

石斛多糖对糖尿病大鼠血-视网膜屏障的保护作用及其机制

李静文 李国文 陆骏 李春霞

200080 上海市中西医结合医院眼科(李静文,现在焦作市人民医院眼科)

通信作者:李春霞,Email:cxli_66@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.008

【摘要】 **背景** 糖尿病视网膜病变(DR)的发病机制涉及多条通路,近年来炎症因子相关的通路学说在 DR 发病中的作用越来越受到人们的关注。研究表明,高糖环境下视网膜内肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等促炎因子含量增加,从而加速视网膜中紧密连接蛋白的异常,导致血-视网膜屏障(BRB)破坏。研究发现石斛多糖可抑制 TNF- α 的高表达,但其在 DR 早期对 TNF- α 表达的影响尚不清楚。**目的** 研究石斛多糖对糖尿病大鼠 TNF- α 诱导的 BRB 通透性异常及视网膜内紧密连接蛋白 1(ZO-1)、闭合蛋白(occludin)、连接蛋白-5(claudin-5)表达的影响。**方法** 将 50 只清洁级成年 SD 大鼠分为正常对照组、糖尿病模型组及低、中、高剂量石斛多糖组,每组 10 只大鼠,糖尿病模型组和低、中、高剂量石斛多糖组大鼠均采用链脲佐菌素腹腔内注射法诱导糖尿病模型。低、中、高剂量石斛多糖组于建模成功后 6 周按照分组分别用 100、200 及 300 mg/(kg·d) 石斛多糖灌胃,正常对照组和糖尿病模型组大鼠用生理盐水灌胃。干预后 8 周各组大鼠心脏灌注伊文思蓝并获取双侧眼球,分别进行相关指标检测,通过测定大鼠视网膜中伊文思蓝质量浓度评估大鼠视网膜渗漏量;采用 Western blot 法检测大鼠视网膜内 ZO-1、occludin、claudin-5 蛋白的相对表达量,采用 ELISA 法检测大鼠视网膜中及血清中 TNF- α 的质量浓度。**结果** 正常对照组、糖尿病模型组及低、中、高剂量石斛多糖组大鼠视网膜伊文思蓝渗漏量分别为(12.68 \pm 1.30)、(30.45 \pm 2.60)、(22.12 \pm 1.15)、(17.99 \pm 1.00)和(21.49 \pm 1.00) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,糖尿病模型组大鼠视网膜伊文思蓝渗漏量明显高于正常对照组,低、中、高剂量石斛多糖组视网膜伊文思蓝渗漏量明显低于糖尿病模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。Western blot 检测显示,糖尿病模型组大鼠视网膜中 TNF- α 蛋白相对表达量为 1.12 \pm 0.10,明显高于正常对照组的 0.27 \pm 0.03,低、中、高剂量石斛多糖组视网膜中 TNF- α 蛋白表达量明显低于糖尿病模型组,ZO-1、occludin 和 claudin-5 蛋白表达量明显高于糖尿病模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);ELISA 法检测显示,糖尿病模型组大鼠视网膜和血清中 TNF- α 质量浓度明显高于正常对照组,低、中、高剂量石斛多糖组大鼠视网膜和血清中 TNF- α 质量浓度明显低于糖尿病模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。不同剂量石斛多糖组各指标的比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。**结论** 石斛多糖可能通过下调糖尿病大鼠视网膜中 TNF- α 的表达和上调紧密连接蛋白的表达而改善糖尿病大鼠 BRB 通透性的异常。

【关键词】 糖尿病/并发症; 血-视网膜屏障; 紧密连接蛋白; 肿瘤坏死因子- α ; 中草药; 石斛多糖; SD 大鼠

基金项目:上海中医药大学中西医结合一流学科创新项目(2014XK003)

Protection of polysaccharides of dendrobium candidum on blood-retinal barrier in diabetic rats and its mechanism Li Jingwen, Li Guowen, Lu Jun, Li Chunxia

Department of Ophthalmology, Shanghai TCM-INTEGRATED Hospital, Shanghai 200080, China (Li JW, now Department of Ophthalmology, Jiaozuo People's Hospital)

