

· 实验研究 ·

虾青素对 1 型糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用

杨明¹ 赵通² 邓婷婷² 潘琳² 王志军²¹首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所 北京市眼科学与视觉科学重点实验室, 北京 100730; ²中日友好医院眼科, 北京 100029

通信作者: 王志军, Email: wangzj301@sina.com

【摘要】 目的 观察虾青素对 1 型糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用及相关机制。**方法** 36 只 SPF 雄性大鼠应用腹腔内一次性注射质量分数 1% 链脲佐菌素 (STZ) 方法制备大鼠糖尿病模型, 采用随机数字表法分为糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组, 每组 9 只。低剂量虾青素组和高剂量虾青素组每日分别给予 20 mg/kg 和 100 mg/kg 虾青素灌胃, 糖尿病组同法给予等量橄榄油。另设对照组大鼠 12 只, 同法给予等量枸橼酸钠缓冲液。每 2 周测量大鼠血糖和体质量。24 周后, 过量水合氯醛麻醉法处死大鼠, 眼球称质量标记。经胰蛋白酶消化制作视网膜毛细血管铺片, 每张铺片任意选取 5 个视野计算周细胞与无细胞性毛细血管的数量。通过免疫组织化学、实时 PCR 和 Western blot 法测定各组大鼠视网膜组织中白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和凋亡蛋白家族 caspase-3 的相对表达量。**结果** 低剂量虾青素组和高剂量虾青素组大鼠体质量均高于糖尿病组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。低剂量虾青素组和高剂量虾青素组大鼠血糖较糖尿病组降低, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。高倍镜下, 对照组毛细血管周细胞核小, 呈圆形或三角形; 糖尿病组视网膜毛细血管局部扩张、狭窄, 扭结成襻。低倍镜下, 糖尿病组可见视网膜动静脉主干及分支迂曲, 毛细血管网紊乱; 高剂量虾青素组血管走向较迂曲, 毛细血管局部扩张、狭窄程度有所减轻。各组周细胞计数分别为 466.4 ± 23.2 、 207.3 ± 31.7 、 298.1 ± 27.1 和 312.2 ± 19.5 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 34.420, P = 0.047$), 其中低剂量虾青素组、高剂量虾青素组周细胞计数高于糖尿病组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。各组无细胞毛细血管计数分别为 5.2 ± 2.3 、 32.9 ± 12.7 、 14.5 ± 9.1 和 16.5 ± 3.5 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 47.340, P = 0.021$), 其中低剂量虾青素组、高剂量虾青素组无细胞性毛细血管数量少于糖尿病组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。对照组视网膜各层组织中炎症因子呈微量表达; 糖尿病组大鼠视网膜组织中神经节细胞层、丛状层及颗粒层中均呈强阳性表达; 低剂量虾青素组和高剂量虾青素组炎症因子表达均较糖尿病组弱。低剂量虾青素组、高剂量虾青素组 IL-6、TNF- α 和 caspase-3 的吸光度 (A) 值较糖尿病组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。低剂量虾青素组 IL-6、TNF- α 和 caspase-3 的 mRNA 相对表达量分别为 0.87 ± 0.23 、 0.91 ± 0.34 和 1.07 ± 0.15 , 高剂量虾青素组分别为 0.81 ± 0.31 、 0.85 ± 0.39 和 0.95 ± 0.11 , 较糖尿病组的 1.63 ± 0.47 、 1.57 ± 0.53 和 1.51 ± 0.32 均减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。低剂量虾青素组 IL-6、TNF- α 和 caspase-3 蛋白相对表达量分别为 0.63 ± 0.33 、 0.51 ± 0.14 和 0.60 ± 0.13 , 高剂量虾青素组分别为 0.69 ± 0.22 、 0.49 ± 0.15 和 0.57 ± 0.22 , 均低于糖尿病组的 1.43 ± 0.51 、 0.79 ± 0.23 和 1.15 ± 0.67 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** 虾青素可抑制视网膜组织内炎症因子及凋亡蛋白的表达, 从而抑制糖尿病大鼠的周细胞凋亡, 保护视网膜毛细血管。

【关键词】 虾青素; 糖尿病; 视网膜; 周细胞; 抗凋亡; 抗炎

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200519-00360

Protective effect of astaxanthin on the retinopathy of type 1 diabetic ratsYang Ming¹, Zhao Tong², Deng Tingting², Pan Lin², Wang Zhijun²¹Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China; ²Department of Ophthalmology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Corresponding author: Wang Zhijun, Email: wangzj301@sina.com

