

葛根素对糖尿病视网膜病变中 Bcl-2 表达的影响

姚 鹏, 杨惠婷, 滕 岩, 刘海峰, 遇 颖, 杨明明

作者单位:(157011) 中国黑龙江省牡丹江市, 牡丹江医学院附属红旗医院眼科

作者简介:姚鹏, 硕士, 医师, 研究方向:眼底病。

通讯作者:杨惠婷, 硕士, 医师, 研究方向:眼眶病. huiting9741@sina. com

收稿日期:2011-01-13 修回日期:2011-04-08

Effect of puerarin on expression of Bcl-2 in the retina of diabetic rats and the possible mechanism

Peng Yao, Hui-Ting Yang, Yan Teng, Hai-Feng Liu, Ying Yu, Ming-Ming Yang

Department of Ophthalmology, Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Hui-Ting Yang. Department of Ophthalmology, Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China. huiting9741@sina. com

Received: 2011-01-13 Accepted: 2011-04-08

Abstract

• AIM: To investigate the effect of puerarin on apoptosis expression of Bcl-2 in the retina of diabetic rats and the possible mechanism of puerarin.

• METHODS: Totally 60 male Wister rats were selected and divided at random into 3 groups: normal group, diabetic group and diabetic with puerarin injection group. The diabetic retinopathy rats model was established by injecting streptozotocin (STZ). The pathogenic changes of diabetic retinopathy were observed and a quantitative analysis was given to Bcl-2 with RT-PCR at month 1, 3 and 5, the data were analyzed with software SPSS 13.0.

• RESULTS: Bcl-2 expressed in the retina of the normal rats. When at month 3, the expression of Bcl-2 was remarkably increased in diabetic group by puerarin injecting comparing with diabetic group ($P < 0.05$), while at month 5, the expression of Bcl-2 was increased in the two groups. The pathologic damage in the retina of diabetic groups by puerarin injecting was slighter than diabetic groups.

• CONCLUSION: Puerarin can alleviate the retinal pathological damage of diabetic rats. At month 3, Bcl-2 is expressed higher in the diabetic model by puerarin injecting than the diabetic group. Puerarin can increase the process of diabetic retinopathy by restraining the

expression of Bcl-2. Consequently, puerarin will probably become the effective medicine to cure diabetic retinopathy.

• KEYWORDS: puerarin; diabetic retinopathy; Bcl-2; apoptosis; mechanism

Yao P, Yang HT, Teng Y, *et al.* Effect of puerarin on expression of Bcl-2 in the retina of diabetic rats and the possible mechanism. *Gujie Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(5):788-791

摘要

目的:通过分析凋亡细胞及凋亡通路中的关键因子 Bcl-2 表达的变化,阐明葛根素抗凋亡的作用和机制。

方法:取成年健康大鼠 60 只,随机分为空白对照组、糖尿病 (DM) 组和 DM 葛根素干预组,ip 链脲佐菌素建立 DM 大鼠视网膜病变模型,3mo 时处死大鼠观察各组视网膜组织病理变化,并应用 RT-PCR 对 Bcl-2 进行定量分析。

结果:DM 大鼠 HE 染色可见神经节细胞减少,内外颗粒层平均光密度减低,有空泡形成,细胞排列紊乱稀疏。葛根素干预组细胞结构好转,未见空泡。RT-PCR 可见 Bcl-2 在葛根素干预组表达明显高于正常组和 DM 组 ($P < 0.05$)。结论:葛根素可改善视网膜组织病理学变化,并增强 Bcl-2 的表达。

关键词:葛根素;糖尿病视网膜病变;Bcl-2;细胞凋亡;凋亡机制

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.05.012

姚鹏,杨惠婷,滕岩,等. 葛根素对糖尿病视网膜病变中 Bcl-2 表达的影响. 国际眼科杂志 2011;11(5):788-791

0 引言

糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病 (DM) 常见的并发症,是成年人致盲的最重要原因。有关 DR 早期周细胞减少现象与周细胞凋亡的关系已有文献报道。细胞凋亡在糖尿病视网膜病变 (DR) 发病机制中至关重要。DR 最先出现的早期特征性改变是周细胞缺失,这可能是 DR 发生的启动因素。周细胞缺失的性质为细胞凋亡,周细胞的凋亡主要是由于活性氧 (ROS) 增加从而启动内源性凋亡通路。葛根素 (puerarin, Pue) 具有明显的抗凋亡作用,其作用机制可能与增加抗凋亡因子 Bcl-2 表达^[1-4]有关。但 Pue 对于 DR 抗凋亡作用和机制尚不清楚。我们构建 DR 动物模型,采用 Pue 干预,通过定性和定量分析凋亡细胞及其凋亡通路中的关键因子变化,阐明 Pue 抗凋亡的作用和机制,对 Pue 临床治疗 DR 提供科学依据。

