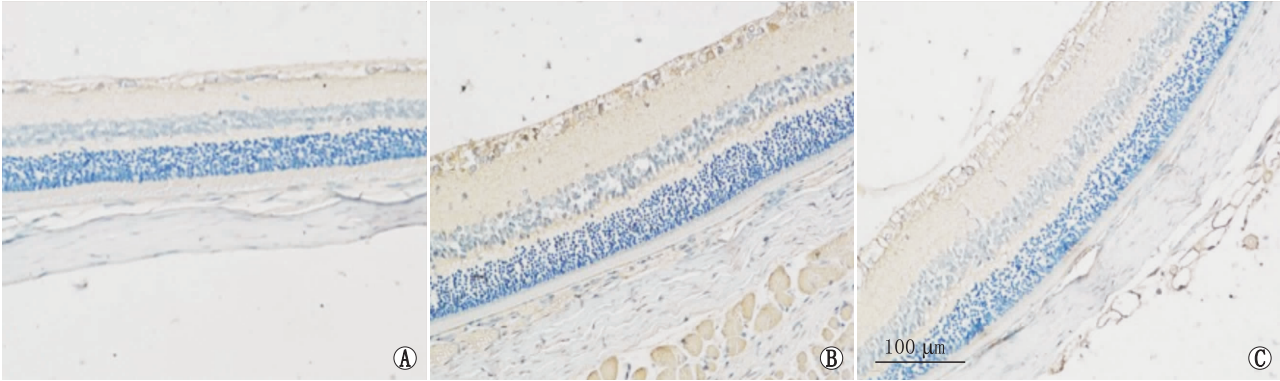


图2 Cytc 在各组大鼠视网膜组织中的表达 A:常氧组;B:低氧组;C:RAHC 干预组

3 讨论

急性高原环境中,中枢神经系统和呼吸系统功能影响较为明显^[5]。急性缺氧会引起中枢神经系统兴奋性增强,视网膜作为神经系统的延伸,也易受急性缺氧的影响。近年来关于急性高原视网膜发病分子水平的研究尚少,为揭示缺氧对视网膜影响的潜在机制,我们前期研究了视网膜中缺氧相关因子和凋亡相关基因的表达^[4],在本研究中进一步探讨低压低氧对视网膜线粒体功能的影响以及 RAHC 在其中的干预作用机制。

我们在前人相关研究基础上减去四君子汤中的茯苓,加黄芪、玉竹、枸杞而形成本研究中所用的 RAHC。研究表明,四君子汤能够抑制自由基损伤,改善机体内分泌功能,调节体内能量代谢^[6-7]。其作用机制可能与清除自由基、增强 SOD 及 SDH 活性,改善组织抗氧化性,保护细胞线粒体结构的完整性有关^[8]。在四君子汤中加入黄芪后,相比四君子汤,大鼠肝脏细胞线粒体 SDH 和 COX 活性上调更为明显^[9]。玉竹中的成分同异戊酮-1,能够影响线粒体介导的细胞凋亡途径,发挥抗氧化作用^[10]。现代药理研究证明,枸杞中含有的枸杞多糖也具有抗凋亡、抗氧化及延缓衰老作用^[11]。茯苓归经于心肺脾,主利水渗湿,而易伤津液,因此我们去茯苓,以黄芪人参及白术配伍益气,佐以玉竹养阴,枸杞明目,甘草调和诸药,合用以达益气养阴明目之效。

我们利用低压氧舱模拟 5000 m 海拔的高原环境,通过观察大鼠视网膜组织形态,发现低氧组处理后的大鼠视网膜出现水肿,神经纤维层水肿最为明

显,神经节细胞肿胀,研究提示急性低压低氧环境会导致内源性抗氧化防御系统失衡,抗氧化酶类产生,抗氧化物活性降低^[13-15]。我们前期研究表明,低氧会引起视神经脑膜上皮细胞中线粒体、内质网功能障碍,氧化应激能力下降^[16]。在 RAHC 干预下视网膜水肿程度减轻,提示 RAHC 对急性低压低氧环境导致的视网膜功能受损有一定的保护作用。

