DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2020.05.015

·论著:代谢与内分泌系统疾病·

虾青素对2型糖尿病大鼠视网膜病变的干预作用及机制研究

杨 倩[1*],刘 媛[2],李威威[1]
(保定市第一中心医院 1.眼三科,2.眼二科,河北 保定 071000)

摘 要: 探讨虾青素对2型糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用及机制。将40只大鼠随机分为4组:正常组、模型组、低剂量实验组(虾青素15 mg/kg)、高剂量实验组(虾青素30 mg/kg),每组各10只。除正常组外,其它各组采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ 30 mg/kg)并持续高糖高脂饲料饲养构建2型糖尿病大鼠模型;采用HE染色观察大鼠视网膜组织病理变化;免疫沉淀法检测大鼠视网膜组织中活性氧(ROS)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)水平;蛋白质免疫印迹法检测大鼠视网膜组织中色素上皮衍生因子(PEDF)和血管内皮生长因子(VEGF)水平。结果显示,与模型组比较,低、高剂量实验组大鼠视网膜组织中ROS、VEGF水平降低,CAT、SOD和PEDF水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。高剂量实验组大鼠视网膜组织中CAT、SOD和PEDF水平高于低剂量实验组($P<0.05$),ROS、VEGF水平低于低剂量实验组($P<0.05$)。该结果表明虾青素对2型糖尿病大鼠视网膜病变有一定保护作用,其机制可能与调控氧化应激、PEDF和VEGF有关。

关键词: 虾青素; 糖尿病; 视网膜病变; 血管内皮生长因子; 色素上皮衍生因子
中图分类号:R587.2 **文献标识码:**A

Intervention and mechanism of astaxanthin on retinopathy in type 2 diabetic rats

YANG Qian[1*], LIU Yuan[2], LI Weiwei[1]
(1. *Department of the Third Ophthalmology*, 2. *Department of the Second Ophthalmology*, *Baoding First Central Hospital*, *Baoding* 071000, *Hebei*, *China*)

Abstract: To explore the protective effect and mechanism of astaxanthin on retinopathy in type 2 diabetic rats. Forty rats were divided into 4 groups: normal group, model group, low-dose experimental group (astaxanthin 15 mg/kg), high-dose experimental group (astaxanthin 30 mg/kg), 10 rats in each group. In addition to the normal group of rats, the other three groups were injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ 30 mg/kg) and continuous feeding of high-sugar and high-fat feed were used to construct a type 2 diabetes rat model; HE staining was used to observe pathological changes of retinal tissue; immunoprecipitation method was used to detect reactive oxygen species (ROS), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) levels; western blot was used to detect pigment epithelium derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels. The results showed that compared with the model group, the levels of ROS and VEGF decreased, and the levels of CAT, SOD, and PEDF increased in the low and high dose experimental groups ($P<0.05$). The levels of CAT, SOD and PEDF in the retinal tissue of the high-dose experimental group were higher than those of the low-dose experimental group ($P<0.05$), and the levels of ROS and VEGF were lower than those of the low-dose experimental group ($P<0.05$). The results indicate that astaxanthin has a certain protective effect on retinopathy in type 2 diabetic rats, and its mechanism may be related to the regulation of oxidative stress, PEDF and VEGF.

Key words: astaxanthin; diabetes mellitus; retinopathy; VEGF; PEDF

糖尿病视网膜病变是2型糖尿病严重的微血管并发症,可导致视力永久性丧失[1]。近年来,伴随我国2型糖尿病发病率的增加,2型糖尿病视网膜病变的发病率也随之增加,已严重影响人们的健康及正常生活[2]。有研究表明[3],糖尿病患者视网膜对高糖及低氧刺激敏感,进而诱发促血管生成和抑制血管生成的失衡,最终导致视网膜病变。目前,

收稿日期:2020-03-23;**修回日期:**2020-06-11

* **通信作者,**E-mail:sanz12@163.com.

