

复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠视网膜氧化应激损伤的保护作用

邢玉微 邹俊杰 石勇铨 刘志民

摘要 **目的** 研究中药复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠视网膜氧化应激损伤的保护作用。**方法** SD 雄性大鼠 36 只随机分为对照组(DM 组, $n=12$)和造模组($n=24$),造模组注射链脲佐菌素(STZ)60mg/kg,造模成功后随机分为糖尿病组(DM 组, $n=12$),复方血栓通胶囊干预组[XST 组, 1g/(kg·d), $n=12$],3 个月后处死大鼠,电镜观察视网膜组织结构,并且探查氧化应激指标超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)含量,以实时定量检测生物活性因子血管内皮生长因子(VEGF)及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达量。**结果** 相比于对照组,糖尿病组大鼠血糖升高,体重下降($P<0.05$),电镜发现视网膜组织细胞出现氧化应激损伤表现,且氧化应激指标 SOD 下降,MDA 升高($P<0.05$),生物活性因子 VEGF-mRNA 及 iNOS-mRNA 明显升高($P<0.05$);相比糖尿病组,复方血栓通胶囊干预组血糖、体重无明显变化($P>0.05$),视网膜组织细胞损伤程度明显下降,氧化应激指标 SOD、MDA 及生物活性因子表达 VEGF-mRNA、iNOS-mRNA 均明显改善($P<0.05$),但仍未达到对照组标准($P>0.05$)。**结论** 高血糖通过氧化应激及增加生物活性因子 VEGF 及 iNOS 表达而损伤视网膜,而复方血栓通胶囊通过改善上述机制对高血糖造成的视网膜氧化应激损伤具有保护作用。

关键词 糖尿病视网膜病变 氧化应激 超氧化物歧化酶 丙二醛 诱导型一氧化氮合酶 血管内皮生长因子

中图分类号 R781

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.010

Protection of Fufang Xueshuantong Capsule Against Retinal Oxidative Damage of Diabetic Rats . Xing Yuwei, Zou Junjie, Shi Yongquan, et al. Department of Endocrinology, The Second Hospital of Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Abstract **Objective** This study is to evaluate the potential protective effects of Fufang XuShuan Tong capsule against retinal oxidative damage in diabetes. **Methods** Adult male Sprague-Dawley rats were divided into 2 groups: control group ($n=12$) and model group ($n=24$). Rat diabetic model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60mg/kg body weight), and the model rats were randomly subdivided into diabetic group (DM, $n=12$), XST group [diabetic rats were treated with Fufang Xushuantong 1g/(kg·d), $n=12$]. After 3 months, all rats were executed. The retina tissue structure changes were observed by electron microscope and oxidative stress index superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels was detected. Meanwhile, Biological active factors vascular endothelial cell growth factor (VEGF) mRNA and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA were also quantified in the retina by Realtime RT-PCR. **Results** Compared with the control group, in the DM group, blood glucose and body weight decreased ($P<0.05$), electron microscope showed that oxidative stress damage were found in retinal tissue, and oxidative stress index SOD level decreased and MDA level increased ($P<0.05$), the biological activity factor VEGF-mRNA and iNOS-mRNA levels increased significantly ($P<0.05$). Compared with DM group, in Fufang xushuan tong capsule intervention group, blood sugar level and weight showed no significant change ($P>0.05$), but retinal tissue damage degree decreased obviously. Oxidative stress index changes of SOD, MDA and biological active factor levels changes of VEGF-mRNA, iNOS-mRNA were significantly ameliorated ($P<0.05$), but still not reach the standard of the normal control group ($P>0.05$). **Conclusion** High blood glucose lead to retinal damage through oxidative stress and increasing biological active factors VEGF and iNOS expression. Fufang Xushuantong capsule protects against high blood glucose-induced retinal oxidative damage through improving the above mechanism

Key words Diabetic retinopathy; Oxidative stress; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Inducible nitric oxide synthase; Vascular endothelial growth factor

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目(2005CB523304)

作者单位:050000 石家庄市第二医院内分泌科(邢玉微);
200003 上海,第二军医大学附属长征医院内分泌科(邹俊杰、石勇铨、刘志民)