SDH 和 COX 作为线粒体的标志酶,其活性强弱反映了细胞有氧代谢活动的程度^[17]。COX 是线粒体电子传递链的末端酶,而 SDH 位于线粒体的内膜及嵴,参与三羧酸循环。线粒体 ATP 的合成与电子传递链密切相关,SDH 及 NADH 脱氢酶氧化的电子沿着 ETC 传递,与质子泵和整个线粒体内膜的质子梯度相结合,通过 ATP 合酶受控的质子流向电化学梯度来催化 ATP 合成^[18]。本研究结果表明,急性低压低氧环境会引起视网膜细胞 COX 及 SDH 水平和活性下降,且可能进一步导致线粒体的呼吸功能受损,致使氧化代谢不能完成,线粒体中 ATP 产生中断,从而使视网膜功能受损。RAHC 干预后,COX 的表达上调,这可能是增强 COX 活性催化底物氧化,通过 ATP 合成酶(复合物 V)促使 ATP 合成来完成的^[19]。

Cytc 作为线粒体呼吸链的重要组成部分,与 COX 以共价键结合的方式在呼吸链复合酶Ⅲ和Ⅳ之间传递电子^[20]。我们前期对视神经脑膜上皮细胞研究提示,缺氧应激反应引起视神经脑膜上皮细胞线粒体功能障碍,线粒体膜上形成 Cytc 释放通道^[21],致使 Cytc 弥散于细胞质中,对细胞产生不利的影响,诱导细胞凋亡^[22]。本研究中,低氧组视网

膜神经节细胞层、神经纤维层、内丛状层及外丛状层 Cytc 表达增强,尤以神经节细胞层最为明显,提示低压低氧环境导致线粒体膜通道开放,上调了 Cytc 的表达。RAHC 干预后,Cytc 在视网膜神经节细胞中表达减弱,减轻了视网膜损害程度。

少量的超氧阴离子自由基作为生物体的第二信使,对信号转导有着重要的作用,但过多的自由基不能被及时清理时,会引起一系列氧化损伤^[23]。Mn-SOD 存在于线粒体基质,是 SOD 家族中仅有的维持需氧器官生存的必需蛋白^[24],作为视网膜细胞线粒体内主要的抗氧化酶系统之一,Mn-SOD 在清理活性氧过程中发挥重要作用^[25]。本研究中,急性低压低氧环境引起 Mn-SOD 活性下降,可能引起超氧阴离子自由基堆积,导致 COX 及 SDH 水平下降,使视网膜细胞线粒体结构和功能发生进一步变化,从而影响视网膜功能。RAHC 干预后,Mn-SOD 活性较低氧组升高,推测 RAHC 可能与上调 Mn-SOD 活性、清除视网膜细胞中 ROS,保护其免受 ROS 的损伤有关。

本研究结果表明,急性低压低氧环境影响大鼠视网膜中 Mn-SOD、COX、SDH 及 Cytc 活性而对视网膜线粒体功能产生损害,RAHC 通过提高视网膜细胞线粒体 Mn-SOD、COX 水平,降低 Cytc 活性发挥保护视网膜功能的作用,但其具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 安文静,高芬.慢性高原病发病机制研究进展[J].医学综述,2009,15(14):2153-2154.
AN W J,GAO F. Research progress of pathogenesis of chronic high altitude disease[J]. Med Recapit,2009,15(14):2153-2154.
- [2] ARORA R,JHA K N,SATHIAN B. Retinal changes in various altitude illnesses[J]. Singap Med J,2011,52(9):685-688.
- [3] CHEN J,GAO Y,LIAO W,HUANG J,GAO W. Hypoxia affects mitochondrial protein expression in rat skeletal muscle[J]. OMICS,2012,16(3):98-104.
- [4] XIN X,DANG H,ZHAO X,WANG H. Effects of hypobaric hypoxia on rat retina and protective response of resveratrol to the stress[J]. Int J Med Sci,2017,14(10):943-950.
- [5] ZAFREN K. Prevention of high altitude illness[J]. Travel Med Infect Dis,2014,12(1):29-39.
- [6] SEIDMAN M D. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis[J]. Laryngoscope,2000,110(5):727-738.
- [7] 杨靖,詹向红,孙晔,李秀昌,李厚刚.四君子汤对 D-半乳糖衰老模型小鼠心、肝、脑组织 MDA 含量及端粒酶活性的影响[J].中国中西医结合杂志,2005,25(6):531-533.
YANG J,ZHAN X H,SUN Y,LI X C,LI H G. Effect of Sijunzi Decoction on MDA content and telomerase activity in heart, liver and brain tissue of D-galactose aging model mice[J]. Chin J Integr Tradit Western Med,2005,25(6):531-533.
- [8] 李冰,方文娟,孟辉.四君子汤对 D-半乳糖诱导衰老小鼠脑抗氧化能力和线粒体 DNA(mtDNA)损伤的影响[J].北华大学学报(自然科学版),2009,10(3):218-222.
LI B,FANG W J,MENG H. Effect of Sijunzi Decoction on brain antioxidant capacity and mitochondrial DNA (mtDNA) damage in aging mice induced by D-galactose[J]. J Beihua U (Nat Sci),2009,10(3):218-222.
- [9] 宋稚芳,王汝俊,刘友章,刘静,黄秋凌.健脾益气中药对脾虚大鼠肝组织线粒体功能的影响[J].中药新药与临床药理,2009,20(5):423-426.
SONG Z F,WANG R J,LIU Y Z,LIU J,HUANG Q L. Effect of