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of astaxanthin on the retinopathy in rats with type 1 diabetes and related mechanism. **Methods** Thirty-six male SPF rats received intraperitoneal injection of 1% streptozotocin (STZ) to prepare type 1 diabetes model. The rats were randomly assigned to the diabetes group, low dose astaxanthin group and high dose astaxanthin group by a random number table. The rats in the low dose astaxanthin group and high dose astaxanthin group received respectively astaxanthin 20 mg/kg and 100 mg/kg by gavage everyday. The rats in the diabetes group received an equal volume of olive oil. Twelve rats received an equal

volume of sodium citrate as the control group. Blood glucose and body mass were measured every 2 weeks. After 24 weeks, the retina was digested to make retinal capillary network preparation. The number of pericytes and acellular strands was compared among the different experimental groups. The relative expressions of anti-inflammatory cytokines in retinal tissue were detected by immunohistochemistry, real-time PCR and Western blot. The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** Body mass of the rats in the low dose astaxanthin group and high dose astaxanthin group was significantly higher than that in the diabetes group (both at $P < 0.05$). Blood glucose levels in the low dose astaxanthin group and high dose astaxanthin group were significantly lower than that in the diabetes group (both at $P < 0.05$). In the control group, main artery was round, uniform, and strongly stained. The vein was lightly stained and had a large diameter. In the diabetes group, retinal arteriovenous trunk and branches appeared tortuous at a low magnification, with capillary network disorder. The morphology of the capillaries showed pathology in the low dose astaxanthin group and high dose astaxanthin group, but the vascular tortuosity, dilatation and stenosis were reduced in comparison with the diabetes group. The number of pericytes was 466.4 ± 23.2 , 207.3 ± 31.7 , 298.1 ± 27.1 and 312.2 ± 19.5 among different groups, with a significant difference among them ($F = 34.420$, $P = 0.047$). The number of acellular strands were 5.2 ± 2.3 , 32.9 ± 12.7 , 14.5 ± 9.1 and 16.5 ± 3.5 among different groups, with a significant difference among them ($F = 47.340$, $P = 0.021$). The relative expression of IL-6, TNF- α and caspase-3 mRNA in the low dose astaxanthin group was 0.87 ± 0.23 , 0.91 ± 0.34 and 1.07 ± 0.15 , the relative expression in the high dose astaxanthin group was 0.81 ± 0.31 , 0.85 ± 0.39 and 0.95 ± 0.11 , which was significantly decreased in comparison with the diabetes group (1.63 ± 0.47 , 1.57 ± 0.53 and 1.51 ± 0.32) (all at $P < 0.05$). The relative expression of IL-6, TNF- α and caspase-3 protein in the low dose astaxanthin group was 0.63 ± 0.33 , 0.51 ± 0.14 and 0.60 ± 0.13 , the relative expression in the high dose astaxanthin group was 0.69 ± 0.22 , 0.49 ± 0.15 and 0.57 ± 0.22 , which was significantly decreased in comparison with the diabetes group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Astaxanthin may play an important role in protecting pericytes from apoptosis and delaying development and progression of diabetic retinopathy in rats. Additionally, astaxanthin can inhibit release of anti-apoptosis and anti-inflammatory cytokines.

[Key words] Astaxanthin; Diabetes; Retina; Pericyte; Anti-apoptosis; Anti-inflammation

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200519-00360

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是常见的糖尿病微血管病变,是 20~74 岁糖尿病人群致盲的首要原因。DR 的发病机制未被全面认识,近年周细胞凋亡和炎性损伤在糖尿病及其并发症中的作用备受关注。糖尿病患者持续高糖、低氧状态下,早期出现视网膜微循环受损^[1],进一步导致白细胞聚积,黏附分子增加,视网膜内皮细胞功能障碍以及视网膜灌注异常,如毛细血管的阻塞和退行性改变,均有轻度慢性炎症的病理特征。研究表明,白细胞在 DR 发展过程中起重要作用。趋化因子和黏附因子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎性因子均参与 DR 的炎症反应过程,且与 DR 严重程度相关^[2-4]。虾青素的化学名称为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β , β' -胡箩卜素。天然虾青素广泛存在于自然界,海洋藻类、鱼、虾和蟹等海洋生物体内,植物的叶、花、果及鸟类羽毛中也存在虾青素,主要起显色作用。研究证实,虾青素能抗氧化、抗炎、抗细胞凋亡,预防心、脑血管疾病,延缓糖尿病肾病的发生和发展,其