临床常用激光手术及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抑制剂治疗2型糖尿病视网膜病变,但二者均对视网膜神经细胞有一定伤害[4]。因此,研发伤害性较低的用于治疗2型糖尿病视网膜病变的药物具有重要意义。虾青素是唯一能通过血脑屏障的一种类胡萝卜素,广泛存在于自然界中[5]。相关研究表明[6-7],虾青素具有较强的抗氧化作用,可以有效清除细胞内氧自由基,对心血管疾病、糖尿病等疾病的预防及治疗有一定作用。既往研究表明虾青素对糖尿病肾病有一定的保护作用[8],可通过上调核因子E2相关因子和NAD(P)H醌氧化还原酶1(nicotinamide quinone oxidoreductase 1, NQO1)抑制高糖诱导的氧化应激反应,从而发挥其保护作用。但是对于2型糖尿病视网膜病变的作用还有待探讨,因此,本实验探讨虾青素对2型糖尿病大鼠视网膜病变的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD雄性大鼠70只,SPF级,8周龄,体重质量220~230 g,购自于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2014-0008。适应性饲养1周。按照2006版《关于善待实验动物的指导性意见》对实验动物进行处理。

1.2 试剂与仪器

虾青素(HPLC≥98%,上海北诺生物科技有限公司);链脲佐菌素(大连美仑生物技术有限公司);活性氧(ROS)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(上海奥陆生物科技有限公司);VEGF抗体和色素上皮衍生因子(PEDF)抗体(美国abcam公司);Tecan Freedom EVOlyzer® 全自动酶免工作站(帝肯(上海)贸易有限公司);日立7100全自动生化分析仪(广州东林生物科技有限公司);DYCP-31C型电泳仪及配套电泳槽(北京六一公司)等。

1.3 模型构建[9]

70只雄性SD大鼠适应性饲养1周后,随机选取60只大鼠,采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ 30 mg/kg)并持续高糖高脂饲料饲养构建2型糖尿病大鼠模型。10只正常组大鼠给予普通饲料饲养。造模后第五天,检测各组大鼠血糖,若血糖>16.7 mmol/L则2型糖尿病大鼠造模成功。其中30只大鼠造模成功,30只大鼠造模失败,予以剔除。所有大鼠自由饮水、检测血糖,每2周进行一次眼底检查,2型糖尿病大鼠视网膜出现新生血管即2型糖尿病视网膜病变大鼠模型成功。将2型糖尿病视网膜病变造模成功的30只大鼠随机分为3组:模型组、低剂量实验组、高剂量实验组,每组各10只。低剂量实验组大鼠给予虾青素15 mg/kg灌胃处理,高剂量实验组大鼠给予虾青素30 mg/kg灌胃处理,给药剂量参照相关文献[2]。模型组及正常组大鼠均给予同等剂量生理盐水。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 视网膜组织HE染色 取每组10只大鼠左眼视网膜组织,行HE染色。采用腹腔注射戊巴比妥钠(0.3 g/100 g)麻醉大鼠并处死,摘取眼球浸入眼球固定液中固定,取视网膜组织,依次石蜡包埋、切片、脱蜡、水化,然后进行HE染色,观察视网膜组织病理变化。

1.4.2 视网膜组织中ROS、CAT和SOD水平检测 取每组10只大鼠右眼视网膜组织,研磨成组织匀浆,3 500 r/min离心15 min(离心半径8 cm),取离心后上清液,-20 ℃冰箱中保存,待验。采用免疫沉淀法检测视网膜组织中ROS、CAT和SOD水平,实验步骤严格按照试剂盒说明书执行。

1.4.3 视网膜组织中PEDF和VEGF水平检测 用蛋白质免疫印迹法[10]检测视网膜组织中PEDF和VEGF水平。步骤如下:取实验1.4.2中组织匀浆至试管中,首先加入RIPA裂解液用于提取组织中总蛋白;而后用BCA蛋白定量试剂盒进行PEDF及VEGF定量检测。具体过程:80 V凝胶电泳15 min,电压增加至120 V,直至溴酚蓝跑出胶面;转膜,5%脱脂牛奶封闭2 h,滴加一抗,4 ℃环境下孵育过夜;滴加二抗,室温下孵育2 h;曝光显影,用Image J1.8.0软件分析实验结果。