通讯作者:邢玉微,电子信箱:510835700@qq.com

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见和危险的并发症之一。目前认为高糖产生的氧化应激被认为是高血糖与诸多导致糖尿病并发症的代谢异常之间的桥梁^[1]。作为糖尿病重要

并发症之一的糖尿病视网膜病变,氧化应激在其发病过程中占有重要地位^[2]。既往研究表明氧化应激可通过调控诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)导致糖尿病视网膜病变的发生、发展^[3,4]。鉴于以上机制,对糖尿病患者进行氧化应激的干预治疗或对延缓视网膜病变的发生、发展的具有积极作用。中医、中药在视网膜血管性疾病的治疗上有着丰富的临床积累,既往大量的临床研究表明,复方血栓通胶囊对于糖尿病视网膜病变有效,但目前关于其保护机制尚不十分明确。本研究以链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠模型建立正常对照组、糖尿病组及复方血栓通胶囊干预治疗组,通过观察比较各组大鼠视网膜超微结构改变及分析各组 SD 大鼠氧化应激指标和 iNOS 及 VEGF 基因的转录情况,以探索高血糖、氧化应激、糖尿病视网膜损伤三者之间的关系和复方血栓通胶囊对糖尿病视网膜病变可能的保护机制。

材料及方法

1. 实验动物及主要仪器:雄性 SD 大鼠 36 只,购自上海中国科学院实验动物中心,体质量 180 ~ 200g。链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司,复方血栓通超微颗粒由广东众生药业提供。血糖测定采用美国罗氏公司血糖仪。电镜由上海复旦大学医学院电镜室协助完成。SOD、MDA 试剂盒购自南京建成公司。引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。实时荧光定量试剂盒 SYBRPremix Ex Taq TM 购自 TaKaRa 公司。

2. 制备动物模型:成年 SD 雄性大鼠(约 2 月龄) 36 只,分为正常对照组($n=12$)及建模组($n=24$)。建模组禁食 12h,腹腔注射左链脲菌素(STZ)65mg/kg,3 天后尾静脉取血测糖 $>16.7\text{mmol/L}$,造模成功。如小于该值,1 周后再次腹腔注射 STZ65mg/kg,同样方法测血糖。1 周后复测血糖,仍维持该水平以上的大鼠参加实验。正常对照组在造模时腹腔注射 6ml/kg 无菌枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。成模组大鼠按体质量随机分为两组,糖尿病非治疗组(DM 组, $n=12$),复方血栓通胶囊干预组[XST 组, $1\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, $n=12$],正常对照组及糖尿病组每日给予同等量双蒸水灌胃。

3. 电镜检查:12 周后称体重、测血糖,过量麻醉处死大鼠后取眼球,眼球沿角膜缘剪开,去除角膜、虹膜、晶体,将眼球后壁固定于电镜固定液中 2h,然后取出切 $1\text{mm} \times 3\text{mm}$ 大小带巩膜的视网膜组织放入固

定液中送电镜观察视网膜细胞超微结构。

4. 氧化应激指标测定:SOD 检测:取出视网膜组织生理盐水清洗后吸干水分,加蔗糖缓冲液后匀浆机匀浆,匀浆后样品 4°C 下 10000r/min 离心 15min,取上清液,用带有 450nm 滤光片的酶标仪化学比色法检测视网膜 SOD 含量。MDA 检测:取视网膜组织生理盐水清洗后吸干匀浆,离心后取上清液,化学比色法测定 MDA 含量。

5. 实时荧光定量 PCR 检测:VEGF 及 iNOS 基因转录:视网膜充分匀浆,提取总 RNA,分光光度计测 A_{260}/A_{280} 的比值并定量。反转录后荧光定量 PCR。内参为 GAPDH。序列号及引物:iNOS:NM_012611,上游引物:5'-TGCCTTTGCTCATGACATCG-3',下游引物 5'-AACACGTTCTTGCGGTGGA-3';VEGF:NM_031836,上游引物:5'-TGCGGATCAAACCTCACCA-3',下游引物:5'-CGCGAGTCTGTGTTTTTGCA-3'。

6. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件,所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况及血糖水平:糖尿病组(DM 组)与复方血栓通干预组(XST 组)出现典型三多一少症状,两组大鼠血糖明显高于对照组($P < 0.05$),而体重明显低于对照组($P < 0.05$),但血糖、体重在两组间相比差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。DM 少量大鼠出现白内障($n=1$)、感染及皮肤溃疡($n=1$)等并发症。XST 组在精神状态、生长发育速度、皮毛色泽、反应敏捷度、捕捉时四肢反抗力度等方面较 DM 组略有所改善,但两组均差于正常对照组。