Corresponding author: Li Chunxia, Email: cxli_66@163.com

[Abstract] **Background** The pathogenesis of diabetic retinopathy (DR) involves a variety of biological pathways. Recently, inflammation factor has been thought to play an important role in the pathogenesis of DR. Studies show that the concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α) is increased in high-glucose environment, which leads to the abnormality of tight junction protein and follows by blood-retinal barrier (BRB) damage. Polysaccharides of

dendrobium candidum (PDC) can inhibit the overexpression of TNF- α , but its effect on TNF- α in early DR procedure has been unelucidated. **Objective** This study was to investigate the effects of PDC on permeability of BRB and its mechanism in diabetic rats. **Methods** Fifty clear adult SD rats were divided into normal control group, diabetic model group and low- (100 mg/[kg · d]), moderate- (200 mg/[kg · d]) and high-dose (300 mg/[kg · d]) PDC groups, 10 rats for each group. Streptozotocin was intraperitoneally injected to establish diabetic model in 40 rats, expect for normal control group. PDC at the concentrations of 100, 200 and 300 mg/(kg · d) was intragastrically administered in the low-, moderate- and high-dose groups respectively at 6 weeks after modeling, and normal saline solution was used at the same way in the normal control group and diabetic model group. Evans blue was perfused via cardiac chamber and eyes were obtained. Evans blue leakage was measured to evaluate the BRB permeability. The relative expressions of TNF- α , zonula occludens-1 (ZO-1), occludin and claudin-5 proteins were detected by Western blot; TNF- α contents in the retina and serum of the rats were detected by ELISA. **Results** The leakage contents of Evans blue in the retinas were (12.68 \pm 1.30), (30.45 \pm 2.60), (22.12 \pm 1.15), (17.99 \pm 1.00) and (21.49 \pm 1.00) in the normal control group, diabetic model group and low-, moderate- and high-dose PDC groups, respectively, and the retinal leakage contents in the diabetic model group were significantly higher than those in the normal control group, and the retinal leakage contents in the low-, moderate- and high-dose PDC groups were lower than those in the diabetic model group (all at $P < 0.01$). Western blot showed that the relative expression level of retinal TNF- α was significantly higher in the diabetic model group compared with the normal control group (1.12 \pm 0.10 vs. 0.27 \pm 0.03), and that in the diabetic model group was significantly higher than that in the normal control group; while the relative expression levels of retinal TNF- α in different doses PDC groups were significantly lower, and the relative expression levels of retinal ZO-1, occludin and claudin-5 were significantly higher than those in the diabetic model group (all at $P < 0.05$). ELISA showed that the concentrations of retinal and serum TNF- α were higher in the diabetic model group compared with the normal control group, and those in the different doses of PDC groups were lower than those in the diabetic model group (all at $P < 0.05$). No significant differences were found among various doses of PDC groups (all at $P > 0.05$). **Conclusions** PDC can improve the permeability of BRB by down-regulating the expression of TNF- α and up-regulating the expressions of tight junction proteins in the retina of diabetic rats, which is probably related to suppressing the development of early DR.

[Key words] Diabetes mellitus/complications; Blood-retinal barrier; Tight junction proteins; Tumor necrosis factor- α ; Chinese herbal medicine; Polysaccharides of dendrobium candidum; Rats, SD

Fund program: Foundation of Innovate Top Discipline of Chinese and Western Integrative Medicine by Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (2014XK003)

研究证实,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种慢性亚临床型炎症性疾病^[1],早期改变以白细胞黏附、聚集及移行,血管通透性增加,血-视网膜屏障(blood-retina barrier, BRB)破坏为主要病理特征。BRB损伤是早期DR的重要病理基础^[2],也是DR炎症性疾病的主要表现之一^[3]。BRB正常组织结构和功能的维持与内皮细胞之间的紧密连接关系密切。参与形成紧密连接复合体的蛋白质包括连接蛋白-5(claudin-5)、闭合蛋白(occludin)多种跨膜蛋白及闭锁小带1(zonula occludens-1, ZO-1)蛋白等膜相关蛋白类^[4-5]。高糖环境下视网膜内促炎性细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和炎性因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)含量增加,可作用于视网膜的微血管,诱导细胞间黏附分子-1表达增加,促进白细胞黏附于血管内皮细胞,甚至阻塞血管,导致毛细血管无灌注,破坏BRB^[6-7]。研究发现,