- traditional Chinese medicine on mitochondrial function of liver tissue in rats with spleen deficiency[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol,2009,20(5):423-426.
- [10] NING D,JIN M,XV T,SUN J,LI M. Homoisoflavanone-1 isolated from Polygonatum-1 odoratum arrests the cell cycle and induces apoptosis in A549 cells[J]. Oncol Lett,2018,16(3):3545-3554.
 - [11] 杨圣,董俊杰,姜振玲,陈沁,付旭平,李瑶.枸杞多糖对 D-半乳糖致急性衰老模型小鼠的基因表达谱的影响[J].复旦学报(自然科学版),2008,47(5):639-646.
YANG S,DONG J J,JIANG Z L,CHEN Q,FU X P,LI Y. Effect of Lycium barbarum polysaccharide on gene expression profile of D-galactose-induced subacute aging model mice[J]. J Fudan U (Nat Sci),2008,47(5):639-646.
 - [12] CHANG J S,LEE Y J,WILKIE D A,LIN C T. The Neuroprotective and antioxidative effects of submicron and blended Lycium barbarum in experimental retinal degeneration in rats[J]. J Vet Med Sci,2018,80(7):1108-1115.
 - [13] MAITI P,SINGH S B,SHARMA A K,MUTHURAJU S,BANERJEE P K,ILAVAZHAGAN G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain[J]. Neurochem Int,2006,49(8):709-716.
 - [14] IZZOTTI A,BAGNIS A,SACCÀ S C. The role of oxidative stress in glaucoma[J]. Mutat Res,2006,612(2):105-114.
 - [15] FERREIRA S M,LENER S F,BRUNZINI R,EVELSON P A,LLESUY S F. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients[J]. Am J Ophthalmol,2004,137(1):62-69.
 - [16] 辛晓蓉,巩天祥.缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞内质网和线粒体膜电位的影响[J].眼科新进展,2014,34(11):1009-1012.
XIN X R,GONG T X. Effect of hypoxia on endoplasmic reticulum and mitochondrial membrane potential of meningeal epithelial cells in CSF optic nerve barrier[J]. Rec Adv Ophthalmol,2014,34(11):1009-1012.
 - [17] ROSS J M. Visualization of mitochondrial respiratory function using cytochrome c oxidase/succinate dehydrogenase (COX/SDH) double-labeling histochemistry[J]. J Vis Exp,2011,(57):e3266.
 - [18] VAN VRANKEN J G,NA U,WINGE D R,RUTTER J. Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol,2015,50(2):168-180.
 - [19] WONG-RILEY M T. Bigenomic regulation of cytochrome c oxidase in neurons and the tight coupling between neuronal activity and energy metabolism[J]. Adv Exp Med Biol,2012,748:283-304.
 - [20] REED J C. Cytochrome c: can't live with it - can't live without it[J]. Cell,1997,91(5):559-562.
 - [21] 辛晓蓉,巩天祥,赵莉,李新章.缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞 ATP 水平和细胞色素 C 表达的影响[J].中华实验眼科杂志,2014,32(1):28-31.
XIN X R,GONG T X,ZHAO L,LI X Z. Effect of hypoxia on ATP level and cytochrome c expression of meningeal epithelial cells in CSF optic nerve barrier[J]. Chin J Exp Ophthalmol,2014,32(1):28-31.
 - [22] SUSIN S A,LORENZO H K,ZAMZAMI N,MARZO I,BRENNER C,LAROCHELETTE N. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process[J]. J Exp Med,1999,189(2):381-394.
 - [23] JIN L H,BAHN J H,EUM W S,KWON H Y,JANG S H,HAN K H. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells[J]. Free Radic Biol Med,2001,31(11):1509-1519.
 - [24] IKEGAMI T,SUZUKI Y,SHIMIZU T,ISONO K,KOSEKI H,SHIRASAWA T. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) gene[J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,296(3):729-736.
 - [25] VIDIMAR V,GIUS D,CHAKRAVARTI D,BULUN S E,WEI J J,KIM J J. Dysfunctional Mn-SOD leads to redox dysregulation and activation of prosurvival AKT signaling in uterine leiomyomas[J]. Sci Adv,2016,2(11):e1601132.

