

α -硫辛酸对糖尿病大鼠视网膜保护作用研究

符丽娟, 杨育红, 赵艳杰

基金项目: 中国辽宁省教育厅科研基金资助项目 (No. 2008404)
作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院药理教研室
作者简介: 符丽娟, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 糖尿病并发症。

通讯作者: 符丽娟. lyflj2010@126.com

收稿日期: 2011-04-06 修回日期: 2011-05-30

Protective effect of α -lipoic acid on diabetic retinopathy in rats

Li-Juan Fu, Yu-Hong Yang, Yan-Jie Zhao

Foundation item: Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department, China (No. 2008404)

Department of Pharmacology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Li-Juan Fu. Department of Pharmacology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. lyflj2010@126.com

Received: 2011-04-06 Accepted: 2011-05-30

Abstract

• AIM: To explore the mechanism of α -lipoic acid (α -LA) on the protection of diabetic retinopathy.

• METHODS: The streptozotocin (45mg/kg) was intraperitoneally injected to establish the diabetic model in 16 male SD rats as experimental group, model rats were divided into diabetes group and α -lipoic acid (α -LA) group, control group also was established. α -lipoic acid was given to treatment group at dose of 100mg/(kg · d) by gavage. At 12 weeks, the blood glucose, content of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione hormone (GSH), the activity of superoxide dismutase (SOD) were assayed. Retinal capillary trypsin digestion were prepared to observe the changes of capillary vessel. The immunohistochemistry was used to assess the expression of NF- κ B protein in retina.

• RESULTS: Compared with control group, the content of MDA, SOD and activity of GSH in diabetes group were significantly lower ($P < 0.05$). The number of pericytes and epithium cells decreased obviously and cell-free capillary increased ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B enhanced. Compared with diabetes group, the content of MDA decreased obviously while the content of SOD and activity of GSH increased significantly ($P < 0.05$) in α -lipoic acid group. The number of pericytes and epithium cells increased and cell-free capillary decreased obviously ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B attenuated ($P < 0.01$).

• CONCLUSION: The α -lipoic acid could inhibit the oxidative damage and activation of NF- κ B and protect

against diabetic retinopathy.

• KEYWORDS: α -lipoic acid; diabetic retinopathy; oxidative damage; NF- κ B

Fu LJ, Yang YH, Zhao YJ. Protective effect of α -lipoic acid on diabetic retinopathy in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(7):1147-1149

摘要

目的: 观察 α -硫辛酸 (α -lipoic acid, α -LA) 对糖尿病大鼠视网膜保护作用及相关机制。

方法: 链脲佐菌素 ip 制备糖尿病大鼠模型, 分为糖尿病组 (DM 组), α -LA 治疗组, 同时设立正常对照组 (NC 组)。治疗组 ip 给予 α -LA 100mg/kg, 1 次/d。12wk 时测定血糖, 以及各组大鼠血清丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性及还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量, 制备视网膜消化铺片, 检测视网膜微血管形态改变, 免疫组织化学方法检测视网膜 NF- κ B 蛋白表达变化。

结果: 与 NC 组相比, 糖尿病大鼠血清 MDA 含量明显升高, SOD 活性、GSH 含量降低 ($P < 0.05$), 视网膜微血管周细胞、内皮细胞减少, 无细胞毛细血管数目明显增多, 视网膜 NF- κ B 蛋白表达显著增强; 与 DM 组相比, α -LA 组大鼠 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$), SOD 活性、GSH 含量明显升高 ($P < 0.05$), 视网膜微血管周细胞、内皮细胞数目增多, 无细胞毛细血管数目减少, 视网膜 NF- κ B 蛋白表达明显减弱 ($P < 0.01$)。

