

羟苯磺酸钙改善糖尿病大鼠视网膜病变及其机制研究

郝改梅¹, 韩 静¹, 徐 涛², 何 洁¹, 王 伟¹, 毕力夫^{3*}

1. 北京中医药大学, 北京 100029

2. 北京王府中西医结合医院, 北京 102209

3. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010059

摘 要: **目的** 观察羟苯磺酸钙对糖尿病大鼠视网膜病变的影响并探讨其机制。**方法** 以 65 mg/kg 一次性 ip 链脲佐菌素诱导糖尿病模型, 将糖尿病模型大鼠分为模型组、复方血栓通组 (1.05 g/kg) 和羟苯磺酸钙组 (0.334 g/kg), 另设对照组, 均 ig 给药, 1 次/d, 对照组给予等剂量蒸馏水, 共 12 周。采用 Real-time PCR 法检测 IV 型胶原及血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 在视网膜组织中的表达; 光镜下观察视网膜血管形态学改变, 测定视网膜毛细血管面积密度; 透射电镜观察大鼠视网膜超微结构。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠视网膜 IV 型胶原 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), VEGF mRNA 升高 ($P < 0.01$), 毛细血管面积密度显著增高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 羟苯磺酸钙组大鼠视网膜 IV 型胶原 mRNA、VEGF mRNA 表达和毛细血管面积密度均降低 ($P < 0.05$)。**结论** 羟苯磺酸钙能下调视网膜中 IV 型胶原、VEGF 的表达, 抑制纤维组织增生和血管新生, 从而改善糖尿病视网膜病变。

关键词: 羟苯磺酸钙; 糖尿病视网膜病变; IV 型胶原; 血管内皮生长因子; 胶原代谢; 血管新生

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)05-0492-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.05.004

Improvement of calcium dobesilate on diabetic retinopathy in rats and its mechanism

HAO Gai-mei¹, HAN Jing¹, XU Tao², HE Jie¹, WANG Wei¹, BI Li-fu³

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Beijing Royal Integrative Medicine Hospital, Beijing 102209, China

3. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of calcium dobesilate on the diabetic retinopathy in rats and to explore its mechanism. **Methods** Rats were ip administered with streptozotocin (65 mg/kg) to induce diabetes model. The diabetic rats were randomly divided into model group, Compound Xueshuantong group (1.05 g/kg), and calcium dobesilate group (0.334 g/kg). Other rats were recruited as the control group. The expression of collagen IV mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in retinas of rats were determined by Real-time PCR method. The morphology was observed under light microscope, and retinal capillary areas were determined. The ultrastructure of retinal capillary was observed under electron microscope. **Results** Compared with the control group, the indexes of rats in model group such as collagen IV mRNA expression ($P < 0.05$), VEGF mRNA expression ($P < 0.01$), and capillary density ($P < 0.001$) significantly increased. Compared with the model group, collagen IV mRNA, VEGF mRNA expression, and capillary density in calcium dobesilate group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Calcium dobesilate can down-regulate the expressions of collagen IV and VEGF in retinas of rats, restrain fibrous tissue hyperplasia and angiogenesis, thereby improve the diabetic retinopathy.

Key words: calcium dobesilate; diabetic retinopathy; collagen IV; vascular endothelial growth factor(VEGF); collagen metabolism; angiogenesis

收稿日期: 2015-02-13

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAI29B07); 北京中医药大学在读研究生项目 (2014-JYBZZ-XS-004)

作者简介: 郝改梅 (1979—), 主治医师, 博士生, 研究方向为糖尿病药理。Tel: 13811502015 E-mail: haogaimai@163.com

*通信作者 毕力夫, 男, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合药理研究。Tel: 13371771112 E-mail: bilifunmg@126.com

