

熊胆引流液对糖尿病大鼠视网膜氧化损伤的影响

郭健^{1,2}, 徐国兴², 王婷婷², 吴松一², 许建斌²

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(No. 60827002); 中国福建省卫生厅中医药科研重点课题资助项目(No. wzyyb0905); 中国卫生部科研课题资助项目(No. WKJ2005-2-013)

作者单位:¹(350003)中国福建省福州市,福建中医学院研究生院;²(350005)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院眼科中心 福建省眼科研究所

作者简介:郭健,博士研究生,研究方向:中西医结合眼科。

通讯作者:徐国兴,教授,博士研究生导师,研究方向:中西医结合眼科。zjfmuxgx@pub5.fz.fj.cn

收稿日期:2010-05-17 修回日期:2010-06-02

Effect of drainage Fel Ursi on the retinal oxidative damage in streptozocin-induced diabetic rats

Jian Guo^{1,2}, Guo-Xing Xu², Ting-Ting Wang², Song-Yi Wu², Jian-Bin Xu²

Foundation items: National Natural Science Research Foundation of China (No. 60827002); Key Science Research Foundation of Chinese Indigenous Medicine of Fujian Health Department, China (No. wzyyb0905); Project of Scientific Research of Ministry Health, China (No. WKJ2005-2-013)

¹Traditional Chinese Medical College, Fuzhou 350003, Fujian Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Guo-Xing Xu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. zjfmuxgx@pub5.fz.fj.cn

Received:2010-05-17 Accepted:2010-06-02

Abstract

• **AIM:** To study the therapeutic effect of drainage Fel Ursi (DFU) on retinal oxidative damage in streptozocin-induced diabetic rats.

• **METHODS:** The changes of body weight, blood glucose, retinal ultrastructure, SOD and MDA among the normal SD rats, diabetic rats and diabetic rats therapied by DFU were compared.

• **RESULTS:** There were mitochondrion changes, cell degeneration and apoptosis of retinal neurones and neuroglia cells in the diabetic rats retina. Compared with the control group, the SOD decreased significantly ($P < 0.05$), the MDA increased significantly ($P < 0.05$). However, the body weight and blood glucose had the same changes between the therapic group and diabetic rats group.

• **CONCLUSION:** DFU can relieve the retinal cells mitochondrion pathological changes, prevent the cells apoptosis, block up the process of the pathological changes of the retinal blood vessel.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; drainage Fel Ursi; ultrastructure; SOD; MDA

Guo J, Xu GX, Wang TT, et al. Effect of drainage Fel Ursi on the retinal oxidative damage in streptozocin-induced diabetic rats. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(6):1044-1046

摘要

目的:研究熊胆引流液对糖尿病大鼠视网膜氧化损伤的保护作用。

方法:STZ 诱导糖尿病 SD 大鼠模型,治疗组给予引流熊胆液灌胃,观察血糖、体质量变化和 24wk 视网膜组织 SOD 和 MDA 水平及超微结构改变。

结果:糖尿病大鼠视网膜 SOD 水平下降,MDA 水平上升,病理改变主要是三级神经元和神经胶质细胞的线粒体病变和细胞的变性、凋亡。引流熊胆液组与糖尿病模型组对比体重和血糖没有改变,而视网膜 SOD 水平升高,MDA 水平降低,超微结构病变明显减轻。