1.5 统计方法

用SPSS 23.0统计软件进行数据分析,正态分布的计量资料采用均数±标准差表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组视网膜组织病理变化

由图1可知,正常组大鼠视网膜组织结构清晰,内、外核层细胞排列规则,未见新生血管生成;模型组视网膜组织结构不清晰,神经纤维层伴水肿,内、

外核层细胞排列疏松，有新生血管生成；低、高剂量实验组视网膜组织结构较清晰，内、外核层细胞排列较整齐，新生血管生成均较模型组有明显改善，且高剂量实验组改善效果优于低剂量实验组。

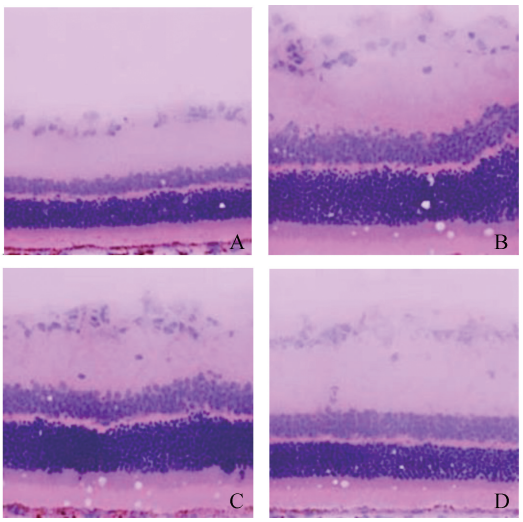


图 1　各组视网膜组织病理切片（HE，40×）

A：正常组；B：模型组；C：低剂量实验组；D：高剂量实验组

2.2　各组视网膜组织中 ROS、CAT 和 SOD 水平比较

四组视网膜组织中 ROS、CAT 和 SOD 水平比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与正常组比较，模型组视网膜组织中 ROS 水平升高，CAT 和 SOD 水平降低（$P<0.05$）。与模型组比较，低、高剂量实验组视网膜组织中 ROS 水平降低，CAT 和 SOD 水平升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；此外，高剂量实验组 ROS、CAT 和 SOD 水平改善程度优于低剂量实验组（$P<0.05$）。见表 1。

表 1　四组 ROS、CAT 和 SOD 水平比较

分组	ROS（μmol/mg）	CAT（U/mg）	SOD（U/mg）
正常组	0.78±0.10	2.86±0.34	46.63±6.16
模型组	8.96±0.18[a]	0.74±0.11[a]	20.75±3.09[a]
低剂量实验组	4.42±0.17[ab]	1.26±0.13[ab]	26.95±4.54[ab]
高剂量实验组	2.24±0.13[abc]	2.02±0.18[abc]	33.97±6.24[abc]

与正常组比较，[a]$P<0.05$；与模型组比较，[b]$P<0.05$；与低剂量实验组比较，[c]$P<0.05$（$n=10$）

2.3　各组视网膜组织中 PEDF 和 VEGF 水平比较

由表 2、图 2 可知，四组视网膜组织中 PEDF 和 VEGF 水平比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与正常组比较，模型组视网膜组织中 PEDF 水平降低，VEGF 水平升高（$P<0.05$）。与模型组比较，低、高剂量实验组视网膜组织中 PEDF 水平升高，VEGF 水平降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。高剂量实验组视网膜组织中 PEDF 水平高于低剂量实验组（$P<0.05$），VEGF 水平低于低剂量实验组（$P<0.05$）。

表 2　四组 PEDF 和 VEGF 水平比较

分组	PEDF	VEGF
正常组	1.42±0.23	0.55±0.07
模型组	0.42±0.16[a]	1.42±0.16[a]
低剂量实验组	0.84±0.13[ab]	1.13±0.08[ab]
高剂量实验组	1.10±0.16[abc]	0.84±0.10[abc]