糖尿病视网膜病变是糖尿病最常见的微血管并发症,视网膜微循环障碍是糖尿病视网膜病变的基础^[1],血管新生和基底膜增厚是糖尿病视网膜病变的特征性改变。IV型胶原是基底膜的主要成分之一。糖尿病代谢紊乱促使IV型胶原合成增加,分解减慢,并在基底膜沉积^[2]。伴随着糖尿病的发展,视网膜缺血、缺氧程度不断加重^[3],血-视网膜屏障的破坏,毛细血管内皮细胞通透性增加,基底膜增厚,毛细血管闭塞,促新生血管生成的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)大量产生^[4],导致新生血管的形成,同时伴随纤维组织的增生等改变^[5]。新生血管内皮结构不良,十分脆弱,极易渗漏和出血。羟苯磺酸钙可减低微血管壁病理性高通透性,减少血管内膜损伤,并能降低血浆黏稠度和血小板高聚集性^[6],对毛细血管有一定的保护作用。研究证明,应用链脲佐菌素诱导建立的糖尿病大鼠视网膜病变模型与人类早期视网膜病变的发生、发展具有相似的特征,应用此模型可对糖尿病视网膜病变发病机制、药物治疗等方面进行研究^[7]。本研究应用链脲佐菌素诱导建立糖尿病大鼠视网膜病变模型,通过观察羟苯磺酸钙对糖尿病视网膜病变胶原代谢及血管新生的影响,探讨其改善糖尿病视网膜病变的机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠41只,体质量160~190 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2012-0001。动物饲养于北京中医药大学实验动物中心SPF实验室,室温20~25℃,相对湿度40%~70%,换气次数10~15次/h,12 h光照,昼夜循环。动物颗粒饲料喂养,自由摄食饮水。

1.2 药品

链脲佐菌素(Sigma公司,货号S0130);胰蛋白酶(规格1:250,Amresco公司,货号1443 C193);羟苯磺酸钙胶囊,规格0.5 g/6粒,奥地利依比威药品有限公司,产品批号CD6512,用时配成33.4 mg/mL水溶液;复方血栓通胶囊,规格0.5 g/粒,广东众生药业股份有限公司,产品批号110401,用时配成0.105 g/mL水溶液。

1.3 试剂及仪器

TotalRNA提取试剂盒(批号0960602)、qPCR试剂盒(批号0960212),北京旷博生物技术有限公

司。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司北京合成部合成。

美国BIO-RAD C1000 PCR扩增仪反转录仪, Real-Time PCR仪(AB公司),美国BIO-RAD 7218 R04420凝胶成像系统。日立H-600电子显微镜。尼康公司NIS-Elements BR3.1图像分析系统。

2 方法

2.1 动物模型的建立、分组与给药

SD大鼠适应性喂养2周后,禁食12 h,链脲佐菌素溶解于0.1 mmol/L柠檬酸钠缓冲液(冰盒中新鲜配制,pH 4.5),随机选取30只大鼠以65 mg/kg一次性ip链脲佐菌素诱导糖尿病模型。另设11只作为对照组,注射等量的溶剂(0.1 mmol/L柠檬酸钠溶液,pH 4.5)。一周后尾静脉采血检测血糖,以禁食6 h血糖 ≥ 16.7 mmol/L者为糖尿病模型。20周后抽取糖尿病模型大鼠和对照组大鼠各1只,取视网膜行电镜观察,确定视网膜病变形成,将糖尿病模型大鼠按体质量和血糖随机分为模型组、复方血栓通组(1.05 g/kg,相当于临床用药量的14倍)和羟苯磺酸钙组(0.334 g/kg,相当于临床用药量的14倍),另设对照组,均ig给药,1次/d,对照组给予等剂量蒸馏水,共12周。

2.2 指标检测

2.2.1 Real-time PCR法检测IV型胶原及VEGF在视网膜组织中的表达 1%戊巴比妥钠注射液(50 mg/kg)ip麻醉大鼠,取出左侧眼球,沿角膜缘剪开眼球,去除角膜、晶状体和玻璃体,用眼科刀及弯镊将视网膜取出,迅速放入液氮中冷冻,后转入-80℃冰箱中储存。Trizol一步法提取总RNA。反转录反应体系:总RNA 3 μ g, OligodT 1 μ L, dNTP 2 μ L, 5 $\times$ Buffer 4 μ L, 逆转录酶 1 μ L, 加入经DEPC处理过的无菌水至20 μ L;反应条件:42℃反应1 h, 70℃5 min终止反应。反应结束后,-20℃冰箱保存备用。从GenBank获得目的基因mRNA的全长序列,利用引物和探针设计软件Primer 5.0设计引物序列。经过Blast分析,引物序列具有特异性。以 β -actin为内对照进行Real-time PCR反应。引物序列: β -actin上游5'-CAG CCA TGT ACG TAG CCA TC-3',下游5'-AGA GTA CTT GCG CTC AGG AG-3'; IV型胶原上游:5'-CCA CAG ATA TCC GGT TCG CCTACA-3';下游:5'-GCA CAC CCC ACA GCC AGC ACTAT-3'; VEGF上游5'-TAG ACC TCT CAC CGG AAA GAC-3',下游5'-CAG GAA TCC