2. 视网膜电镜:电镜下检查见 DM 组视网膜神经节细胞及微血管均出现更明显病理变化,而复方血栓通胶囊干预组能够明显减轻此类病理变化(图 1、图 2)。

3. 对氧化应激影响:同对照组相比,糖尿病组(DM)组及复方血栓通干预组(XST 组)超氧化物歧化酶(SOD)活性均明显降低,丙二醛(MDA)含量均明显升高(P 均 < 0.05);同 DM 组相比,XST 组 SOD 活力升高,MDA 含量下降(P 均 < 0.05 ,表 1)。

4. VEGF-mRNA 及 iNOS-mRNA 水平:PCR 结果显示糖尿病组(DM)和复方血栓通干预组(XST 组)VEGF-mRNA、iNOS-mRNA 较对照组明显升高(P 均 < 0.05),XST 组较 DM 组 VEGF-mRNA、iNOS-mRNA 量明显下降,差异有统计学意义(P 均 < 0.05 ,表 2)。

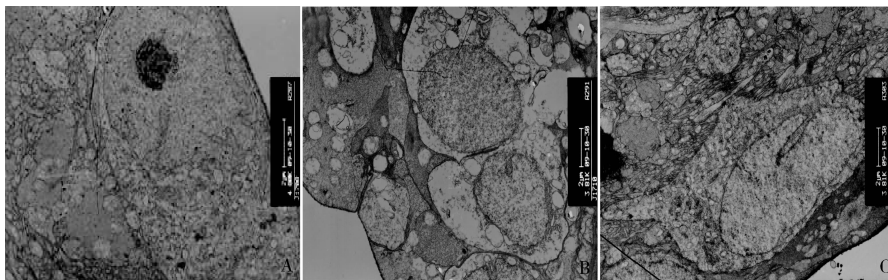


图1 各组大鼠视网膜透射电镜改变(×8400)

A. 正常大鼠视网膜神经节细胞:细胞形态正常,线粒体结构正常;B. 糖尿病组大鼠视网膜神经节细胞:细胞线粒体体积明显肿大,有空泡样改变;C. 复方血栓通胶囊干预组:神经节细胞未见明显异常

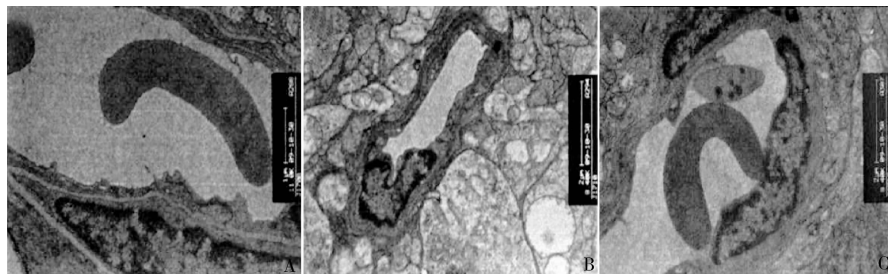


图2 各组大鼠视网膜微血管改变(×8400)

A. 正常大鼠视网膜微血管基膜无增厚,内皮细胞无明显指状突起;B. DM 组糖尿病大鼠视网膜微血管基膜明显增厚,内皮细胞无明显指状突起;C. 复方血栓通胶囊干预组糖尿病大鼠视网膜微血管基膜无明显增厚,内皮细胞较多指状突起

表1 各组大鼠一般情况及氧化应激指标($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血糖(mmol/L)	体重(g)	视网膜 SOD(U/mg·prot)	视网膜 MDA(U/ml)
对照组	12	6.0 ± 0.4	563.0 ± 24.6	105.7 ± 15.6	0.42 ± 0.22
DM 组	12	28.5 ± 2.7 *	215.0 ± 48.9 *	34.0 ± 7.7 *	0.84 ± 0.07 *
XST 组	12	28.6 ± 4.8 *	258.0 ± 47.1 *	78.8 ± 15.2 *#	0.72 ± 0.21 *#

