

青蒿琥酯对糖尿病大鼠视网膜 MMP-9 表达的影响

陈 晶¹, 关晓海², 杨杉杉³, 李铁英⁴, 程 光⁵, 曹福源⁶

1. 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063000

2. 华北理工大学附属医院 泌尿外科, 河北 唐山 063000

3. 唐山市眼科医院 青光眼科, 河北 唐山 063000

4. 华北理工大学基础医学院, 河北 唐山 063000

5. 华北理工大学临床医学院, 河北 唐山 063000

6. 华北理工大学实验动物中心, 河北 唐山 063000

摘要: 目的 检测大鼠视网膜基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 及其抑制因子基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 表达量的变化, 探讨青蒿琥酯在糖尿病视网膜病变过程中的作用。方法 将 24 只大鼠随机分为对照组 ($n=6$)、模型组 ($n=9$) 和青蒿琥酯组 ($n=9$), 采用链脲佐菌素 (STZ) 制备糖尿病大鼠模型, 3 个月后, 给予青蒿琥酯 ip 10 d 后, 摘除眼球, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测视网膜 MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 相对表达量, 免疫组化法检测 MMP-9 蛋白在视网膜组织中的表达情况。结果 青蒿琥酯组大鼠视网膜 MMP-9 mRNA 的相对表达量明显低于模型组, 而 TIMP-1 的相对表达量高于模型组, 差异显著 ($P<0.05$), 免疫组化检测发现, 青蒿琥酯组大鼠视网膜 MMP-9 的阳性表达率低于模型组 ($P<0.05$)。结论 青蒿琥酯具有抑制糖尿病视网膜病变 MMP-9 表达的作用。

关键词: 青蒿琥酯; 糖尿病视网膜病变; 基质金属蛋白酶-9; 基质金属蛋白酶抑制剂-1; 视网膜

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)05-1106-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.018

Effect of artesunate on expression of MMP-9 in rat retina

CHEN Jing¹, GUAN Xiao-hai², YANG Shan-shan³, LI Tie-ying⁴, CHENG Guang⁵, CAO Fu-yuan⁶

1. School of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

2. Department of Urology Surgery, Affiliated Hospital of North China University, Tangshan 063000, China

3. Department of Glaucoma, Ophthalmic Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, China

4. School of Basic Medicine, North China University, Tangshan 063000, China

5. Laboratory Center of Clinical Medicine, North China University, Tangshan 063000, China

6. Laboratory Animal Center of North China University, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of artesunate (ART) on diabetic retinopathy of rats by detecting the expression variation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and inhibitory factor matrix metalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1) in retina. **Methods** A total of 24 healthy male SD rats were randomly divided into negative control, model control and ART treated groups. The model control group and ART treated group were given injection of streptozotocin (STZ) to establish the type 1 diabetic rat model. After being raised for three months, the ART treated rats' abdomina were given ART injection for 10 d. All retinas of three groups were isolated. The expression of MMP-9 and TIMP-1 mRNA was detected by Real-time PCR (RT-qPCR) and the expression of MMP-9 protein was detected by immunohistochemical staining. **Results** The expression of MMP-9 in ART treated group was significantly decreased compared with model control group ($P < 0.05$), whereas TIMP-1 in ART treated group was significantly increased ($P < 0.05$). The immunohistochemical staining showed that the positive expression of MMP-9 protein in ART treated group was significantly less than that in model control group. **Conclusion** ART has inhibitory effects on the expression of MMP-9 in the diabetic retinopathy of rats.

Key words: artesunate (ART); diabetic retinopathy (DR); MMP-9; matrix metalloproteinase inhibitor-1; retina

收稿日期: 2017-09-18

基金项目: 河北省科技厅科技支撑计划项目资助 (14277727D)

作者简介: 陈 晶 (1973—), 女, 副教授, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向为细胞应激反应及保护研究。Tel: (0315)8805597 E-mail: j.chen@163.com