抗炎作用逐渐引起重视。虾青素可显著降低肥胖小鼠脾细胞中 TNF- α mRNA 的相对表达量,从而抑制肝脏组织的炎症反应^[5]。虾青素可以降低糖尿病大鼠视网膜中相关炎性因子的表达^[6-7]。目前尚未发现关于虾青素对早期 DR 微血管形态以及视网膜炎性因子的相关研究。本研究中观察虾青素对于链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的 1 型糖尿病大鼠早期视网膜病变的周细胞凋亡和视网膜中相关炎性因子表达的影响,进一步阐述虾青素在 DR 中的抗炎机制,为早期 DR 的药物治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 50 只(北京华阜康生物科技有限公司),体质量 220~260 g,饲养于中日友好临床研究所 SPF 级中心动物实验室[许可证号:SYXK(京)2010-0011],自由进食饮水,标准饲料喂养,每日更换新鲜垫料,温度 18~22 °C。扩瞳条件下检查 SD 大鼠的双眼前节和眼底,排除屈光间质和眼底异常者。实验动物的饲养和使用符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 STZ 溶液(美国 Sigma 公司);兔抗鼠 IL-6、TNF- α 、caspase-3 抗体(武汉博士德生物工程有限公司);山羊抗兔二抗 IgG、链霉卵白素工作液(武汉华美生物科技有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);AMV 逆转录酶(美国 Ambion 公司);PCR Master Mix(美国 Promega 公司);IL-6、TNF- α 和 caspase-3 一抗(美国 R&D 公司);羊抗兔-HRP(美国 Life Technologies 公司);ECL 显色液(上海康成公司)。解剖显微镜(日本 Nikon 公司);血糖仪(瑞士 Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DR 模型的建立及实验分组 将 50 只大鼠按照随机数字表法随机分为对照组 12 只和糖尿病组 38 只。糖尿病组大鼠造模前禁食 12 h,按照 60 mg/kg 的剂量(STZ 溶于 0.05 mmol/L 枸橼酸钠缓冲液, pH 4.5)一次性腹腔内注射质量分数 1% STZ 溶液。对照组大鼠同法注射等量枸橼酸钠缓冲液。注射后 72 h 后尾尖采血测定血糖,连续 3 d 血糖值 >16.7 mol/L 者为造模成功。36 只大鼠造模成功,按照随机数字表法分为糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组。参照文献[8],虾青素饲喂量 = 最小抑制浓度 \times 20;每日低剂量虾青素组大鼠饲喂量为 20 mg/kg,高剂量虾青素组为最小浓度的 5 倍,即每日 100 mg/kg,无不良反应。过量水合氯醛麻醉处死大鼠,冰浴下完整摘取双侧眼球,称质量标记。

1.2.2 大鼠一般情况观察 造模成功后 3 d,每隔 2 周 8:00 测量大鼠体质量及血糖,观察大鼠的毛发、精神状态和饮水量。

1.2.3 视网膜铺片法观察各组视网膜血管形态及周细胞计数 每组取 6 只眼球,解剖显微镜下沿大鼠眼球角巩膜缘环形切开,去除角膜和晶状体,将眼球后段置于装有蒸馏水的平皿中,钝性分离视网膜与脉络膜,待周围完全松解后使用纤维剪剪断视神经,取出完整视网膜。在眼球一侧放射状切开,将视网膜置于装有 10 ml 质量分数 3% 胰蛋白酶溶液的试管中。37 $^{\circ}$ C 水浴箱消化 3 h,期间振荡 3~4 次。将已完成消化的视网膜置于装有蒸馏水的平皿中,撕除残存内界膜,轻弹去除遗留的神经组织。光学显微镜下可见一菲薄半透明的血管网,将其移到载玻片上,自然干燥,过碘酸希夫(periodic acid schiff, PAS)染色,于 400 倍显微镜下计数视网膜中间区域 5 个视野中的毛细血管细胞数量(周细胞和内皮细胞)及无细胞血管数。