Protective effect of Radix Astragali seu Hedysari Compound on retinal mitochondrion injury caused by acute hypobaric hypoxia in rats

LIU Haiping, XIN Xiaorong

Department of Ophthalmology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

Corresponding author: XIN Xiaorong, E-mail: xrgc19@hotmail.com

[Abstract] **Objective** To explore the effect of acute hypobaric hypoxia on retinal mitochondria and intervention effect of Radix Astragali seu Hedysari Compound (RAHC) on retinal mitochondrion injury in rats. **Methods** Totally 42 healthy SD rats were randomly divided into 3 groups: Normoxic control group (normoxia group), hypoxic group and RAHC intervention group. Rats in hypoxic group and RAHC intervention group were fed at a hypobaric oxygen chamber (simulate 5000 m altitude). Rats in RAHC group was given $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ RAHC compound decoction by gavage each day, and those in hypoxic group received same amount of normal saline by gavage. The retinas were collected after different treatments for 7 days. After HE staining, morphological changes of retinal tissues were observed under optical microscope. The expression of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) was detected by RT-PCR, level of succinate dehydrogenase (SDH) was determined by colorimetry, activity of cytochrome c oxidase (COX) was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and expression level of cytochrome C (CytC) was detected by immunohistochemistry. **Results** Edema was found in the retina of rats in hypoxia group under light microscope, and was alleviated after the intervention of RAHC. The Mn-SOD mRNA levels were $(0.811 \pm 0.057) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ in the hypoxia group, and lower than $(0.950 \pm 0.920) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ in normoxic control group and $(0.884 \pm 0.101) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ in RAHC intervention group, statistical differences were observed (all $P < 0.05$). SDH levels were $(22.009 \pm 0.384) \text{ U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ in the hypoxic group, and lower than $(30.104 \pm 0.854) \text{ U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ in normoxic control group ($P < 0.05$). There was no obvious change of SDH level after RAHC intervention ($P > 0.05$). COX levels were $(0.632 \pm 0.031) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ in hypoxic group, lower than $(2.461 \pm 0.097) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ in normoxic control group and $(1.204 \pm 0.037) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ in RAHC intervention group (all $P < 0.01$). Compared with normoxic control group, positive brown staining of CytC increased in retinal ganglion cell layer, retinal nerve fiber layer, inner plexiform layer and outer plexiform layer of rats in hypoxic group, and decreased in RAHC intervention group. **Conclusion** Acute hypobaric hypoxia can cause retinal mitochondrion injury, while RAHC exerts protective effects on the injury by upregulating Mn-SOD and COX activities as well as reducing the CytC release.

[Key words] radix astragali seu hedysari compound; acute hypobaric hypoxia; retina; mitochondrion; manganese superoxide dismutase; succinate dehydrogenase; cytochrome C oxidase; cytochrome C