糖尿病视网膜病变 (DR) 是一种以新生血管生成成为主要病理改变的糖尿病并发症, 是致盲的主要原因^[1]。DR 的发病机制尚不明确, 但有研究发现, 基质金属蛋白酶 (MMPs) 在 DR 的早期阶段起着重要的作用, 其可以调节细胞凋亡及新生血管的生成^[2], 尤其基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 在 DR 新生血管生成的过程中起着重要的作用, 且其在视网膜中的表达量增加已经得到广泛认可^[3]。青蒿琥酯是具有过氧桥结构的倍半萜内酯类化合物青蒿素的水溶性衍生物, 临床上主要用于抗疟治疗, 研究发现, 其还具有抑制新生血管生成的作用^[4], 但其作用机制尚不明确。本研究将青蒿琥酯作用于糖尿病模型大鼠, 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测视网膜 MMP-9 及基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) mRNA 相对表达量的变化, 免疫组化检测视网膜 MMP-9 阳性表达的情况, 探讨青蒿琥酯对糖尿病新生血管生成的影响。

1 材料

健康 SPF 级成年 SD 雄性大鼠 24 只, 体质量 200~220 g, 由华北理工大学实验动物中心提供, 许可证号 0004236。链脲佐菌 (STZ) 购自 Sigma 公司; 青蒿琥酯粉针剂 (批号 H20133237, 质量分数 99.99%) 购自桂林南方有限公司; 引物由上海生物工程股份有限公司合成; 胶回收试剂盒购自 GeneMark 公司; RT-qPCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; MMP-9 兔抗大鼠多克隆抗体购自天津赛尔生物技术有限公司。

2 方法

2.1 糖尿病大鼠模型的制备、分组及给药

24 只健康 SD 雄性大鼠, 将其随机分为对照组 6 只, 实验组 18 只; 实验组大鼠按照 55 mg/kg 的剂量一次性 ip 1% STZ, 制备糖尿病大鼠模型, 对照组 ip 给予同等剂量的柠檬酸盐缓冲液, 48 h 后检测血糖 (韩国 CareSensTM I 血糖仪) 和尿糖。血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 尿糖为 “+++” 以上者确定为糖尿病模型成功。造模成功 3 个月后, 将实验组大鼠随机分为模型组和青蒿琥酯组, 青蒿琥酯组大鼠 ip 给予青蒿琥酯 (20 mg/kg^[5]), 连续给药 10 d, 对照组和模型组大鼠 ip 同等剂量的生理盐水; 10 d 后摘除眼球, 一部分分离视网膜, 保存于 -80 °C, 另一部分浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中 48 h 以上, 备用。

2.2 RT-qPCR 法检测大鼠视网膜 MMP-9 及 TIMP-1 的相对表达量

Trizol 法提取视网膜总 RNA, 并按照 RevertAid

First strand cDNA synthesis Kit 说明书的要求, 将提取的试样总 RNA 逆转录为 cDNA, -80 °C 保存, 备用。依据 NCBI 查询的 β -actin、MMP-9 序列, 利用 Primer primer-5 软件设计引物, 引物序列见表 1; 将 β -actin、MMP-9、TIMP-1 分别进行普通 PCR 进行扩增, 按照琼脂糖胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物, 以回收扩增产物为标准品, 将 4 个基因分别进行 10 倍梯度稀释, 制作标准曲线。以 β -actin 为内参, 采用 SYBR Green 染料法, 利用 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR 反应。反应体系为 20 μ L, 反应条件为 95 °C 预变性 1 min, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。反应完成后, 进行熔解曲线分析, 鉴定产物的特异性, 调整基线位置, 得出 C_t 值, 反应重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物
Table 1 Primers of RT-qPCR

基因名称	引物序列 (5'→3')	长度/bp
β -actin	正向: AGATTACTGCCCTGGCTCCTAG	22
	反向: CATCGTACTCCTGCTTGCTGAT	22
MMP-9	正向: CCCACTTACTTTGGAAACGC	20
	反向: CGAAGATGAATGGAAATACGC	21
TIMP-1	正向: CCCCAACCCACCCACAGACA	20
	反向: ACGGCCCGCGATGAGAAACT	20