1.2.4 免疫组织化学法检测视网膜组织中促炎因子的表达 每组取 6 只眼球,去除角膜及眼内容物,室温

下眼杯置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 3 d,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,将眼杯浸入石蜡包埋盒底部包埋切片,烤片后脱蜡,行抗原热修复, H_2O_2 封闭后用正常山羊血清工作液封闭,滴加兔抗鼠 IL-6(工作浓度 1:100)、TNF- α (工作浓度 1:100)和 caspase-3(工作浓度 1:100)抗体。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,复温冲洗后滴加山羊抗兔二抗 IgG,室温下孵育 15 min,冲洗后滴加生物素标记链霉卵白素工作液室温下孵育 15 min。DAB 染色后复染核,脱水,透明,封片。每张切片任意选取 3 个视野(400 倍)记录拍照,用 Image Pro Plus 6.0 图像处理分析软件分析各组染色区的吸光度(A)值。

1.2.5 实时定量 PCR 法检测大鼠视网膜组织中促炎因子的表达 每组取 6 只眼球,在解剖显微镜下取出视网膜组织,使用 Trizol 试剂提取视网膜中总 RNA,采用 Primer 3.0 软件设计 PCR 引物,引物序列见表 1。用 AMV 逆转录酶合成 cDNA,以 β -actin 为内参,采用实时 PCR Master Mix 进行扩增,用 Light Cycler 480 系统进行检测,PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,共 40 个循环;熔解曲线分析:95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,PCR 产物的熔解曲线为单峰。计算 Ct 值,以 2 为底数,差值为指数计算所得值,表示目的基因的相对表达量,实验重复 3 次。

表 1 PCR 引物序列与扩增产物
Table 1 PCR primer sequences and amplified product sizes

引物	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
IL-6	F: ATGAACAGCGATGATGCACT	135
	R: ACGGAAGTCCAGAAGACCAG	
TNF- α	F: GACCAGCCAGGAGGGAGAAC	127
	R: TCCGGAGGGAGATGTGTTC	
Caspase-3	F: TGATCGTCCCAACAAGGA	112
	R: GGGTCTGGCCATGGAA	
β -actin	F: CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	R: TGGCCCATAAATCATCCC	

注:IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子

Note: IL: interleukin; TNF: tumour necrosis factor

1.2.6 Western blot 法检测各组大鼠视网膜组织中促炎因子 IL-6、TNF- α 和 caspase-3 的表达 解剖显微镜下用显微镊取出视网膜组织,加入适量 RIPA 裂解液进行蛋白提取。依照电泳上样量需要,调整蛋白浓度,根据目的蛋白相对分子质量配制质量分数 15% 分离胶和质量分数 5% 浓缩胶。电泳条件:浓缩胶恒压 80 V,约 20 min;分离胶恒压 120 V,电泳至溴酚蓝到凝胶底部,约 120 min,准备 PVDF 膜,切除多余凝胶部分。转膜条件:300 mA 恒流 2 h,用质量分数 5% 脱脂

牛奶室温封闭 1 h; 封闭结束后, 将 PVDF 膜置于杂交袋中, 加入 IL-6、TNF- α 和 caspase-3 一抗封膜机封口后放入 4 °C 冰箱中过夜; 洗膜 3 次后放入羊抗兔-HRP (工作浓度 1:5 000), 室温下轻摇 50 min; TBS-T 洗膜 2 次, PBS 洗膜 1 次, 每次 10 min。将 PVDF 膜浸泡于 ECL 显色液中 1 min, 暗室中曝光、显影并定影。以 β -actin 为内参照, 计算各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 mean \pm SD 表示。经 Levene 检验证实方差齐, 不同时间点大鼠体质量、血糖水平和饮水量、周细胞和内皮细胞比例及视网膜组织中促炎因子的 mRNA 水平和蛋白水平的总体比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。方差不齐者用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

对照组大鼠毛发光亮, 精神状态佳, 体质量呈直线上升趋势。糖尿病组大鼠毛发枯糙凌乱, 精神萎靡, 体质量在造模后呈缓慢上升趋势。

造模后 6 个月, 低剂量虾青素组和高剂量虾青素组大鼠体质量分别为 (390.2 \pm 35.6) g 和 (402.3 \pm 19.6) g, 较糖尿病组大鼠的 (274.3 \pm 10.5) g 增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。低剂量虾青素组和高剂量虾青素组大鼠血糖水平分别为 (29.65 \pm 1.65) mmol/L 和 (29.53 \pm 1.12) mmol/L, 较糖尿病组的 (30.74 \pm 2.74) mmol/L 降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠视网膜铺片表现