结论: α -LA 可通过抑制氧化应激及视网膜 NF- κ B 活化, 对糖尿病视网膜病变起到一定保护作用。

关键词: α -硫辛酸; 糖尿病视网膜病变; 氧化损伤; NF- κ B

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 07. 006

符丽娟, 杨育红, 赵艳杰. α -硫辛酸对糖尿病大鼠视网膜保护作用研究. 国际眼科杂志 2011;11(7):1147-1149

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病常见的严重并发症之一, 高血糖、组织活性氧 (ROS) 等因素可诱导致炎性增生性细胞因子的产生, 引起视网膜血管通透性增加和新生血管形成, 导致视力损害^[1]。NF- κ B 是具有多向性调节作用的细胞因子, 在许多缺氧性视网膜病变的发生发展中起重要作用^[2]。 α -硫辛酸 (α -lipoic acid, α -LA) 为一种强抗氧化剂, 在抗氧化、糖代谢及多种疾病的治疗中越来越受到学者的关注^[3]。本实验通过建立糖尿病动物模型, 观察 α -LA 对糖尿病视网膜氧化应激水平及 NF- κ B 表达的影响, 探讨其对 DR 的防治作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, Sigma 公司)、 α -LA 注射液 (亚宝药业太原制药有限公司)。丙二醛 (MDA)、

表1 各组大鼠血清 SOD 活性和 MDA 及 GSH 含量变化 $\bar{x} \pm s$

分组	n	血糖 (mmol/L)	SOD (U/L)	MDA (nmol/L)	GSH (nmol/L)
NC	8	4.21 ± 1.07	121.6 ± 20.5	21.71 ± 4.76	17.76 ± 3.06
DM	8	20.28 ± 3.87 ^b	76.4 ± 17.1 ^b	43.85 ± 10.12 ^b	11.13 ± 2.09 ^a
α-LA	8	17.78 ± 4.52	106.2 ± 19.6 ^c	31.23 ± 6.41 ^d	15.38 ± 2.86 ^c

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs NC 组; ^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01 vs DM 组。

超氧化物歧化酶(SOD)及还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒(购自南京建成生物有限公司)。NF-κB 兔多克隆抗体(Santa Cruz 公司)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及分组 将24只SD大鼠随机分为3组,每组8只。16只大鼠以45mg/kg一次性左下腹ip 10g/L STZ 溶液,临用前用0.5mmol/L的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH 4.5)配制。另8只作为正常对照组(NC组)注入等量容积上述缓冲液。当天即让大鼠自由进食饮水。注射后72h测血糖及尿糖,将血糖浓度 > 16.7mmol/L,尿糖阳性者定为糖尿病大鼠模型。然后将糖尿病大鼠随机分为糖尿病组(DM组)、α-LA 治疗组。治疗组灌胃给予α-LA 100mg/kg,1次/d。饲养12wk。

1.2.2 标本收集 大鼠饲养到期后,200g/L乌拉坦ip麻醉,摘取每只鼠的双眼,去除其眼球前节,在显微镜下钝性分离眼视网膜组织,一眼视网膜组织甲醛固定、液体石蜡包埋,免疫组织化学检测视网膜组织NF-κB蛋白水平;另一眼视网膜组织放入Tris-HCl缓冲液(pH 7.8)溶解的30g/L Tyspin 溶液内,37℃温箱孵育3~4h,得到半透明血管网,将其移至载玻片上,自然干燥,入4℃冰箱保存备用。

1.2.3 血清MDA含量和SOD活性及GSH含量测定 12wk时颈动脉取血,室温放置分离血清。测定血清SOD活性、MDA和GSH含量,SOD测定采用黄嘌呤氧化酶法,MDA测定采用TBA比色法,GSH测定采用改良荧光法。

1.2.4 视网膜铺片PAS染色 将视网膜铺片入10g/L高碘酸溶液5min,蒸馏水洗后,入Schiff氏液15min,二硫化硫水洗3次,每次2min,蒸馏水洗,苏木素染核5min,乙醇分化,流水冲洗,逐级乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜下观察。每组取不同大鼠视网膜铺片5张,通过细胞图像分析仪,每张视网膜铺片从左起取5个视野,计数视网膜微血管周细胞、内皮细胞及无细胞毛细血管数目。