高糖环境下TNF- α 的高表达与紧密连接的破坏有密切关系,抑制TNF- α 表达可增加视网膜内claudin-5、occludin、ZO-1的表达,减轻DR眼BRB的损伤^[8-9]。铁皮石斛是传统的中草药,其资源可再生、药理活性及低毒特性逐渐引起人们的关注。多糖是铁皮石斛中主要的药用活性成分之一,研究发现,石斛多糖在高糖环境下可抑制TNF- α 的高表达^[10],但石斛多糖是否可通过抑制TNF- α 在DR视网膜中的表达而对BRB发挥保护作用尚不清楚。本研究主要探讨铁皮石斛多糖是否能降低糖尿病模型鼠视网膜内TNF- α 的水平,研究铁皮石斛多糖对DR视网膜BRB通透性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级SD成年雄性大鼠50只,体质量120~160g,购自中科院上海实验动物中心,饲养

养于上海中医药大学实验动物中心,饲养室内温度为 (22 ± 1) ℃,12 h 光暗循环,饲料与水消毒后自由摄取,适应性饲养 1 周后禁食不禁水 12 h。实验严格按照国家和上海市中医药大学动物中心动物使用管理条例进行。

1.1.2 主要试剂 石斛多糖褐色粉末(长沙中仁生物有限公司),经上海中医药大学药理实验室检测多糖含量为 50%。使用前用生理盐水溶解,质量浓度分别为 25、50 和 75 mg/ml。链脲佐菌素(美国 Sigma 公司);血糖仪及试纸(美国强生公司);兔抗鼠单克隆 TNF- α 抗体(ab185795,1:500)、兔抗鼠 occludin 单克隆抗体(ab167161,1:1 000)(英国 Abcam 公司);兔抗鼠 claudin-5 单克隆抗体(GTX37283,1:1 000)(美国 GeneTex 公司);鼠抗人 ZO-1 抗体(ab96594;1:1 000)(美国 Santa Cruz 公司);大鼠 TNF- α ELLSA 试剂盒(上海欣博盛生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 应用随机数字表法将 50 只大鼠分为正常对照组、糖尿病模型组、低剂量石斛多糖组、中剂量石斛多糖组、高剂量石斛多糖组,每组 10 只大鼠,低、中、高剂量石斛多糖剂量分别为 100、200 和 300 mg/(kg·d)。中剂量石斛多糖组给药量依据 2010 版《药典》中人的用量 6~12 g/d,取 10 g 计算。用新配制的链脲佐菌素溶液(冰浴条件下用 pH 值为 4.2 的柠檬酸钠缓冲液新鲜配成质量分数 1% 的溶液,按照 55 mg/kg 的剂量行大鼠腹腔内注射,其他 10 只大鼠行等容量柠檬酸钠缓冲液腹腔内注射作为正常对照组。大鼠注射后 72 h 收集尾静脉测血糖,血糖水平 ≥ 16.7 mmol/L 为糖尿病大鼠造模成功。造模失败者及时补充大鼠。于造模成功后 6 周低、中、高剂量石斛多糖组分别用 100 mg/kg(25 mg/ml)、200 mg/kg(50 mg/ml)、300 mg/kg(75 mg/ml)石斛多糖灌胃。正常对照组和糖尿病模型组采用生理盐水灌胃。