结论:引流熊胆液可以下调高血糖视网膜的氧化应激水平,减轻线粒体的病理改变,阻止神经细胞凋亡。

关键词:糖尿病视网膜病变;引流熊胆液;超微结构;超氧化物歧化酶;丙二醛

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.06.007

郭健,徐国兴,王婷婷,等.熊胆引流液对糖尿病大鼠视网膜氧化损伤的影响.国际眼科杂志 2010;10(6):1044-1046

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病患者致盲的首要原因,近年来的研究表明视网膜三级神经元和神经胶质细胞线粒体氧化损伤^[1]可能是 DR 发生发展的启动因素。熊胆是传统名贵中药材,现代药理学研究发现熊胆具有抗氧化作用^[2]。我们应用熊胆引流液(drainage Fel Ursi, DFU)干预链脲佐菌素(streptozocin, STZ)糖尿病大鼠,观察视网膜超微结构的改变和 SOD,MDA 水平改变,为临床应用 DFU 治疗 DR 提供动物实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 25 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,体质量 250 ± 25 g,取尾静脉血测血糖(One touch II 强生血糖测定仪) ≤ 6.75 mmol/L^[3],外眼和眼底检查未发现病变;饲养于福建医科大学实验动物中心啮齿类 SPF 级实验室。链脲佐菌素(streptozocin, STZ, Sigma)溶于 0.1mol/L, pH 4.4 的无菌枸橼酸-枸橼酸盐缓冲液,使用前临时配制成 10g/L 溶液。总 SOD 活性检测试剂盒和脂质氧化(MDA)检测试剂盒购于南京建成生物研究所。

1.2 方法 将 SD 大鼠随机分为糖尿病(diabetes mellitus, DM)组 18 只和空白组 7 只,适应性饲养 1wk,造模前禁食 10h,DM 组左下 ip 10g/L STZ 溶液(65mg/kg);对照组 5

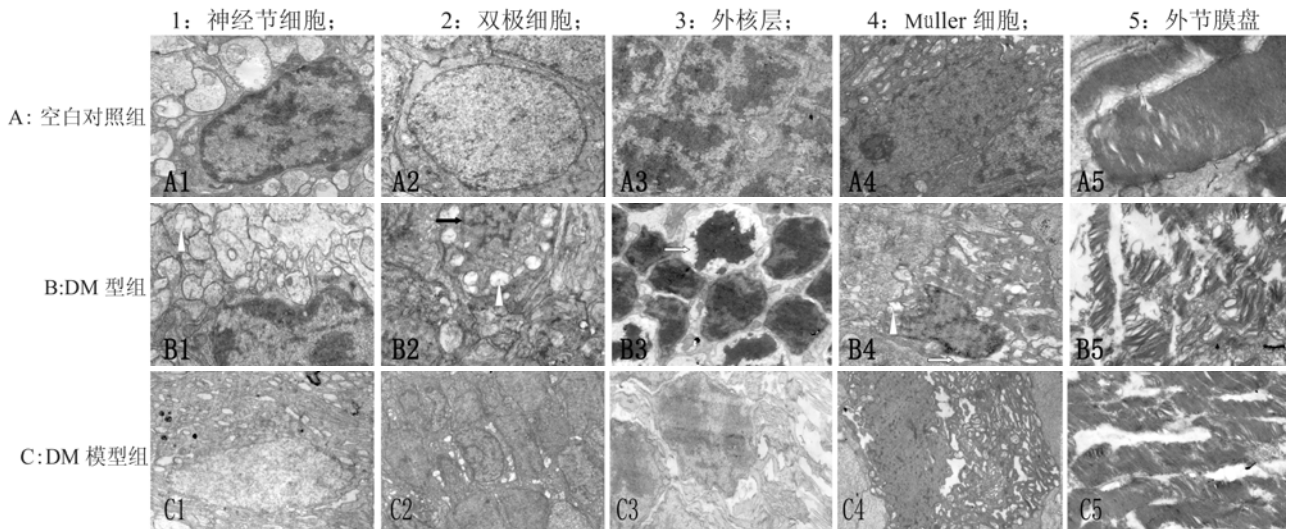


图1 大鼠视网膜超微结构改变(TEM×8 000)。

表1 实验大鼠体质量,血糖,SOD 和 MDA 变化表

($\bar{x} \pm s$)