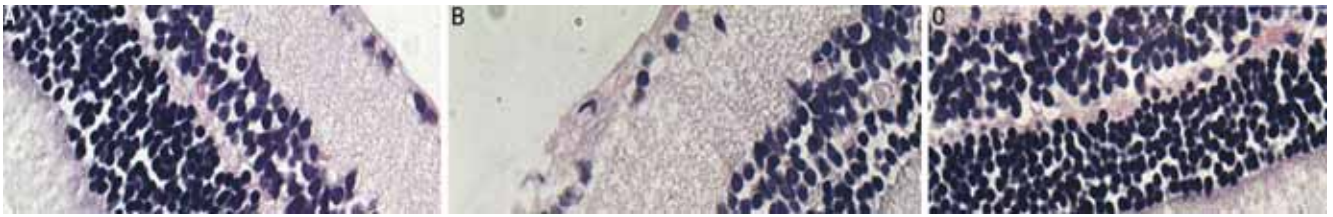


图1 大鼠视网膜病理变化(HE ×600) A:对照组;B:DM组;C:Pue 干预组。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康 Wistar 大鼠 60 只,雄性,10 月龄,视网膜已发育成熟,由哈尔滨医科大学附属第一临床医学院提供。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma 公司), Pue 注射液(沈阳格林制药有限公司), PCR 引物(南京金思特有限公司)。引物 Actin: 上游 5'-GTAAAGACCTCTATGCC AACA-3'; 下游 5'-CCTGAGTAGCATGAGGACGA-3'。Bcl-2 上游 5'-CGGGAGAACAGGGTATGA-3'; 下游 5'-GTCCGACC TTCCTTCTTA-3'。PCR 所用试剂(Promega 公司): Taq 酶, dNTP, oligo (dT), M-MLV, RNasinDEPC, Trizol, 第一链 cDNA 合成试剂盒。Leica 光学照像显微镜(日本), PCR 扩增仪和紫外分光光度仪(美国), 多功能紫外透射反射仪(美国)。

1.2 方法 成年健康 Wistar 大鼠 60 只。随机分为对照组、DM 组、Pue 干预组。每组 20 只。建立 DM 大鼠模型: 所有大鼠适应性喂养 1wk 后, 禁食水 12h, 按 60mg/kg STZ ip 以诱发 DM; 对照组仅注射相同体积的枸橼酸钠缓冲液。72h 后在大鼠尾静脉采血, 用血糖仪检测血糖浓度, 凡空腹血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L, 尿量及饮水量均明显增多者视为造模成功的 DM 大鼠。实验期间正常饮食, 定期测量血糖。Pue 干预组每天定时 ip Pue 80mg/kg。造模成功后, 于相应时间点用过量戊巴比妥钠麻醉处死大鼠, 迅速摘除眼球。每只大鼠 1 眼去除眼前节, 剥离视网膜组织, 迅速放于液氮罐内, 置 -80℃ 冰箱保存备用, 进行 RT-PCR 检测。另 1 眼固定于甲醛液行组织石蜡包埋、切片, 行组织病理学 HE 染色。Leica-Q550IW 计算机多功能真彩色病理图像分析系统定量分析, 由光学显微镜放大 640 倍, 通过位于显微镜上的摄像机摄取图像到计算机屏幕视窗内, 经灰度变换将阳性染色与背景分开进行自动测量, 在计算机图像分析系统屏幕上计算每例铺片 20 个随机、不重叠视野相同固定面积细胞计数取其平均值, 作为该例铺片单位面积的细胞数。另提取 RNA 测量 RNA 浓度, 逆转录成 cDNA。向处理过的 PCR 管中, 加入第 1 链 cDNA 1 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, dNTP 1.6 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, r Taq 酶 0.1 μ L。加入适量的 ddH₂O, 使总体积达 20 μ L。轻轻混匀, 离心。扩增 28 ~ 35 个循环。94℃ 10min, 94℃ 30s, 退火温度 30s, 72℃ 45s, 同时扩增内参 DNA, 作为对照。取最终反应产物 8 μ L 点样到 20g/L 的琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭(EB) 1.6 μ L 显色, 电压 100V 30min 后在多功能紫外透射仪下观察结果在 100 ~ 200bp 出现条带者为阳性, 且用 1000Marker 分子大小对照阳性条带。采用凝胶图像分析系统, 对电泳条带进行密度扫描。