1.2.2 视网膜中伊文思蓝测定视网膜血管渗漏量 药物灌胃后 8 周于大鼠尾静脉注射伊文思蓝(45 mg/kg),待大鼠皮肤变蓝后于腹腔内注射质量分数 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)行全身麻醉,每隔 30 min 经股动脉抽血 200 μ l,置入抗凝管,共抽血 4 次。离心半径为 26.5 cm,3 000~4 000 r/min 离心 10 min,取上清,检测血浆中伊文思蓝质量浓度;伊文思蓝进入血液循环后 2 h 剪开大鼠胸腔,经左心室灌注 0.5 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 70 ml/min,持续 2 min 以充分清除体内伊文思蓝染液,渗漏出的染液留在视网膜内。处死大鼠后取

大鼠双侧眼球,一侧眼球于体积分数 37% 的中性甲醛溶液中固定后石蜡包埋,用于视网膜组织病理学检查;另一侧眼去除眼前节组织,解剖显微镜下钝性分离视网膜组织,并称量。用甲酰胺萃取视网膜中伊文思蓝,15 000 r/min 离心 30 min,过滤,取上清,通过甲酰胺中伊文思蓝的标准曲线计算视网膜上清液伊文思蓝质量浓度。实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 法测定各组大鼠视网膜内 occludin、claudin-5、ZO-1 及 TNF- α 的表达 使用强细胞裂解液提取各组视网膜总蛋白,以 3:1 的比例加入上样缓冲液并充分混匀,100℃水浴 10 min 至蛋白变性。应用双辛丁酸(bicinchoninic acid,BCA)法测定各组视网膜组织总蛋白,按每孔 40 μ g 蛋白量调整上样,电泳并转膜,BSA 封闭 1 h,添加相应一抗,4℃孵育过夜。TBST(等渗盐溶液加 Tris-HCl 缓冲液,用 1 mol/L HCl 调整 pH 至 7.4,用 Tween 配置成缓冲液)洗后添加相应二抗,常温孵育 1 h,最后显影定影。采用 Image J 图像处理软件进行灰度分析,以各目的蛋白与其总蛋白灰度值的比值表示目的蛋白相对表达量。

1.2.4 ELISA 法检测大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 含量 收集各组大鼠血清,每孔 100 μ l,设 1 个复孔,按照大鼠 IL-6、TNF- α 的 ELISA 试剂盒说明书进行操作。取待测血清,3 000~4 000 r/min 离心 10 min,去除标本悬浮物;室温下在相应孔中加入相应浓度的标准品及标本,36℃环境下孵育 90 min,洗板 5 次;在相应孔中加入 100 μ l 生物素化抗体工作液,封闭条板孔,36℃孵育 90 min;洗板 5 次;在相应孔中加入 100 μ l 酶结合物稀释液及生物素化抗体工作液,封闭条板孔,36℃孵育 90 min;洗板 5 次;每孔加入显色底物 TMB 100 μ l,避光条件下 36℃孵箱中孵育 15 min;各孔加入 100 μ l 终止液,用酶联免疫检测仪在波长 450 nm 处测量各孔吸光度(A)值,获取大鼠血清中 IL-6 及 TNF- α 含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用完全随机分组单因素干预多水平研究设计,正常对照组、糖尿病模型组及低、中、高石斛多糖组间视网膜伊文思蓝渗漏量、视网膜和血清中 TNF- α 含量、视网膜中 TNF- α 、claudin-5、occludin、ZO-1 蛋白相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠视网膜伊文思蓝渗漏量的比较

药物干预后 8 周,正常对照组、糖尿病模型组和低、中、高剂量石斛多糖组大鼠视网膜伊文思蓝渗漏量明显不同,组间总体比较差异有统计学意义($F = 18.27, P < 0.01$),糖尿病模型组大鼠视网膜伊文思蓝渗漏量明显高于正常对照组,差异有统计学意义($t = 6.13, P = 0.00$);低、中、高剂量石斛多糖组大鼠视网膜伊文思蓝渗漏量明显低于糖尿病模型组,差异均有统计学意义($t = 2.94, P = 0.04; t = 4.50, P = 0.01; t = 3.25, P = 0.03$);各剂量石斛多糖组之间大鼠视网膜伊文思蓝渗漏量的比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 1)。