与对照组相比,* $P < 0.05$;与 DM 组相比,# $P < 0.05$

表2 各组大鼠 VEGF-mRNA 及 iNOS-mRNA 的检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	iNOS	VEGF
对照组	12	0.190 ± 0.227	0.447 ± 0.012
DM 组	12	0.480 ± 0.041 *	0.656 ± 0.020 *
XST 组	12	0.310 ± 0.027 *#	0.454 ± 0.016 *#

与对照组相比,* $P < 0.05$;与 DM 组相比,# $P < 0.05$

讨 论

现代多项研究证实 DR 患者多存在血黏度增高、微循环障碍及血流异常,符合现代中医血瘀的理论。血栓通胶囊是一种活血化瘀中药复方,实践上表明该药对于糖尿病视网膜病变有效。复方血栓通胶囊由三七、黄芪、丹参、玄参 4 味药组成,现代药理研究证实该复方除了降低血液黏滞度等作用外,也具有明显的抗氧化、清除自由基的作用。其中三七主要药物成分三七总皂苷可提高肝组织及血液内 SOD 含量^[5];黄芪能减轻脂质过氧化损伤,具有较好的清除氧自由基作用^[6];丹参有效成分丹酮 II A、丹参素和丹酚酸

经体内外试验证明均是有效的抗氧化剂,尤以丹酚酸的抗氧化作用最强。玄参根中的单体化合物苯丙素苷(PG)和环烯醚萜(IG)具有明显的抗氧化能力。

基于上述理论基础,本研究从基础医学角度探索了氧化应激与糖尿病视网膜损伤之间的关系及复方血栓通胶囊对糖尿病视网膜病变可能的最直接的保护机制。研究显示糖尿病组大鼠血糖升高,体重下降,符合糖尿病临床表现。电镜发现糖尿病组视网膜神经节细胞出现氧化应激损伤,且氧化应激指标 SOD 下降,MDA 升高,表明氧化应激在高血糖视网膜损伤中起到了重要作用。和糖尿病组比较发现,复方血栓通胶囊干预组血糖、体重无明显变化,但却发现复方血栓通胶囊治疗组视网膜神经节细胞损伤程度明显下降,氧化应激指标 SOD、MDA 均明显改善,这说明复方血栓通胶囊虽然不能从根本上阻止高血糖带来的机体代谢紊乱,但却通过拮抗高血糖诱发的氧化应激而对视网膜损伤起到了保护作用。

正常情况下机体通过各种途径可以持续产生少

量的氧化物质如 O_2^- 等,此时内源性抗氧化物 SOD 及其他抗氧化物质能将过量的 O_2^- 歧化成 O_2 和 H_2O_2 ,后者在过氧化氢的作用下变成 H_2O ,此机制称为机体抗氧化作用的重要组成部分。机体通过此途径消除了过量的过氧化物使之维持处于氧化与抗氧化的动态平衡之中,一旦由于各种原因导致氧化物质产生过多打破了当氧化-抗氧化之间的失衡则会导致一系列病变的发展^[7]。在氧化与抗氧化系统中,因氧化物质较难以测定,通常通过测定 SOD 判定氧化状态。当机体处于过氧化状态时,SOD 被大量消耗处于低水平,当通过治疗恢复时,SOD 水平升高。本研究中视网膜 SOD 在糖尿病下降,而在治疗组又明显升高,间接说明高血糖可以导致氧化应激,而复方血栓通胶囊有助于机体抵御氧化应激而保护视网膜损伤的能力。

氧化物质可攻击膜脂质中的不饱和脂肪酸,使其发生氧化,脂质过氧化物丙二醛(MDA)就会升高。丙二醛等脂质过氧化物是生物体包膜脂质氧化损伤的最直接的客观指标^[8]。通过测定体内 MDA 含量,可直接反映体内自由基对机体的损伤程度。本研究中糖尿病大鼠视网膜 MDA 升高,提示了糖尿病造成氧化应激损伤;而经复方血栓通胶囊干预后视网膜 MDA 下降,更直接的表明该中药复方可以改善糖尿病引起的视网膜氧化应激损伤。