表 1 葛根素对糖尿病大鼠体质量及血糖的影响

分组	体质量(g)	血糖(mmol/L)
对照组	305.41 \pm 0.26	5.26 \pm 0.05
DM 组	187.11 \pm 0.56	24.62 \pm 0.46
Pue 干预组	255.05 \pm 0.54 ^b	20.85 \pm 0.17 ^b

^b P < 0.01 vs 对照组和 DM 组。

表 2 DM 大鼠 Pue 干预视网膜 Bcl-2 表达 ($\bar{x} \pm s, A, n = 10$)

分组	Bcl-2 值	Actin 值	Bcl-2/actin
对照组	135469 \pm 125	167565 \pm 137	80.8
DM 组	110065 \pm 132	166206 \pm 132	66.2 ^a
Pue 干预组	215462 \pm 131	165286 \pm 136	130.4

^a P < 0.05 vs 对照组和 Pue 干预组。

统计学分析: 采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。数据呈正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 两样本间比较用 SNK-q 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态 对照组: 大鼠的毛色光滑柔软, 饮食, 饮水及尿量均正常, 体质量随着周龄增大而增加, 血糖正常。DM 组: 大鼠的毛色萎黄, 行动迟缓, 每天饮水, 饮食及尿量明显增加, 体质量随病程表现为渐降低的趋势。Pue 干预组: 大鼠的毛色有光泽, 行动较敏捷, 体质量及血糖改变均不如 DM 组明显(表 1)。

2.2 视网膜病理 HE 染色 对照组大鼠视网膜组织结构与人视网膜组织结构相似, 内界膜清楚, 神经纤维层较稀疏, 水平排列, 较规整; 节细胞呈单层排列, 胞核较大, 呈圆形或椭圆形, 染色较淡, 排列整齐; 内网状层较厚、疏松, 呈较明显的网状结构; 内核层由 3 ~ 5 层细胞构成, 胞核较大, 染色稍深; 外网状层明显薄于内网状层; 外核层较厚, 由 8 ~ 10 层细胞组成, 胞核较小, 染色深, 排列较紧密; 外界膜边界清楚、整齐(图 1A)。DM 组 3mo 时鼠视网膜节细胞层及内外核层水肿可见, 空泡样变, 颗粒层变薄, 细胞稀疏排列紊乱, 内外颗粒层界线不清楚(图 1B)。Pue 干预组: Pue 干预组 3mo 视网膜各层细胞排列整齐, 细胞形态正常, 各层分界清楚, 内颗粒层和外网状层可见少许空泡形成(图 1C)。经 Leica-Q550IW 计算机多功能真彩色病理图像分析系统定量分析, 三组的神经节细胞数比较, DM 组明显少于 Pue 干预组, 二者比较有统计学差异(P < 0.05)。对照组和 Pue 干预组比较无统计学差异。