2.3 免疫组化检测视网膜 MMP-9 的表达情况

将 4% 多聚甲醛固定好的眼球, 经脱水进行石蜡包埋, 按照 5 μ m 的厚度连续切片, 切片经烤片, 脱蜡, 水化, 抗原修复后, 滴加过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 室温孵育, 15 min, 滴加兔抗大鼠 MMP-9 一抗 (1:100), 4 °C, 过夜, 滴加羊抗兔二抗 (1:200), 37 °C 孵育 30 min; 滴加 DAB 显色, 苏木素复染, 经脱水, 透明, 进行封片, 于显微镜下观察并进行图像采集。通过与电脑相连的高清晰度彩色病理图文分析系统 (奥林巴斯 CX31) 对 MMP-9 蛋白进行半定量分析。每个眼球随机选取 5 张切片, 每张切片在 400 倍镜下随机选取 5 个视野。着色强度评定标准: 细胞胞浆染色后不着色为阴性, 呈浅黄色为弱阳性, 呈棕黄色者为阳性, 呈深棕黄色为强阳性细胞, 统计选定的图像所有的阳性信号, 计算阳性反应密度, 并取平均值。用阳性反应密度来表示免疫反应表达程度。

2.4 统计学分析

利用统计学软件 SPSS 17.0 进行分析, 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间的均值比较采用单因素方差

分析, 两两比较则采用 SNK-*q* 检验。

3 结果

3.1 对视网膜 MMP-9 mRNA 相对表达量的影响

经 RT-qPCR 对糖尿病大鼠视网膜 MMP-9 mRNA 相对表达量的检测发现, 糖尿病大鼠 (包括模型组和青蒿琥酯组) 视网膜 MMP-9 mRNA 的相对表达量均明显高于对照组, 而青蒿琥酯组大鼠视网膜 MMP-9 mRNA 的相对表达量低于模型组, 差异显著 ($P < 0.05$), 见图 1。

3.2 对视网膜 TIMP-1 mRNA 相对表达量的影响

经 RT-qPCR 对糖尿病视网膜 TIMP-1 mRNA 相

对表达量的检测发现, 模型组大鼠视网膜 TIMP-1 mRNA 的相对表达量明显高于对照组, 青蒿琥酯组大鼠视网膜 TIMP-1 mRNA 的相对表达量高于模型组及对照组, 差异显著 ($P < 0.05$)。见图 1。

3.3 对视网膜 MMP-9 蛋白表达的影响

MMP-9 阳性表达主要在糖尿病大鼠视网膜神经细胞层和内核细胞层细胞胞浆中, 呈现为棕黄色颗粒, 外核层中也有少量表达 (图 2), 模型组大鼠视网膜 MMP-9 蛋白表达高于对照组。青蒿琥酯组的阳性表达低于模型组, 差异显著 ($P < 0.05$), 半定量分析结果见图 2。

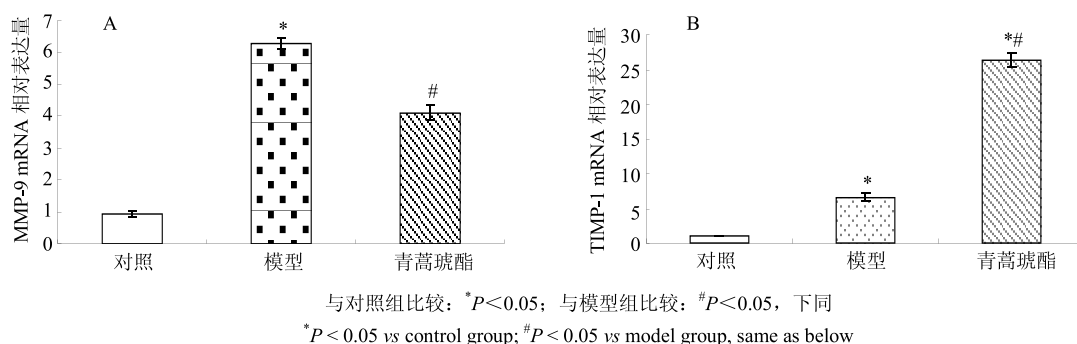


图 1 青蒿琥酯对糖尿病大鼠视网膜 MMP-9 (A) 和 TIMP-1 (B) mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of artesunate on mRNA expression of MMP-9 (A) and TIMP-1 (B) in retina of diabetic rats