2.2 各组大鼠视网膜中 TNF- α 、ZO-1、occludin 和 claudin-5 蛋白相对表达量的比较

Western blot 法检测结果显示,正常对照组、糖尿病模型组及低、中、高石斛多糖组大鼠视网膜中 TNF- α 、claudin-5、occludin、ZO-1 蛋白相对表达量的总体比较差异均有均统计学意义($F = 20.64, 6.44, 5.18, 11.02$, 均 $P < 0.01$)。与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠视网膜中 TNF- α 蛋白相对表达量明显升高,

claudin-5、occludin、ZO-1 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义($t = 8.013, P = 0.001; t = 4.853, P = 0.008; t = 3.92, P = 0.017; t = 3.85, P = 0.018$)。与糖尿病模型组比较,低、中、高剂量石斛多糖组大鼠视网膜 TNF- α 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义($t = 5.204, P = 0.007; t = 5.920, P = 0.004; t = 3.866, P = 0.018$);低、中、高剂量石斛多糖组大鼠视网膜 claudin-5、occludin、ZO-1 蛋白相对表达量明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);各剂量石斛多糖组间大鼠视网膜中 TNF- α 、claudin-5、occludin、ZO-1 蛋白相对表达量的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(图 1,表 2)。

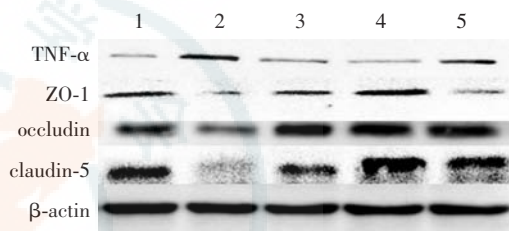


图 1 Western blot 法检测各组大鼠视网膜中 TNF- α 、ZO-1、occludin 及 claudin-5 蛋白表达电泳图 1:正常对照组 2:糖尿病模型组 3:低剂量石斛多糖组 4:中剂量石斛多糖组 5:高剂量石斛多糖组 TNF:肿瘤坏死因子;ZO:闭锁小带;occludin:闭合蛋白;claudin-5:连接蛋白-5

表 1 各组大鼠视网膜伊文思蓝渗漏量的比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$)

组别	样本量	依文思蓝渗漏量
正常对照组	10	12.68 \pm 1.30
糖尿病模型组	10	30.45 \pm 2.60 ^a
低剂量石斛多糖组	10	22.12 \pm 1.15 ^{ab}
中剂量石斛多糖组	10	17.99 \pm 1.00 ^{ab}
高剂量石斛多糖组	10	21.49 \pm 1.00 ^{ab}
F 值		18.27
P 值		<0.01

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与糖尿病模型组相比,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验)

表 2 各组大鼠视网膜中 TNF- α 、ZO-1、occludin 及 claudin-5 蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	TNF- α	ZO-1	occludin	claudin-5
正常对照组	10	0.27 \pm 0.03	0.80 \pm 0.09	0.89 \pm 0.16	0.92 \pm 0.08
糖尿病模型组	10	1.12 \pm 0.10 ^a	0.33 \pm 0.08 ^a	0.25 \pm 0.04 ^a	0.39 \pm 0.07 ^a
低剂量石斛多糖组	10	0.47 \pm 0.07 ^{ab}	0.61 \pm 0.05 ^{ab}	0.61 \pm 0.32 ^{ab}	0.69 \pm 0.07 ^{ab}
中剂量石斛多糖组	10	0.34 \pm 0.08 ^{ab}	0.61 \pm 0.06 ^{ab}	0.87 \pm 0.19 ^{ab}	0.97 \pm 0.05 ^{ab}
高剂量石斛多糖组	10	0.65 \pm 0.06 ^{ab}	0.57 \pm 0.02 ^{ab}	0.54 \pm 0.07 ^{ab}	0.77 \pm 0.07 ^{ab}
F 值		20.64	6.44	5.18	11.02
P 值		<0.05	<0.01	0.02	<0.01

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与糖尿病模型组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) TNF:肿瘤坏死因子;ZO:闭锁小带;occludin:闭合蛋白;claudin:连接蛋白