与正常组比较，[a]$P<0.05$；与模型组比较，[b]$P<0.05$；与低剂量实验组比较，[c]$P<0.05$（$n=10$）

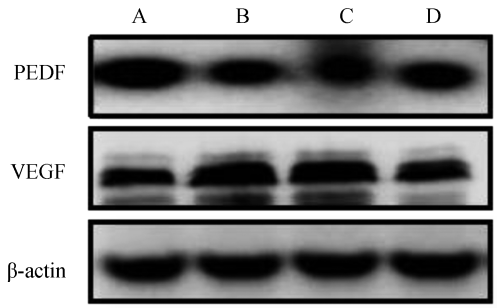


图 2　四组 PEDF 和 VEGF 蛋白表达

A：正常组；B：模型组；C：低剂量实验组；D：高剂量实验组

3　讨　　论

糖尿病是由遗传、环境及生活方式等多种诱因引起的以高血糖为特征的代谢性疾病[11]。糖尿病还会产生的并发症有糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变等[12]。虾青素在糖尿病肾病中的保护作用已有研究，但是虾青素对于糖尿病视网膜病变的作用鲜有报道。本实验通过高糖高脂饲料饲养并腹腔注射链脲佐菌素构建 2 型糖尿病大鼠模型，通过观察虾青素干预后糖尿病大鼠视网膜组织病理变化、氧化应激及血管新生等相关指标，探究其对糖尿病视网膜病变的保护作用，为虾青素临床应用奠定基础。

本研究结果显示，模型组大鼠视网膜组织结构不清晰，神经纤维层伴水肿，内、外核层细胞排列疏松，有新生血管生成，该结果表明 2 型糖尿病视网膜病变大鼠模型造模成功。给予虾青素干预后，低、高剂量实验组视网膜组织结构及内、外核层细胞排

列均较模型组有所改善,提示虾青素对2型糖尿病视网膜病变有较好的治疗作用,可修复高糖诱导的视网膜病变,且随虾青素给药剂量增加,其改善效果越为明显。

最近研究发现虾青素有较强的抗氧化能力[13-15]。ROS是脂质过氧化的终产物,检测ROS水平可了解膜脂过氧化的程度[16]。SOD同样能够反映细胞的氧化应激水平[17]。CAT是存在于机体内的一种重要的过氧化物分解酶,可使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,发挥保护细胞膜的结构和功能[18]。本研究结果显示:与正常组比较,模型组视网膜组织中ROS水平升高,CAT和SOD水平降低。给予虾青素干预后,低、高剂量实验组视网膜组织中ROS水平降低,CAT和SOD水平升高,该结果表明虾青素可有效改善高糖及低氧诱导的氧化应激损伤,提高组织内抗氧化应激酶CAT和SOD水平,发挥保护视网膜组织细胞免受氧化应激损伤。

PEDF是丝氨酸蛋白酶抑制剂超基因家族的成员,能够产生很强的新生血管抑制作用,同时是细胞外神经营养因子,对神经组织的发育和生长有重要作用[19]。糖尿病视网膜病变发病机制是视网膜缺血、缺氧造成眼内VEGF大量表达,VEGF会与高亲和力受体结合从而介导血管内皮细胞增殖,导致新生血管形成[20]。本研究给予虾青素干预后,低、高剂量实验组视网膜组织中PEDF水平升高,VEGF水平降低,且随虾青素给药剂量增加,其改善效果越明显。上述结果说明虾青素可有效通过上调PEDF表达,下调VEGF表达抑制视网膜新生血管生成,从而保护视网膜组织细胞免受损伤。

综上所述,虾青素可有效改善糖尿病大鼠视网膜病变,其机制可能与调控PEDF和VEGF表达,抗氧化应激有关。

参考文献:

[1] 彭静静,陈琰,曹桂,等.血清胆红素水平对不同阶段2型糖尿病性视网膜病变的诊断价值[J].中国实验诊断学,2019,23(10):1743-5.