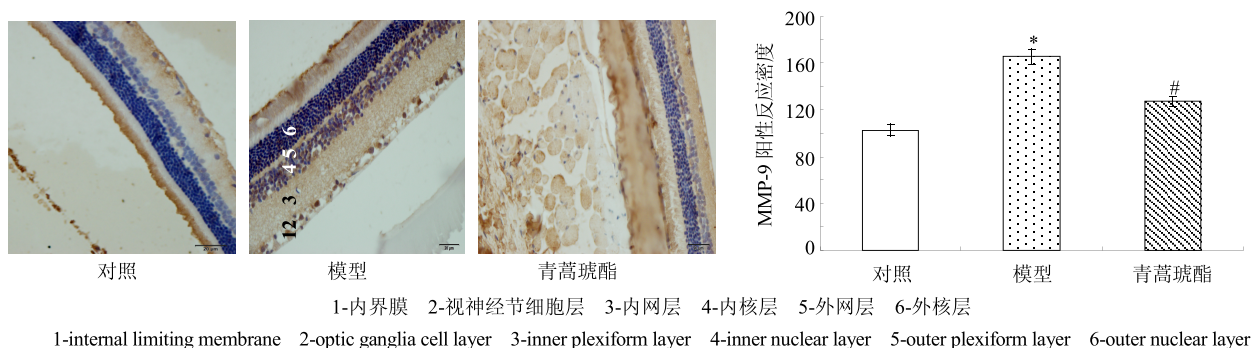


图 2 免疫组化检测视网膜 MMP-9 的蛋白表达

Fig. 2 Protein expression of MMP-9 in retina of diabetic rats detected by immunohistochemical staining

4 讨论

DR 是糖尿病最为常见的并发症之一, 其主要的病理改变是大血管及其微血管病变导致新生血管的生成。新生血管的生成过程主要包括在一定因素的刺激下, 血管周细胞发生凋亡、血管壁基底膜降解和细胞外基质 (ECM) 的降解, 从而导致内皮细胞的迁移、增殖, 最后通过内皮细胞之间的接触联系, 形成新的管腔, 完成新生血管生成的整个过程^[6], 这个过程受到严格的控制^[7]。MMPs 在新生血管生成过程中起着重要的作用, 是一类能够降解

ECM 的钙或锌依赖的蛋白水解酶, 其中 MMP-9 主要在糖尿病视网膜新生血管生成过程中起着重要的作用。MMP-9 是一种明胶酶, 主要表达在视神经节细胞层^[8], 它能够降解 ECM 中的 IV、V 型胶原和基底膜成分, 从而利于视网膜内皮细胞增殖和迁移^[9]。有关学者通过敲除视网膜 MMP-9 基因发现, 糖尿病小鼠的视网膜血管细胞减缓了细胞凋亡的发生, 免受了糖尿病诱发的线粒体损伤, 从而推测线粒体的损伤可能是 MMPs 促使 DR 发展的机制之一^[10]; 亦有研究表明长期高糖环境会诱发 MMP-9

的激活^[11-12]。长期高血糖导致视网膜缺血缺氧诱导的血管内皮生长因子(VEGF)表达增加,研究证明,DR视网膜中VEGF和MMP-9的含量呈显著相关^[13],会调节MMP-9的表达从而加速视网膜毛细血管细胞的凋亡^[14],促进DR的进展。本研究经免疫组化的检测糖尿病大鼠视网膜中MMP-9的表达情况发现,与对照组大鼠相比,模型组大鼠视网膜视神经节细胞层、内核层明显看到棕黄色颗粒,证明糖尿病大鼠视网膜MMP-9的表达量增加,与理论相符,而经过青蒿琥酯注射治疗的糖尿病大鼠视网膜中MMP-9阳性表达细胞低于模型组。