CAG AAA CAA AAC-3'。反应体系: cDNA 1 μ L, mix 5 μ L, 引物 0.8 μ L, Rox 0.2 μ L, 加 DEPC 水至 10 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应结束后, 读取每份样品中目的基因的 Ct 值, 并与其 β -actin 基因的 Ct 值相减得出相对 Ct 值, 以第 1 个相对 Ct 值为基线, 后面的相对 Ct 值对其进行减法运算, 得出 n 值后进行相对运算, 运算法则为 $1/2^n$ 。校正后得到每份样品中 IV 型胶原及 VEGF 的相对表达量。

2.2.2 视网膜血管形态学观察 大鼠麻醉后, 取大鼠右侧眼球, 将眼球从睫状体后部经锯齿缘环形剪开虹膜, 去除晶状体和眼前节部分, 将后眼杯以视盘为中心橘瓣样剪成 3 块, 取 1 块固定于 4% 多聚甲醛液 72 h, 固定后放入 0.01 mmol/L PBS 浸泡过夜, 12 h 后将视网膜放入 3% 胰蛋白酶液中 37 $^{\circ}$ C 消化 3~4 h, 取出后放入蒸馏水中反复轻柔吹打, 将透明的视网膜血管网平铺于洁净的载玻片上, 自然晾干, 进行 PAS 染色。光镜下观察视网膜血管形态学改变, 采集图像后对视网膜血管铺片进行图像分析, 测定视网膜毛细血管面积密度。

2.2.3 样品的电镜观察 大鼠麻醉后, 取大鼠右侧眼球, 从睫状体后部经锯齿缘环形剪开虹膜, 去除晶状体和眼前节部分, 将后眼杯以视盘为中心橘瓣样剪成 3 块, 取其中 1 块置于 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定; 切取视网膜中央区组织 2 mm² 大小, 固定于 1% 锇酸 1 h, 4 $^{\circ}$ C; 双蒸水冲洗 4 min; 梯度乙醇脱水; Epon 812 环氧树脂包埋; 切 1 μ m 半薄切片作光镜定位, 再作超薄切片, 经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色, 透射电镜观察并拍照。

2.3 统计学方法

实验数据用 SPSS 20.0 统计软件进行分析比较, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 大鼠视网膜中 IV 型胶原和 VEGF mRNA 表达量的比较

与对照组比较, 糖尿病模型组大鼠视网膜组织 IV 型胶原 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), VEGF mRNA 表达升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 羟苯磺酸钙组、复方血栓通组 IV 型胶原 mRNA 和 VEGF mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 大鼠视网膜中 IV 型胶原和 VEGF mRNA 的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Comparison of expression of type IV collagen and VEGF mRNA in retinas of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IV 型胶原 mRNA	VEGF mRNA
对照	—	0.41 ± 0.52	0.38 ± 0.27
模型	—	4.75 ± 3.57*	4.22 ± 2.46**
复方血栓通	1.05	0.64 ± 0.81 [△]	0.77 ± 0.59 [△]
羟苯磺酸钙	0.334	0.57 ± 0.88 [△]	0.85 ± 0.96 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group