[2] 金雅美,冯晓红.2型糖尿病患者视网膜病变与血清胱抑素C关系分析[J].浙江医学,2019,41(19):2085-6.

[3] HAUTALA N, AIKKILA R, KORPELAINEN J, et al. Marked reductions in visual impairment due to diabetic retinopathy achieved by efficient screening and timely treatment[J]. Acta Ophthalmol, 2014,92(6):582-7.

[4] HE F, XIA X, WU XF, et al. Diabetic retinopathy in predicting diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes and renal disease: a meta-analysis[J]. Diabetologia, 2013,56(3):457-66.

[5] BENLARBI-BEN KHEDHER M, HAJRI K, DELLAA A, et al. Astaxanthin inhibits aldose reductase activity in Psammomys obesus, a model of type 2 diabetes and diabetic retinopathy[J]. Food Sci Nutr, 2019,7(12):3979-85.

[6] 杨明,王志军,邓婷婷,等.虾青素对1型糖尿病大鼠代谢性白内障的预防作用及其机制[J].中华实验眼科杂志,2017,35(3):217-24.

[7] KUBO H, ASAI K, KOJIMA K, et al. Astaxanthin suppresses cigarette smoke-induced emphysema through Nrf2 activation in mice[J]. Mar Drugs, 2019,17(12):673.

[8] 张健美.糖尿病大鼠肾组织Nrf2、NQO1的表达及虾青素对其干预作用的研究[D].石家庄:河北医科大学,2015.

[9] 逄冰.益气温阳通络法预防糖尿病大鼠视网膜病变发生的作用及机制研究[D].北京:中国中医科学院,2018.

[10] ZHENG SP, CHEN YX, ZHENG SJ, et al. Inhibition of Mastermind-like 1 alleviates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018,243(14):1099-108.

[11] 董天慧,孙建梅,姚舜,等.波动性高糖对糖尿病视网膜病变的作用研究进展[J].安徽医药,2019,23(8):1485-8.

[12] 苏萌,白惠玲,孔宝焕,等.二甲双胍改善糖尿病视网膜病变机制研究进展[J].中国临床药理学杂志,2019,35(14):1530-2.

[13] GU J, CHEN Y, TONG L, et al. Astaxanthin-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles (ATX-LPN): assessment of potential otoprotective effects [J]. J Nanobiotechnology, 2020, 18(1):53.

[14] SUN K, LUO JH, JING XZ, et al. Astaxanthin protects against osteoarthritis via Nrf2: a guardian of cartilage homeostasis[J]. Aging (Albany NY), 2019,11(22):10513-31.

[15] WU D, XU H, CHEN JY, et al. Effects of astaxanthin supplementation on oxidative stress[J]. Int J Vitam Nutr Res, 2020, 90(1-2):179-94.

[16] 陈维维.基于Nrf2信号通道研究芹菜素对氧化损伤小鼠视网膜的保护作用[D].南京:南京中医药大学,2017.

[17] PARAVANI EV, SIMONIELLO MF, POLETTA GL, et al. Cypermethrin: Oxidative stress and genotoxicity in retinal cells of the adult zebrafish[J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2018,826:25-32.

[18] LIU LH, ZUO ZF, LU SJ, et al. Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF-κB activation in vivo and in vitro[J]. Iran J Basic Med Sci, 2017,20(7):813-21.

[19] ANUKULTHANAKORN K, PARHAR IS, JAROENPORN S, et al. Neurotherapeutic effects of pueraria mirifica extract in early- and late-stage cognitive impaired rats[J]. Phytother Res, 2016, 30(6):929-39.

[20] 董志军,陈志宏,李玲娜,等.丝胶对糖尿病大鼠视网膜氧化应激和微炎症状态的改善作用[J].眼科新进展,2018,38(3):218-21.

(本文编辑:蒋湘莲)