分组	体质量(g)		血糖(mmol/L)		SOD (mkat/g)	MDA(kmol/g)
	治疗前	取材前	治疗前	治疗后		
空白对照	281.0 ± 11.8	564.9 ± 38.6	4.97 ± 0.75	4.84 ± 0.60	171.51 ± 4.79	4.12 ± 0.43
DM 模型	283.7 ± 10.1	254.3 ± 31.2 ^a	23.01 ± 2.44 ^b	27.49 ± 2.79 ^b	129.70 ± 6.97 ^a	8.23 ± 0.43 ^a
DFU 治疗	286.8 ± 14.3	259.90 ± 32.9 ^a	23.21 ± 3.21 ^b	27.05 ± 2.94 ^b	178.59 ± 3.46 ^{a,c}	4.49 ± 0.31 ^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs空白对照组; ^c $P < 0.05$ vsDM 组。

只注射同等剂量的枸橼酸-枸橼酸盐缓冲液;72h 后取尾静脉测血糖, ≥ 16.7 mmol/L 者于 1wk 后再次测血糖仍 ≥ 16.7 mmol/L 者为造模成功。14 只随机分为 2 组,DM 模型组和 DFU 治疗组。每天清晨 DFU 治疗组给予过滤后的纯液体 0.5mL 灌胃,DM 模型组给予生理盐水 0.5mL 灌胃。每 4wk 测一次体质量和血糖。给药 24wk 后,取尾静脉测血糖后 ip 戊巴比妥钠 60mg/kg,30g/L 戊二醛心脏灌流,迅速摘除眼球,取视网膜组织。分别行透射电镜观察和 SOD,MDA 水平检测。

1.2.1 透射电镜观察 将视网膜切成 1.5mm × 3.0mm 长方形小片,固定于 30g/L 戊二醛-15g/L 多聚甲醛液中过夜,10g/L 锇酸-15g/L 亚铁氰化钾后固定 1.5h,PBS 漂洗;700mL/L 乙醇饱和醋酸铀染液块染,乙醇-丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋剂包埋。超薄切片 80nm,醋酸铀、柠檬酸铅各染色 5min;在飞利浦 EM 208 型透射电镜下观察、摄影。

1.2.2 视网膜 SOD 和 MDA 水平检测 将视网膜组织加入 4℃ 预冷的生理盐水,漂洗两遍,按 1 : 9 体积加入 4℃ 生理盐水,匀浆,2 000r/min 离心 10min,取上清液 40μL,按试剂盒说明书步骤检测。

统计学分析:采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,血糖值用($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体质量和血糖变化 DM 模型组和 DFU 治疗组大鼠体质量与空白对照组比较差异均有显著性($P < 0.01$,表 1),而 DM 模型组和 DFU 治疗组之间大鼠体质量的差异无显著性($P > 0.05$)。DM 模型组和 DFU 治疗组大鼠治疗前后的血糖与空白对照组比较差异均有显著性($P < 0.01$,表 1),而 DM 模型组和 DFU 治疗组之间治疗前后血糖的差异均无显著性。

2.2 大鼠视网膜超微结构改变 空白对照组大鼠视网膜超微结构正常。DM 模型组大鼠视网膜三级神经元和神经胶质细胞线粒体数量减少,嵴肿胀、断裂、减少,部分线粒体呈圆形空泡状。细胞核核膜不连续,异染色质增多,染色质边集,核周间隙扩大。部分双极细胞核皱缩、碎裂。Müller 细胞体积增大,胞质疏松,核周间隙扩大。外节膜盘排列紊乱,层次结构不清,内节椭圆内线粒体减少、嵴呈空泡状。其间的 Müller 细胞微绒毛减少,排列紊乱。少数微血管周细胞表现为核异染色质增多边集,核膜不连续,血管内皮细胞和基底膜未见明显改变。DFU 治疗组大鼠视网膜神经节细胞、感受器细胞未见明显异常,双极细胞和 Müller 细胞表现为部分线粒体嵴变短、减少,细胞核未见异常改变(图 1)。

2.3 视网膜 SOD 和 MDA 水平 DM 大鼠视网膜 SOD 活力下降,MDA 水平升高;DFU 组与 DM 组比较,SOD 活力升高,MDA 水平明显下降,差异均有显著性($P < 0.05$,表 1)。