3.2 大鼠视网膜血管面积密度的比较

模型组大鼠视网膜毛细血管增生, 排列紊乱, 内皮细胞增生, 周细胞减少, 与对照组比较, 毛细血管面积密度显著增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$); 羟苯磺酸钙组、复方血栓通组大鼠视网膜毛细血管的分布较为均匀, 血管增生不明显, 形态较规则, 内皮细胞增生不明显。与模型组比较, 毛细血管面积密度下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠视网膜毛细血管的血管面积密度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison on retinal capillary density in each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数 n	血管面积密度
对照	—	10	0.36 ± 0.07
模型	—	15	0.47 ± 0.06***
复方血栓通	1.05	7	0.42 ± 0.04 [△]
羟苯磺酸钙	0.334	7	0.41 ± 0.04 [△]

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$

*** $P < 0.001$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group

3.3 各组大鼠视网膜电镜超微结构的比较

对照组大鼠视网膜毛细血管管腔规则, 内皮细胞紧靠管腔面, 基底膜连续、无增厚。模型组大鼠视网膜毛细血管内皮细胞肿胀, 内皮细胞胞质内吞饮小泡增多, 部分线粒体肿胀, 基底膜增厚较为明显。羟苯磺酸钙组、复方血栓通组大鼠视网膜血管基底膜增厚不明显, 内皮细胞连接紧密, 管腔较为平滑。见图 2。

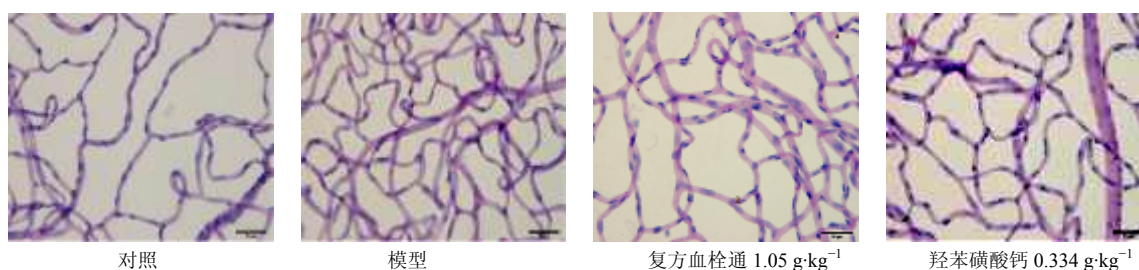


图1 大鼠视网膜毛细血管形态学

Fig. 1 Morphology of retinal capillary in each group of rats

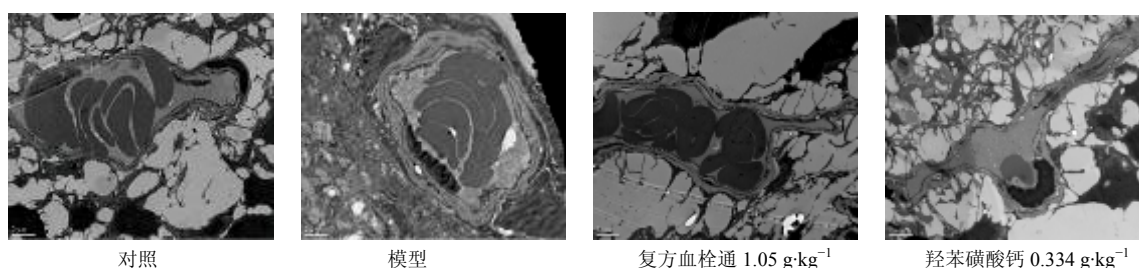


图2 大鼠视网膜电镜超微结构

Fig. 2 Ultrastructure of the retinal in each group of rats

4 讨论

糖尿病视网膜病变是指长期慢性高血糖使视网膜血管发生进行性的结构和功能的损害所导致的视网膜微血管病变。长期的高血糖状态极易造成血-视网膜屏障受损,使全血黏度增高,血流速度减慢,视网膜毛细血管狭窄、闭塞,微循环障碍,导致视网膜缺血缺氧^[8],从而促使 VEGF 在视网膜中的过度表达,导致血管增生^[9]、血管通透性增加^[10]。新生血管的生长和成纤维细胞的增殖在视网膜表面组成增生膜,形成增生性糖尿病视网膜病变。细胞外基质(extracellulamatrix, ECM)是增生膜的主要成分,胶原是细胞外基质的重要组成部分。视网膜基底膜主要由IV型胶原、层黏连蛋白等构成,是位于毛细血管周围特殊形式的 ECM。糖尿病代谢紊乱使IV型胶原合成增加,而分解减慢,并在基底膜沉积^[2]。基底膜增厚是糖尿病视网膜病变的特征性改变之一。有研究报道,在高糖培养基中系膜细胞在数小时到数天内IV型胶原 mRNA 表达水平迅速升高,并合成更多的蛋白质^[11]。本实验采用 Real-time PCR 法检测IV型胶原及 VEGF mRNA 在视网膜组织中的表达,结果在模型组大鼠中其表达较对照组升高,羟苯磺酸钙组、复方血栓通组表达均较模型组明显降低,提示羟苯磺酸钙能够降低糖尿病大鼠视网膜中IV型胶原和 VEGF 的表达,减少视网膜毛