2.3 各组大鼠视网膜和血清中 TNF- α 含量的比较

ELISA 法检测结果显示,正常对照组、糖尿病模型组及低、中、高石斛多糖组大鼠视网膜及血清中 TNF- α 含量总体比较差异均有统计学意义($F = 7.07, 20.16$, 均 $P < 0.01$)。糖尿病模型组大鼠视网膜及血清中 TNF- α 含量明显高于正常对照组,差异均有统计学意义($t = 4.74, P < 0.01; t = 9.12, P < 0.01$)。低、中、高剂量石斛多糖组大鼠视网膜中 TNF- α 含量较糖尿病模

型组均下降,差异均有统计学意义($t = 3.297, P = 0.004; t = 3.538, P = 0.002; t = 3.301, P = 0.004$);各剂量石斛多糖组大鼠血清中 TNF- α 含量较糖尿病模型组均降低,差异均有统计学意义($t = 5.138, P < 0.001; t = 5.976, P < 0.001; t = 6.179, P < 0.001$)。各剂量石斛多糖组间视网膜和血清中 TNF- α 含量的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 3)。

表 3 各组大鼠视网膜和血清中 TNF- α 含量的比较 ($\bar{x} \pm s, A$ 值)

组别	样本量	不同组织 TNF- α 含量	
		视网膜	血清
正常对照组	10	23.26 \pm 0.91	3.44 \pm 0.06
糖尿病模型组	10	29.80 \pm 0.98 ^a	4.33 \pm 0.08 ^a
低剂量石斛多糖组	10	25.04 \pm 1.07 ^{ab}	3.74 \pm 0.09 ^{ab}
中剂量石斛多糖组	10	25.32 \pm 0.80 ^{ab}	3.68 \pm 0.08 ^{ab}
高剂量石斛多糖组	10	25.93 \pm 0.65 ^{ab}	3.70 \pm 0.07 ^{ab}
F 值		7.07	20.16
P 值		<0.01	<0.01

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与糖尿病模型组比较,^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) TNF:肿瘤坏死因子

3 讨论

研究证实,作为一种促炎因子, TNF- α 是已知的 DR 病程中炎症反应引发因子^[12]。有研究显示,非增生性及增生性 DR 患者的玻璃体、视网膜及血清中 TNF- α 含量较正常对照组升高,且与 DR 的严重程度相关,且随着炎症反应的加重而逐渐升高^[13-14]。TNF- α 可诱导白细胞募集滞留,导致血管闭塞,血流减少,血管通透性增加,并改变血管内皮细胞形态^[15],且 TNF- α 的血清水平与糖化血红蛋白及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的水平具有相关性^[16]。

高糖状态下 TNF- α 及诱导型一氧化氮合酶在血管内皮细胞中表达增加,伴内源性一氧化氮表达增加并选择性地作用于微囊蛋白(caveolin-1)蛋白质分子位点,诱导 caveolin-1 蛋白亚硝基化,并吞噬紧密连接蛋白,亚硝基化 caveolin-1 蛋白诱导增加的 caveolin-1 蛋白相互聚集、融合、伸展,最终形成窗孔结构,使血管的通透性增加^[6]。此外, TNF- α 通过激活蛋白激酶 C 及核转录因子 κ B 信号途径减少紧密连接蛋白在视网膜内皮细胞中的表达,使视网膜血管通透性增加^[17-18]。

石斛是一种中草药,具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳等功效。石斛的主要化学成分有多糖类、生物碱类、氨基酸、联苄类、菲类、倍半萜类等,其中多糖含量较高^[19]。临床常以石斛夜光丸为主方制备成加减养血活血之中药,有助于改善视力,促进视网膜出血和渗出的吸收,减轻黄斑水肿,延缓 DR 的发生和发展^[20]。动物研究表明,石斛多糖可抑制 TNF- α 、IL-10、IL-6 和干扰素等促炎性细胞因子的表达^[21],从而发挥抗炎作用。石斛对 DR 的治疗作用研究表明,石斛可降低 DR 组大鼠视网膜内病理性新生血管的发生,降低 DR 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量;下调视网