1.2.5 免疫组化法检测视网膜NF-κB蛋白表达 制作4μm厚的鼠视网膜组织切片,脱水,脱蜡,按SABC及DAB显色试剂盒步骤进行免疫组织化学染色,一抗为兔抗大鼠NF-κB单克隆抗体(1:50稀释),二抗为生物素化羊抗兔IgG(1:100稀释)以PBS代替一抗作阴性对照,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片。NF-κB表达以细胞核出现黄色或棕黄色颗粒为阳性,每张切片在阳性表达区域选择5个无重叠视野NF-κB p65,以平均计数阳性细胞核数所占视野所有细胞数目的百分比作为NF-κB表达率。

统计学分析:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 11.0软件进行统计学分析。采用one-way ANOVA 进行分析,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 大鼠一般状态及血糖水平变化 大鼠注射STZ后呈明显多饮、多尿症状,尿糖阳性。与NC组相比,病程12wk

表2 视网膜微血管周细胞和内皮细胞及无细胞毛细血管数目变化 $\bar{x} \pm s$

分组	周细胞	内皮细胞	无细胞毛细血管
NC	7.41 ± 0.82	24.73 ± 4.02	4.46 ± 1.2
DM	5.27 ± 0.66 ^a	19.52 ± 5.11 ^a	10.27 ± 1.95 ^b
α-LA	6.85 ± 0.8 ^c	22.85 ± 2.84 ^c	6.89 ± 3.17 ^d

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs NC 组; ^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01 vs DM 组。

时DM组及α-LA组大鼠血糖显著升高(*P* < 0.01),与DM组相比,α-LA组血糖无明显变化(*P* > 0.05,表1)。

2.2 α-LA对血清MDA含量和SOD活性及GSH含量的影响 与NC组相比,DM大鼠血清SOD活性、GSH含量明显下降,MDA含量明显升高;与DM组相比,α-LA组血清的SOD活性及GSH含量均升高,MDA含量明显降低(*P* < 0.05,表1)。

2.3 视网膜微血管变化 NC组正常视网膜毛细血管走行规则,内皮细胞核长呈椭圆形、染色较淡,周细胞核呈圆形、染色较深。12wk时,DM组视网膜周细胞及内皮细胞数减少,无细胞毛细血管数目增多。α-LA组视网膜周细胞及内皮细胞数目减少不明显,无细胞毛细血管数目减少,与DM组比较差异有显著性(*P* < 0.05,图1,表2)。

2.4 免疫组织化学结果 NC组视网膜组织中NF-κB有一定表达(0.031 ± 0.008),胞浆可见棕黄色颗粒;DM组神经节细胞层、内核层和外核层细胞的胞核和胞浆NF-κB表达增强,为0.352 ± 0.137(*P* < 0.01),多数细胞核中可见棕黄色颗粒沉积,显示NF-κB向细胞核内转位;α-LA干预后,大鼠视网膜组织NF-κB表达明显减少,为0.236 ± 0.114(*P* < 0.01,图2)。

3 讨论

DR的发生发展是多因素综合作用的结果,早期主要表现为微血管细胞丧失、无细胞毛细血管以及无灌注区形成^[1]。本研究中发现,DM组及α-LA组大鼠血糖一直处于较高水平,12wk时DM组大鼠周细胞及内皮细胞数目明显减少,且有无细胞毛细血管形成,而应用α-LA干预后,大鼠上述病变明显减轻,提示α-LA可阻止毛细血管周细胞、内皮细胞的减少,对DR具有一定保护作用。