高倍镜下, 对照组可见毛细血管周细胞核小, 呈圆形或三角形, 染色较深, 位于毛细血管壁一侧, 内皮细胞核较大, 呈椭圆形或圆形, 染色较浅, 位于毛细血管的中央部位; 糖尿病组可见视网膜毛细血管局部扩张、狭窄, 扭结成襻; 高剂量虾青素组可见毛细血管形态介于两者之间 (图 1A~C)。

低倍镜下, 对照组可见完整的视网膜毛细血管网, 动脉主干染色深, 管径较细, 静脉血管染色较浅, 毛细血管分布规则, 走向平直, 管径粗细均匀, 相互连接成网状; 糖尿病组可见视网膜动静脉主干及分支迂曲, 毛细血管网紊乱; 高

剂量虾青素组形态介于两者之间, 血管走行较迂曲, 毛细血管局部扩张、狭窄程度有所减轻 (图 1D~F)。

2.3 各组大鼠视网膜铺片周细胞和无细胞毛细血管数量比较

对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组周细胞计数分别为 466.4 \pm 23.2、207.3 \pm 31.7、298.1 \pm 27.1 和 312.2 \pm 19.5, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 34.420, P = 0.047$), 其中低剂量虾青素组、高剂量虾青素组周细胞数量多于糖尿病组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。低剂量虾青素组与高剂量虾青素组周细胞数量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2A)。

对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组无细胞毛细血管计数分别为 5.2 \pm 2.3、32.9 \pm 12.7、14.5 \pm 9.1 和 16.5 \pm 3.5, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 47.340, P = 0.021$), 其中低剂量虾青素组、高剂量虾青素组无细胞毛细血管数量多于糖尿病组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 低剂量虾青素组与高剂量虾青素组无细胞毛细血管数量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2B)。

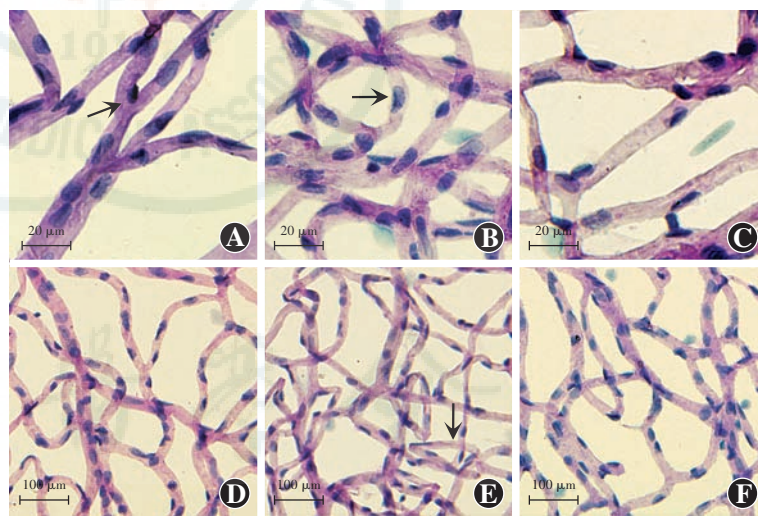


图 1 各组视网膜铺片表现 (PAS) A: 对照组视网膜血管 黑色箭头示周细胞 ($\times 400$, 标尺 = 20 μm) B: 糖尿病组视网膜血管 ($\times 400$, 标尺 = 20 μm) 黑色箭头示内皮细胞 C: 高剂量虾青素组视网膜血管 ($\times 400$, 标尺 = 20 μm) D: 对照组视网膜血管 ($\times 100$, 标尺 = 100 μm) E: 糖尿病组视网膜血管 ($\times 100$, 标尺 = 100 μm) 黑色箭头示无细胞毛细血管 F: 高剂量虾青素组视网膜血管 ($\times 100$, 标尺 = 100 μm)

Figure 1 The appearance of retina retinal vessel preparations among different groups (PAS) A: Normal vessel network in the control group ($\times 400$, bar = 20 μm), the arrow indicated a pericyte B: Abnormal vessels in the diabetes group ($\times 400$, bar = 20 μm), the arrow indicated an endothelial cell C: Vessel network in the high dose astaxanthin group ($\times 400$, bar = 20 μm) D: Normal vessels in the control group ($\times 100$, bar = 100 μm) E: Abnormal vessel network in the diabetes group ($\times 100$, bar = 100 μm), the arrow indicated acellular strands F: Vessels in the high dose astaxanthin group ($\times 100$, bar = 100 μm)