膜中 TNF- α 基因的表达^[22]。而关于石斛多糖在 DR 早期的抗炎作用鲜见研究。

本研究中采用石斛多糖对糖尿病模型大鼠进行灌胃,持续 8 周后分别采用 Western blot 法和 ELLSA 法检测大鼠视网膜及血清中 TNF- α 蛋白表达水平,探讨 DR 进展过程中石斛多糖对 TNF- α 表达的影响,结果表明石斛多糖可抑制早期视网膜中 TNF- α 的表达和血清中 TNF- α 含量,石斛多糖可上调糖尿病大鼠视网膜内上述紧密连接蛋白的表达,抑制 TNF- α 表达,从而对糖尿病大鼠 BRB 发挥保护作用。本实验结果显示,低、中、高石斛多糖的药效并未呈现明显的量效关系,高剂量可能并不会增加药物疗效,但本研究中的这种效应可能与选择的石斛多糖药物浓度梯度差距不大有关,关于石斛多糖对糖尿病大鼠 BRB 发挥保护作用的最小有效剂量尚有待进一步研究。

目前,临床上 DR 早期进行抗炎治疗的方法主要有糖皮质激素、VEGF 抑制剂及非甾体类抗炎药的应用^[23],但疗效较为短暂,需要长期注射,治疗成本较高,临床依从性差,且长期局部注射易引起继发性白内障、青光眼和眼内炎等并发症^[24],这些药物在早期预防 DR 方面的应用受到一定的限制。本研究证实,石斛多糖可降低糖尿病大鼠视网膜及血清中 TNF- α 的表达水平,上调紧密连接蛋白 ZO-1、occludin、claudin-5 的表达,改善 DR 视网膜 BRB 的通透性,可为 DR 的早期治疗提供新的途径。

参考文献

- [1] El-Asrar AM. Role of inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. Middle East Afr J Ophthalmol, 2012, 19(1): 70-74. DOI: 10.4103/0974-9233.92118.
- [2] Pavan B, Capuzzo A, Forlani G. High glucose-induced barrier impairment of human retinal pigment epithelium is ameliorated by treatment with Goji berry extracts through modulation of cAMP levels [J]. Exp Eye Res, 2014, 120: 50-54. DOI: 10.1016/j.exer.2013.12.006.
- [3] 刘巨平. 糖尿病视网膜病变:一种非可控性炎症 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(1): 94-96. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.019.
- [4] Liu JP. Diabetic retinopathy: a nonresolving inflammation [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(1): 94-96. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.019.
- [5] Hammes HP, Feng Y, Pfister F, et al. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression [J]. Diabetes, 2011, 60(1): 9-16. DOI: 10.2337/db10-0454.
- [6] Franke WW. Discovering the molecular components of intercellular junctions—a historical view [J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(3): a003061 [2014-10-15]. http://cshperspectives.cshlp.org/content/1/3/a003061.long. DOI: 10.1101/cshperspect.a003061.
- [7] Ferrero E, Zocchi MR, Magni E, et al. Roles of tumor necrosis factor p55 and p75 receptors in TNF-alpha-induced vascular permeability [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(4): 1173-1179.
- [8] Tarr JM, Kaul K, Chopra M, et al. Pathophysiology of diabetic retinopathy [EB/OL]. ISRN Ophthalmology, ID 343560 [2013-01-15]. http://dx.doi.org/10.1155/2013/343560.
- [9] Chen J, Braet F, Brodsky S, et al. VEGF-induced mobilization of