另外,本研究显示糖尿病组生物活性因子 iNOS-mRNA 及 VEGF-mRNA 较正常对照组明显升高。而相比于糖尿病组,复方血栓通胶囊干预组生物活性因子 iNOS-mRNA、VEGF-mRNA 均明显改善,这充分说明糖尿病视网膜病变尚有其他机制参与,而复方血栓通胶囊亦可通过抑制该过程对糖尿病视网膜病变产生保护作用。NO 为一种重要的血管活性物质,在调节视网膜微血管的循环等方面所起着积极作用。但 NO 生成过多会导致超氧化,表现出细胞毒性和组织损伤作用。机体 NO 来源主要靠 3 种 NOS 催化,即内皮型 NOS(eNOS)、神经型 NOS(nNOS)和诱导型 NOS(iNOS),前两者广泛分布在眼部各种组织细胞中,如脉络膜、视网膜、睫状体细胞中,其激活依赖于细胞内 Ca^{2+}/CaM 的作用,生成少量 NO 参与细胞的信号转导,其表达不受病理因子如内毒素等诱导。iNOS 其诱导不依赖于 Ca^{2+}/CaM 调节,且在正常视网膜组织中几乎无表达,在病理因子诱导下可大量表达催化形成过量 NO 发挥细胞毒效应^[9]。本研究中糖尿病大鼠视网膜 iNOS-mRNA 升

高,提示了高血糖可通过该机制造成视网膜损伤,这与上述研究结论基本一致;复方血栓通胶囊干预组 iNOS-mRNA 明显下降,说明该药也可通过抑制抑制 iNOS 的表达而对视网膜起到保护作用。

糖尿病视网膜病变的特征之一是视网膜微血管发生改变。视网膜氧化应激损伤伴随着炎症的发生,VEGF 为血管生长因子,在炎症的发生、发展过程中有重要作用,它能提高血管通透性、促进血管的渗漏以及促进新生血管生长,既往研究表明在糖尿病视网膜病变大鼠视网膜组织 VEGF 蛋白水平较正常大鼠明显升高^[10]。本研究显示 VEGF 基因在糖尿病视网膜病变中转录水平明显升高,同以上研究结论基本一致。而复方血栓通胶囊可以降低 VEGF 基因的转录水平,这提示在氧化应激炎症反应过程中,复方血栓通胶囊对于 VEGF 介导的糖尿病视网膜微血管病变有一定的治疗意义。

综上所述,高血糖可通过氧化应激及诱发微血管病变导致视网膜损伤,而复方血栓通胶囊可以增强糖尿病大鼠视网膜抗氧化能力,并通过降低 VEGF 的表达保护视网膜微血管进而延缓糖尿病视网膜病变的形成。

参考文献

- 1 Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. *Diabetes*, 2005, 54(6):1615-1625
- 2 Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS[J]. *Circulation*, 2003, 108(16):1912-1916
- 3 Gao L, Huang W, Li J. NOX1 abet mesangial fibrogenesis via iNOS induction in diabetes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 382(1-2):185-191
- 4 Xu X, Chen P, Zheng Q, *et al.* Effect of pioglitazone on diabetic nephropathy and expression of HIF-1 α and VEGF in the renal tissues of type 2 diabetic rats[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 93(1):63-69
- 5 叶晓峰, 张勇进, 田洁. 葛根芩连加味汤对糖尿病大鼠视网膜病变的防治作用[J]. *中国中医眼科杂志*, 2006, 16(01):34-37
- 6 Zhao C, Rajendran A, Dai Q, *et al.* A pyrazine-based fluorescence-enhancing ligand with a high selectivity for thymine in AP site-containing DNA duplexes[J]. *Anal Sci*, 2008, 24(6):693-695
- 7 沈烨渠, 沈渠深, 张秋子. 氧化应激与糖尿病血管并发症的关系[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(9):856-858
- 8 Kwiecien S, Konturek P C, Sliwowski Z, *et al.* Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress-induced gastric lesions. Role of oxidative stress[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2012, 63(2):143-151
- 9 董娟, 郎平, 吴昌凡. 一氧化氮和一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病视网膜病变[J]. *国际眼科杂志*, 2010, 10(11):2144-2146
- 10 王竞男, 杨立群, 邓宇斌. 灯盏花素对人视网膜色素上皮细胞和糖尿病大鼠视网膜 VEGF 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(5):900-905 (收稿日期:2015-06-19)
(修回日期:2015-06-24)