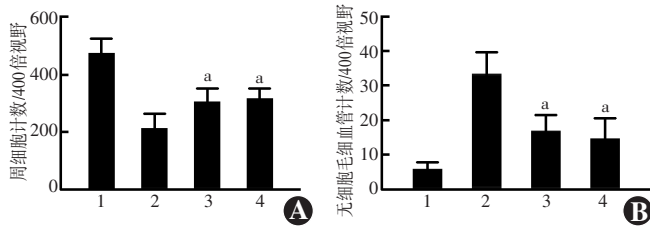


图 2 各组周细胞和无细胞毛细血管计数比较 A: 各组周细胞计数比较(单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 6$) 与糖尿病组比较, $^a P < 0.05$ B: 各组无细胞毛细血管计数比较(单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 6$) 与糖尿病组比较, $^a P < 0.05$ 1: 对照组 2: 糖尿病组 3: 低剂量虾青素组 4: 高剂量虾青素组

Figure 2 Comparisons of numbers of pericytes and acellular strands in retinal capillaries A: Comparison of numbers of pericytes in each group (one-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 6$) compared with the diabetes group, $^a P < 0.05$ B: Comparison of numbers of acellular strands in each group (one-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 6$) compared with the diabetes group, $^a P < 0.05$ 1: control group 2: diabetes group 3: low dose astaxanthin group 4: high dose astaxanthin group

2.4 各组大鼠视网膜组织中炎症因子表达的比较

对照组视网膜各层组织中炎症因子呈微量表达;糖尿病组大鼠视网膜组织中神经节细胞层、丛状层及颗粒层中均呈强阳性表达;低剂量虾青素组和高剂量虾青素组炎症因子表达均较糖尿病组弱(图 3)。

对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组视网膜组织中炎症因子相对表达量总体比较,差异有统计学意义($F = 43.12, P < 0.05$),其中低剂量虾青素组和高剂量虾青素组视网膜组织中炎症因子相对表达量低于糖尿病组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);低剂量虾青素组与高剂量虾青素组视网膜组织中炎症因子的表达比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(图 4)。

2.5 各组视网膜组织中炎症因子 mRNA 水

平比较

对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 IL-6 mRNA 相对表达量分别为 0.38 ± 0.27 、 1.63 ± 0.47 、 0.87 ± 0.23 和 0.81 ± 0.31 , 总体比较差异有统计学意义($F = 21.86, P < 0.05$), 其中低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 IL-6 mRNA 相对表达量低于糖尿病组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 5A)。

对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 TNF- α mRNA 相对表达量分别为 0.42 ± 0.17 、 1.57 ± 0.53 、 0.91 ± 0.34 和 0.85 ± 0.39 , 总体比较差异有统计学意义($F = 13.80, P < 0.05$), 其中低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 TNF- α mRNA 相对表达量低于糖尿病组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 5B)。

对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 caspase-3 mRNA 相对表达量分别为 0.57 ± 0.41 、 1.51 ± 0.32 、 1.07 ± 0.15 和 0.95 ± 0.11 , 总体比较差异有统计学意义($F = 18.95, P < 0.05$), 其中低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 caspase-3 mRNA 相对表达量低于糖尿病组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 5C)。