生理状态下,MMPs与TIMPs保持平衡状态,这种平衡状态决定着机体生理疾病的发生^[15],当MMPs或TIMPs产生过多时,会导致ECM的过度降解或聚集,从而导致新生血管的生成。TIMP-1是MMP-9的特异性抑制物^[16],由视网膜色素上皮细胞分泌,能特异性抑制MMP-9的活性,其会随着MMP-9表达量的增加而升高,有学者通过实验证明了这一点^[17]。但当TIMP-1不足以抑制MMP-9的活性时,平衡会被打破,从而促进新生血管的形成。本研究通过RT-qPCR检测视网膜MMP-9及TIMP-1 mRNA的相对表达量的检测发现,模型组大鼠MMP-9及TIMP-1的表达都明显增加,差异显著($P<0.05$),青蒿琥酯组MMP-9 mRNA的相对表达量低于模型组,TIMP-1 mRNA高于模型组,差异显著($P<0.05$),TIMP-1表达的增加抑制了MMP-9的活性,从而缓解新生血管生成的进程。

综上所述,青蒿琥酯组糖尿病大鼠视网膜MMP-9 mRNA的相对表达量和免疫组化中显示的MMP-9蛋白半定量的表达均较模型组降低,从而揭示了青蒿琥酯能够抑制DR过程中MMP-9的表达量,对DR具有一定的治疗作用,从而为DR临床治疗提供新的途径。

参考文献

- [1] 王 雯, 綦玉琴, 李长贵. 2型糖尿病视网膜病变危险因素分析[J]. 齐鲁医学杂志, 2006, 21(3): 243-244.
- [2] Kowluru R A, Zhong Q, Santos J M. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy potential role of MMP-9[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(6): 797-805.
- [3] Jin M, Kashiwagi K, Iizuka Y, *et al.* Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous[J]. *Retina*, 2001, 21(1): 28-33.
- [4] 赖剑平, 曾长英, 殷卓敏. 青蒿琥酯诱导 K562 细胞凋亡及其血管内皮生长因子的变化[J]. 中国基层医药, 2010, 17(11): 1540-1542.
- [5] 莫汉有, 王丽芳, 周润华, 等. 青蒿琥酯对佐剂型关节炎大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的影响[J]. 重庆医学, 2011, 40(7): 628-630.
- [6] 顾永昊. 基质金属蛋白酶与糖尿病视网膜病变新生血管生成[J]. 实用防盲技术, 2011, 6(3): 131-135.
- [7] 李晨晨. MMP-2 和 MMP-9 在糖尿病大鼠视网膜中的表达研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2011.
- [8] Hiscott P, Waller H A, Grierson I, *et al.* The extracellular matrix of reparative tissue in the vitreous: fibronectin production in proliferative diabetic retinopathy membranes[J]. *Eye*, 1993, 7(2): 288-292.
- [9] Miyata Y, Iwata T, Ohba K, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-7 on cancer cells and tissue endothelial cells in renal carcinoma: prognostic implications and clinical significance for invasion and metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(23): 6998-7003.
- [10] 孔佳慧, 陈 松. 基质金属蛋白酶与糖尿病视网膜病变关系研究进展[J]. 中国实用眼科杂志, 2015, 33(1): 2-5.
- [11] Gtebel S J, Menieueci G, Mc Cmire P G, *et al.* Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier[J]. *Lab Invest*, 2005, 85(5): 597-607.
- [12] Ishizaki E, Takai S, Ueki M, *et al.* Correlation between angiotensin-converting enzyme, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in the vitreous of eyes with diabetic retinopathy[J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 141(1): 129-134.
- [13] Bhatt L K, Addepalli V. Attenuation of diabetic retinopathy by enhanced inhibition of MMP-2 and MMP-9 using aspirin and minocycline in streptozotocin-diabetic rats[J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(2): 181-189.
- [14] Lee C Z, Xue Z, Zhu Y, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-induced intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2007, 38(9): 2563-2568.
- [15] 陈 莉, 郑 芳. 基质金属蛋白酶的表达和活性与2型糖尿病大鼠大血管病变的相关性研究[J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2009, 23(5): 380-383.
- [16] 丁 熊, 刘 辉, 王琳玲, 等. 基质金属蛋白酶抑制剂-1减轻糖尿病小鼠视网膜损伤[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(12): 1687-1692.
- [17] 王衍慧, 黄玉宇, 傅君舟, 等. 糖尿病肾病大鼠 MMP9/TIMP1 的表达及钙拮抗剂对其表达的影响[J]. 中国医药指南, 2010, 8(15): 46-47.