2.3 Bcl-2 的表达 在 Mr 为 100 ~ 200bp 处可见清晰蛋白条带, 即 Bcl-2 条带; 在 300 ~ 400bp 处可见 actin 内参照。

正常组 Bcl-2/actin 比值为 98.7%, DM 组为 66.22%, Pue 组为 130.35% (表 2)。

3 讨论

糖尿病性视网膜病变是 DM 常见的并发症,是成年人致盲的最重要原因^[1]。DR 的发病率直接与人群 DM 的发病情况相关,随着 DM 发病率的增加,预计到 2010 年在我国 DM 患者将有 5000 万,DR 患者将有 1000 余万,所以防治 DR 可谓刻不容缓。DR 的发病机制比较复杂,一般认为是由于视网膜微血管系统受损所致,包括毛细血管周细胞的丧失,内皮细胞增生,基底膜增厚,毛细血管通透性增高,血管闭塞,新生血管形成等,最终导致纤维增生^[5]。按是否发生新生血管可将 DR 分为:非增殖型(也称单纯型或背景型,NPDR)与增殖型(PDR)。病变过程从非增殖型向增殖型发展。微循环障碍是其病理基础,纤维化增生是其最终结局。DR 发病机制极为复杂,细胞凋亡是近年来关注的又一热点。由 DM 引起的细胞凋亡有 3 种途径:(1)有线粒体介导的内源性细胞凋亡激活途径;(2)由死亡配体和死亡受体结合的外源性细胞凋亡激活途径;(3)由内质网介导的细胞凋亡激活途径。我们对 DM 肾病 DR 的发生发展与视网膜毛细血管内皮细胞、周细胞、神经细胞的凋亡有着密切的联系。凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 在早期 DM 大鼠视网膜血管和神经细胞的表达随病程的进展逐渐增强,二者在 DM 视网膜细胞凋亡中起到重要作用。醛糖还原酶(AR)在早期 DR 发病机制中起着主要作用,引起了一系列视网膜损害,包括周细胞(pericytes, PC)丢失,视网膜神经细胞凋亡,神经胶质再激活以及新生血管形成等。周细胞的凋亡是 DR 的早期事件。PC 的凋亡被认为是持续高血糖的结果。研究发现在高糖状态下培养周细胞 7d,发现细胞凋亡显著。为进一步检查软脂酸浓度的升高对 DR 细胞凋亡的影响,有人用 0.4mmol/L 软脂酸培养 24h 周细胞,观察视网膜细胞的氧化应激及细胞凋亡的情况,结果发现软脂酸诱导的 PC 细胞凋亡与 NADH 氧化酶、NF-Kb 激活及神经酰胺的增多有关,这些分子之间的更精确的关系有待进一步的研究。另外 DR 患者的结构性视网膜胰岛素受体 AKI 信号传导通路逐渐受到损伤,这种变化是通过 AKI 激酶的激活而引起,并暗示信号传导通路的丧失多发生在 DR 初期阶段。

Bcl-2 基因是一原癌基因,能抑制细胞凋亡。但近年研究发现,存在有 Bcl-2 敏感和不敏感的细胞凋亡现象。Bcl-2 抑制细胞凋亡的机制目前仍然不清,大多认为与 Bcl-2 的细胞内抗氧化作用及抑制钙离子的跨膜运动有关。Bcl-2 基因具有抑制凋亡的作用,并用近年来的一些研究已开始揭示这一作用的机制。目前已经发现的 Bcl-2 蛋白家族按功能可分为两类,一类是象 Bcl-2 一样具有抑制凋亡作用,如哺乳动物的 Bcl-X1, Bcl-W, Mcl-1, A1, 线虫 Ced-9, 牛痘病毒 E1B119kD 等,而另一类具有促进凋亡作用,如 Bax, Bcl-Xs, Bad, Bak, Bik/Nbk Bid/Harakiri。Bcl-2 可以抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞死亡。Bcl-2 的过度表达能增强所观察细胞对大多数细胞毒因素的抵抗性。这一发现使人们认识到凋亡的各种信号转导途径有一个共同的通路或交汇点,而该通路或交汇点受

Bcl-2 调节。实验表明,Bcl-2 可增强细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗性,抑制大多数化疗药物所引起的靶细胞凋亡,但其本身并不能抑制这些因素对细胞的损伤;同样地,它也不能促进 DNA 修复。p53 蛋白是 DNA 损伤的一个分子传感器,已证实 Bcl-2 能抑制 p53 介导的凋亡,但不能抑制 p53 向核内转位或者 p53 介导的生长停滞,可能 Bcl-2 的作用是在 DNA 损伤后,阻止激活凋亡机制的信号到达其靶分子;在细胞毒性 T 细胞中,由颗粒酶 B 激活 caspases 家族的一个或多个半胱氨酸蛋白酶所诱导的凋亡不依赖于 Bcl-2, 颗粒酶 B 可能仅作用于凋亡途径中 Bcl-2 调节位点的下游。以上结果表明在凋亡途径中 Bcl-2 的作用位点在信号分子和效应蛋白酶之间的位置。虽然 Bcl-2 蛋白存在于线粒体膜、内质网膜以及外核膜上,但主要定位于线粒体外膜,它拮抗促凋亡蛋白的功能。而大多数促凋亡蛋白则主要定位于细胞质,一旦细胞受到凋亡因子的诱导,它们可以向线粒体转位,通过寡聚化在线粒体外膜形成跨膜通道,或者开启线粒体的 PT 孔,从而导致线粒体中的凋亡因子释放,激活 caspase,导致细胞凋亡。