3 讨论

DR 的发病机制目前尚不清楚,2005 年,Brownlee^[4] 提出了 DM 并发症发病的统一机制学说,认为所有的 DM 并发症的发病机制都源于一条唯一的途径,即高血糖诱导的线粒体电子传递链产生过量的超氧化物。多元醇途径,PKC 的激活,细胞内 AGE 前体的生成和氨基己糖途径的激活等既往研究的发病途径都是线粒体活性氧增加的结果。我们对比观察 DM 动物模型和 DFU 抗氧化治疗 DM 大鼠视网膜的超微结构改变和氧化损伤指标的变化情况,寻找有效的抗氧化治疗药物,以阻断病变向视网膜血管改变发展。观察 DM 大鼠视网膜超微结构发现,视网膜三级神经元和神经胶质细胞的最突出的共同性改变就是线粒体的数量、大小、形态的变化。内核层和内丛状层可见许多巨大线粒体,神经轴突、光感受器内节

等位置的线粒体数量明显减少,形态变化表现为嵴变短、断裂、数量减少,部分嵴肿胀呈烧杯样,严重者整个线粒体呈空泡样改变。说明线粒体的改变在DR发病机制中的重要作用。视网膜SOD活力的降低和MDA水平的升高也证实了氧化应激在视网膜神经组织病变中发挥的重要作用。

DFU是我国传统的名贵中药材,现代药理学研究发现,DFU具有清除体内多余的自由基^[5]和提高抗氧化酶活力^[2]的功效。本实验DFU治疗组和糖尿病模型组治疗前的血糖没有显著差异,表明两组具有可比性,而治疗后的血糖和体质量两组间也没有显著性差异,表明DFU对本组动物没有降低血糖、控制DM的作用。因此,我们可以排除DFU通过降低血糖、控制糖尿病的方式发挥间接的控制DR发生、发展的作用。本实验超微结构观察发现,DM动物模型第24wk时几乎所有的视网膜神经组织均出现不同程度的病变,表现为神经节细胞、光感受器细胞、双极细胞和神经胶质细胞的线粒体形态、数量改变,细胞核异染色质增加、分布不均,轴突中突触小泡减少,其中以双极细胞、光感受器细胞和Müller细胞的改变最显著,与Pamela等的研究类似^[6]。DFU治疗组视网膜神经节细胞、光感受器细胞均未见明显的病理改变,双极细胞和Müller细胞的胞质中可见少量、轻度的线粒体改变,如嵴的变短、减少等,其病变程度较DM模型组明显减轻,说明DFU可以减轻DM造成的视网膜神经组织的病变,作用机制是通过发挥其抗氧化能力减轻DM造成的神经组织线粒体氧化损伤。我们发现,在视网膜神经组织出

现明显广泛病变的情况下,微血管只有个别周细胞表现出早期的病理改变,而血管内皮细胞和基底膜均无明显病变。进一步证实了DM对视网膜的影响,神经组织病变早于血管性病变。

综上所述,DM早期的视网膜病变主要在各级神经元和神经胶质细胞,表现为线粒体的数量、形态改变和细胞的凋亡,血管性改变较少而且程度轻。说明DM可能通过线粒体途径诱导神经细胞凋亡从而启动DR的发生。本研究发现DFU可以明显减轻线粒体的病理改变,阻止神经细胞凋亡,有望用于早期DM的视网膜神经细胞保护。

参考文献

- 1 Nishikawa T. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404(6):787-790
- 2 宋巧梅. 熊胆粉对D-半乳糖致衰小鼠抗衰老作用机制研究. *江苏中医药* 2006;27(8):57-58
- 3 林健,郑丽红,陈润,等. SD大鼠血液生化指标正常参考值范围的探讨. *医学动物防制* 2005;21(5):321-322
- 4 Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615-1625
- 5 金光显,任香善,林贞花,等. 熊胆冻干粉针剂对缺氧-再复氧损伤血管内皮细胞的保护作用. *时珍国医国药* 2006;17(10):1972-1973
- 6 Mratin PM, Roon P, Van Ells TK, et al. Death of retinal neurons on streptozocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(9):3330-3336