高血糖状态下,体内自由基增加,而抗氧化防御能力下降,氧化能力超过抗氧化能力而发生氧化应激,氧化应激是DR发生的主要机制之一^[4]。本实验中,糖尿病病程12wk时,大鼠血清脂质过氧化终产物MDA含量显著增高,抗氧化因子GSH含量及SOD活性均明显降低,而应用α-LA治疗后MDA含量降低,GSH含量及SOD活性均明显升高,提示α-LA对DR的保护作用与其抑制脂质过氧化反应、提高机体抗氧化能力相关。

NF-κB是一类关键性核转录因子,参与多种细胞因子的表达调控,糖尿病时由于氧化应激等因素使NF-κB激活,并可启动其下游基因的转录,参与糖尿病并发症的发



图1 视网膜血管形态变化 A:NC组;B:DM组无细胞毛细血管;C: α -LA组无细胞毛细血管。

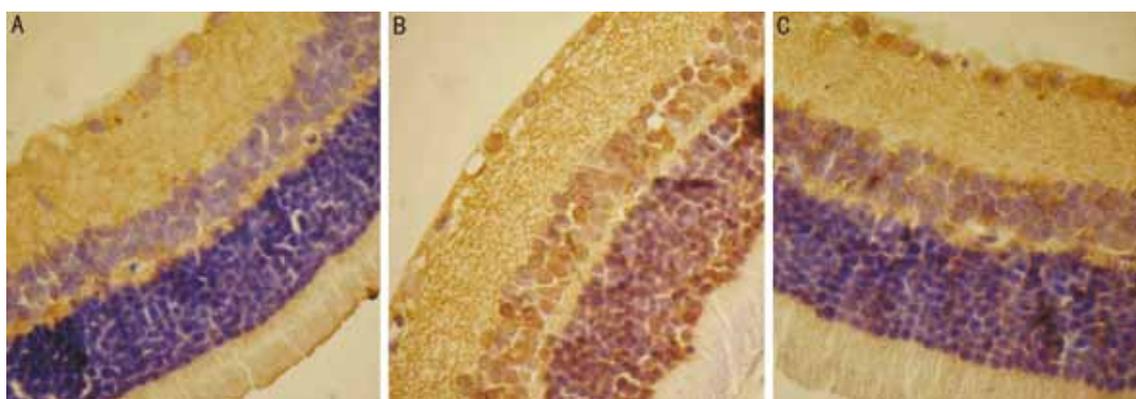


图2 各组大鼠视网膜中NF- κ B的表达 A:NC组;B:DM组;C: α -LA治疗组。

生发展^[5]。有研究表明,在DR早期就出现NF- κ B活化,其可激活周细胞凋亡程序,与DR周细胞数目减少密切相关,并在视网膜毛细血管基底膜增厚及新生血管形成中起重要作用^[6]。本实验显示,糖尿病大鼠病程12wk时NF- κ B表达明显增强,而 α -LA可明显抑制NF- κ B表达,并可减少毛细血管周细胞、内皮细胞的减少,提示 α -LA对DR的保护作用与抑制NF- κ B活化有关。

综上所述, α -LA可在一定程度上清除过氧化物,降低高糖引起的氧化损伤,同时增加机体的抗氧化能力,对DR发生发展具有一定的防治作用,其作用与抑制NF- κ B活化有关。

参考文献

- 1 Pelikánová T. Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Vnitr Lek* 2007;53(5):498-505
- 2 Nagai N, Izumi-Nagai K, Oike Y, *et al.* Suppression of diabetes-induced

retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(9):4342-4350

- 3 Pari L, Murugavel P. Protective effect of alpha-lipoic acid against chloroquine-induced hepatotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2004;24(1):21-26

- 4 Leal EC, Aveleira CA, Castilho AF, *et al.* High glucose and oxidative/nitrosative stress conditions induce apoptosis in retinal endothelial cells by a caspase-independent pathway. *Exp Eye Res* 2009;88(5):983-991

- 5 Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, *et al.* Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 2002;51(7):2241-2248

- 6 Ejaz S, Chekarova I, Ejaz A, *et al.* Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy. *Diabetes Obes Metab* 2008;10(1):53-63