Pue 是中药葛根中提取的有效成分中的主要成分,属于异黄酮类,化学名为 8-β-D 吡喃葡萄糖-4'7'-二羟异黄酮甙。其主要作用包括:扩展冠状动脉和脑血管,降低心肌耗氧量,改善微循环,抗血小板聚集,清除氧自由基和抗脂质过氧化,促进细胞代谢,可降低 DM 主动脉结缔组织生长因子(CTGF)mRNA 过度表达。Pue 能有效抑制视网膜新生血管形成,对缺氧造成的视网膜超微结构的损害具有一定的保护作用。Pue 对 AGE 诱导 CAM 新生血管的生长具有一定的抑制作用^[6]。Pue 抑制 CoCl₂ 诱导的人 RPE 细胞缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)的表达,可能是治疗 DR 新策略,Pue 有望进一步用于 DR 药物治疗的研究。近年来,关于 Pue 抗细胞凋亡的作用引起人们普遍关注。经过对脑、心血管、肺、肾等方面进行的大量实验研究表明,Pue 对于缺血、缺氧、H₂O₂ 引起的损害有很强的抗凋亡作用,其抗凋亡作用是通过抗氧化降低 ROS,抑制 Bax, Fas, caspase-3 等促凋亡因子的表达,上调抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达^[1-4]。我们对 Pue 在眼科的基础及临床大量研究证实:其具有改善视网膜微循环障碍,缩短视网膜微循环时间,对于视网膜动、静脉阻塞,前部缺血性视神经病变,DR 和高度近视均有一定的治疗作用。对于视网膜脱离术后视功能有保护和改善作用。对于视网膜动脉阻塞的血液流变学和视网膜电图振荡电位(OP)有改善作用^[7,8]。已有研究表明高度近视和视网膜脱离导致的视功能损害主要与视网膜的细胞凋亡有关。所以,我们认为,Pue 对于 DR 防治,除了通过改善视网膜微循环,抑制缺氧诱导因子(HIF)-1α 的表达,抑制新生血管等作用外,其抗凋亡作用是防治 DR 的主要作用之一。其作用机制可能是通过抗氧化作用,上调抗凋亡因子 Bcl-2 的表达,抑制内源性凋亡通路。

目前,对于 DR 的治疗主要是针对抑制其新生血管形成,控制视网膜增殖病变。DR 与细胞凋亡之间的关系逐渐显露,提示细胞凋亡对 DM 视网膜病变早期神经细胞和周细胞丧失,中期无细胞毛细血管和非灌注区的形成,以

及晚期内皮细胞增生均有重要影响。那么利用细胞凋亡的调控机制,延缓或逆转细胞凋亡,以达到防治 DR 的目的是有可能的。本实验通过建立 DM 大鼠模型,观察 DM 大鼠早期视网膜病变,对 DM 视网膜病变早期周细胞发生凋亡进行干预,证明早期 Pue 对 DM 视网膜病变的防治作用,阐明 Pue 抗凋亡的作用和机制,对 Pue 临床治疗 DR 提供科学依据。

参考文献

- 1 朱蕾,何丽娅. 葛根素对大鼠脑缺血再灌注后凋亡相关蛋白的影响. 中华实用中西医杂志 2004;4(8):1120-1121
- 2 李华,柳忠兰. 葛根素对烟熏大鼠脑细胞凋亡及 Fas 蛋白表达的影响. 中国神经免疫学和神经病学杂志 2004;1(4):57-58

- 3 吴青,周祖玉,陶大昌. 葛根素预处理对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响. 基础医学与临床 2005; 25(2):147-151
- 4 石瑞丽,张建军. 葛根素对缺氧性血管内皮细胞凋亡的保护作用. 药理学学报 2003;38(2):103-107
- 5 Morley JE. Diabetes and aging: epidemiologic overview. *Clin Geriatr Med* 2008;24(3):395-405
- 6 茅彩萍,顾振纶,曹莉,等. 葛根素对 AGEs 诱导 CAM 新生血管生成影响的实验研究. 中国药理学报 2005; 21(4):420
- 7 李凤花,孟瑞华. 葛根素对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用. 临床眼科杂志 2007;15(2):165-168
- 8 滕岩,李丽,董丽,等. 多焦 ECG 对葛根素提高视网膜术后视功能的疗效评价. 中国实用眼科杂志 2005;23(3):278

中国学术期刊影响因子年报(2010版) 耳鼻咽喉科学与眼科学(共24种)