细血管细胞外基质的过度沉积,抑制新生血管形成,从而起到防治视网膜病变的作用。

视网膜毛细血管主要由周细胞和内皮细胞组成,对维持视网膜毛细血管的稳定性具有十分重要的作用。视网膜毛细血管周细胞的丧失是糖尿病视网膜病变早期特征性病理改变。周细胞具有调节内皮细胞增殖、新生血管生长、毛细血管血流、通透性及稳定性等多种功能。周细胞缺失,继而引起视网膜毛细血管内皮细胞增殖,血管增生。视网膜毛细血管的定性和定量研究可以用来评估糖尿病微血管病变的严重程度。本实验通过视网膜消化铺片观察到糖尿病大鼠视网膜毛细血管排列紊乱,内皮细胞增生,周细胞减少,毛细血管面积密度增加;而羟苯磺酸钙组、复方血栓通组大鼠视网膜毛细血管形态相对规则,内皮细胞的增生不明显,毛细血管面积密度显著下降,说明羟苯磺酸钙可以抑制毛细血管和内皮细胞的增生,减少周细胞的凋亡。电镜观察可见模型组大鼠视网膜毛细血管基底膜增厚明显,羟苯磺酸钙组大鼠视网膜基底膜增厚不明显,提示羟苯磺酸钙对高糖造成的基底膜胶原的过量生成有一定的抑制作用。

本实验表明,羟苯磺酸钙能下调IV型胶原及 VEGF 在视网膜组织中的表达,抑制视网膜毛细血管胶原过度合成和毛细血管内皮细胞的增生,减少

周细胞的凋亡,抑制视网膜新生血管形成,减少血管的渗漏,从而改善糖尿病视网膜病变的发生和发展。

参考文献

- [1] 徐凡杨,莹张瑛,宋滇平. 血管内皮生长因子与糖尿病视网膜病变的相关性研究 [J]. 实用糖尿病杂志, 2011, 7(1): 14-16.
- [2] 魏玲格,王长龄,段惠军. 实验性糖尿病视网膜微血管病变的病理研究 [J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(9): 523-525.
- [3] 胡金芳,刘兆凤,刘 静,等. 糖尿病大鼠视网膜血流动力学与视网膜血管形态学关系的研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 167-170.
- [4] 谢秀雯,周建强,崔红平. VEGF 在糖尿病视网膜病变发病机制中作用的研究新进展 [J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(2): 282-285.
- [5] Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions [J]. *Circ Res*, 2005, 97(6): 512-523.
- [6] 杨文波,王红雁. 羟苯磺酸钙的药理作用及临床应用 [J]. 现代医药卫生, 2012, 28(7): 1043-1044.
- [7] 孟旭霞,牛膺筠,曲 虹,等. 大鼠糖尿病视网膜病变模型建立及超微结构观察 [J]. 青岛大学医学院学报, 2007, 43(3): 217-219.
- [8] Kern T S, Tang J, Berkowitz B A. Validation of structural and functional lesions of diabetic retinopathy in mice [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2121-2131.
- [9] Ng E W, Adamis A P. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Can J Ophthalmol*, 2005, 40(3): 352-368.
- [10] Kurihara T, Westenskow P D, Friedlander M. Hypoxia-inducible factor (HIF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the retina [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 801: 275-281.
- [11] 高彦彬. 止消通脉宁治疗糖尿病肾病临床及作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2000.