- caveolae and increase in permeability of endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(5): C1053-1063.
- [9] Rosales MA, Silva KC, Duarte DA, et al. Endocytosis of tight junctions caveolin nitrosylation dependent is improved by cocoa via opioid receptor on RPE cells in diabetic conditions [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(9): 6090-6100. DOI: 10.1167/iovs.14-14234.
- [10] 蔡海兰, 黄晓君, 聂少平, 等. 铁皮石斛多糖对 RAW2647 细胞分泌 TNF- α 的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(11): 1553-1556. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2012.11.017.
- Cai HL, Huang XJ, Nie SP, et al. Effects of polysaccharides from *Dendrobium Officinale* on the production of TNF- α by RAW264.7 cells [J]. *Chin Pharmacol Bulletin*, 2012, 28(11): 1553-1556. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2012.11.017.
- [11] Qaum T, Xu Q, Joussen AM, et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(10): 2408-2413.
- [12] Zhang W, Liu H, Rojas M, et al. Anti-inflammatory therapy for diabetic retinopathy [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(5): 609-628. DOI: 10.2217/imt.11.24.
- [13] Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, et al. Increases of vitreous monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin 8 levels in patients with concurrent hypertension and diabetic retinopathy [J]. *Retina*, 2011, 31(9): 1951-1957. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31820d3cee.
- [14] Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor with chemokines in the vitreous in diabetic retinopathy [J]. *Retina*, 2010, 30(2): 339-344. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181bd2f44.
- [15] Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, et al. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Exp Eye Res*, 2012, 96(1): 181-190. DOI: 10.1016/j.exer.2011.12.003.
- [16] Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy [J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2011, 53(2): 44-50.
- [17] Aveleira CA, Lin CM, Abcouwer SF, et al. TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability [J]. *Diabetes*, 2010, 59(11): 2872-2882. DOI: 10.2337/db09-1606.
- [18] Palenski TL, Sorenson CM, Sheibani N. Inflammatory cytokine-specific alterations in retinal endothelial cell function [J]. *Microvasc Res*, 2013, 89: 57-69. DOI: 10.1016/j.mvr.2013.06.007.
- [19] 凌志扬, 房玉良. 石斛的化学成分及药理作用 [J]. *中国当代医药*, 2012, 19(5): 13-14, 16. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2012.05.005.
- Ling ZY, Fang YL. Chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium* [J]. *Chin Mod Med*, 2012, 19(5): 13-14, 16. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2012.05.005.
- [20] 王重洋. 中药治疗非增生性糖尿病视网膜病变的临床研究 [J]. *中国保健营养*, 2013, (7): 524-525.
- [21] Shie JJ, Chen CA, Lin CC, et al. Regioselective synthesis of di-glycosylflavones possessing anti-inflammation activities [J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8(19): 4451-4462. DOI: 10.1039/c0ob00011f.
- [22] Gong CY, Yu ZY, Lu B, et al. Ethanol extract of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl ameliorates diabetic retinopathy and its mechanism [J]. *Vascul Pharmacol*, 2014, 62(3): 134-142. DOI: 10.1016/j.vph.2014.04.007.
- [23] Snjezana K, Martina T, Antonela GA, et al. Inflammation and pharmacological treatment in diabetic retinopathy [EB/OL]. *Mediators of Inflammation*, ID 213130 [2013 september 17]. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/213130>.
- [24] Gologorsky D, Thanos A, Vavvas D. Therapeutic interventions against inflammatory and angiogenic mediators in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 629452. DOI: 10.1155/2012/629452.

(收稿日期: 2016-10-20)

(本文编辑: 尹卫靖 张荻)

读者 · 作者 · 编者

本刊对一稿两投的处理

作者投稿请勿一稿两投或一稿多投。本刊编辑部发现一稿两投并经证实后,稿件将不予审理并对作者进行告知。如果发现一稿两用,本刊将做出如下处理:(1)在本刊杂志及网站上刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明,并在中华医学会系列杂志上通报。(2)向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。(3)2年内拒绝发表其作为第一作者或通信作者的任何来稿。

文章未在公开发表物上发表者、以不同文字分别投往国外期刊和国内期刊以供不同受众者阅读者不属于一稿两投的行为,但本刊严格遵照国际医学期刊编辑委员会《国际生物医学期刊投稿统一要求》(http://www.icmje.org/urm_main.html),属于以不同语言文字二次发表者,请作者在首次接受稿件的期刊发表后1周再另行投稿,并请提供首次发表期刊同意以不同语言发表的同意函。

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或1975年赫尔辛基宣言(2005年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

(本刊编辑部)