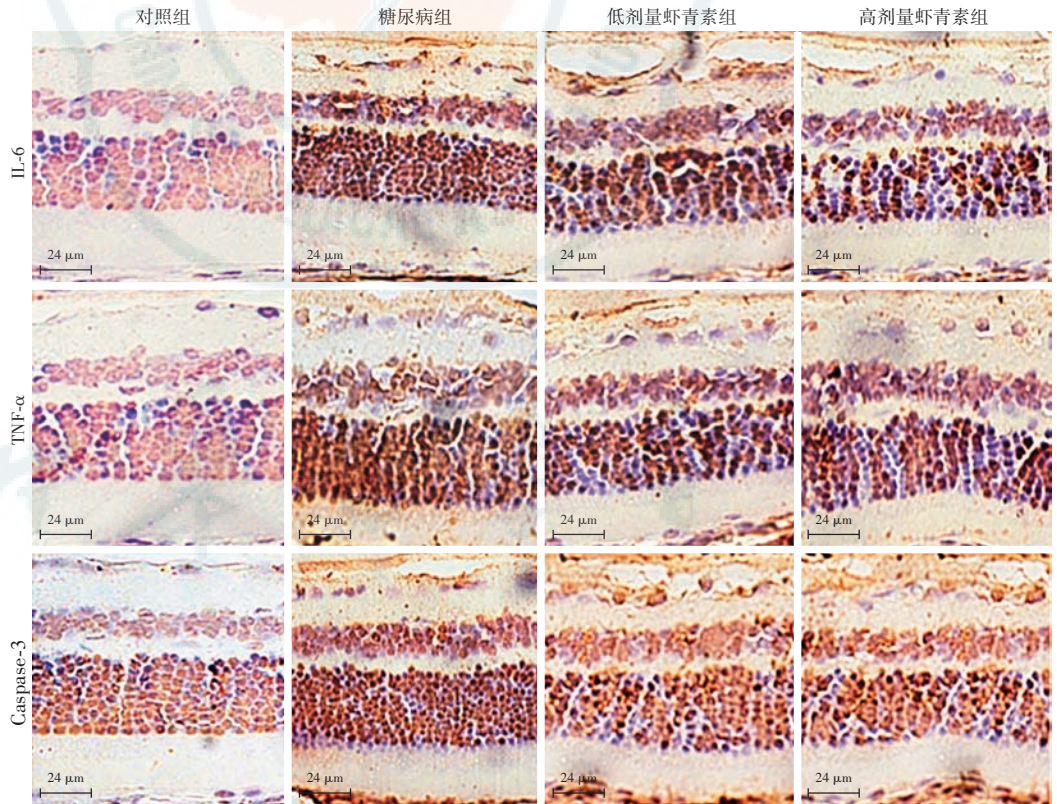


图 3 各组大鼠视网膜组织炎症因子表达(DAB $\times 400$, 标尺 = $24 \mu\text{m}$) 对照组可见炎症因子微量表达;糖尿病组可见炎症因子强阳性表达;低剂量虾青素组可见炎症因子中等阳性表达;高剂量虾青素组可见炎症因子中等阳性表达 IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子

Figure 3 The expression of inflammatory factors among different groups(DAB $\times 400$, bar = $24 \mu\text{m}$) In the control group, inflammatory factors was weakly detected; in the diabetes group inflammatory factors showed strongly intensity; in the low dose astaxanthin group, inflammatory factors showed moderately intensity; in the high dose astaxanthin group, inflammatory factors showed moderately IL: interleukin; TNF: tumour necrosis factor

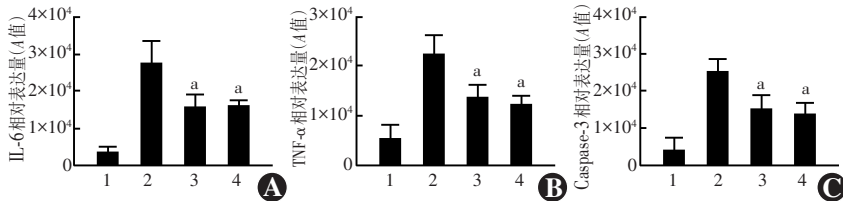


图 4 各组大鼠视网膜组织中炎症因子相对表达量比较 A: 各组大鼠视网膜组织中 IL-6 相对表达量比较 与糖尿病组比较, ^a*P*<0.05 B: 各组大鼠视网膜组织中 TNF-α 相对表达量比较 与糖尿病组比较, ^a*P*<0.05 C: 各组大鼠视网膜组织中 caspase-3 比较 与糖尿病组相比, ^a*P*<0.05 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, *n*=6) IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子 1: 对照组 2: 糖尿病组 3: 低剂量虾青素组 4: 高剂量虾青素组

Figure 4 Comparison of the relative expression levels of inflammatory factors in retinal tissue of rats among different groups A: Comparison of the relative expression levels of IL-6 among different groups compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 B: Comparison of the relative expression levels of TNF-α among different groups compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 C: Comparison of the relative expression levels of TNF-α among different groups compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 (one-way ANOVA, LSD-*t* test, *n*=6) IL: interleukin; TNF: tumour necrosis factor 1: control group 2: diabetes group 3: low dose astaxanthin group 4: high dose astaxanthin group

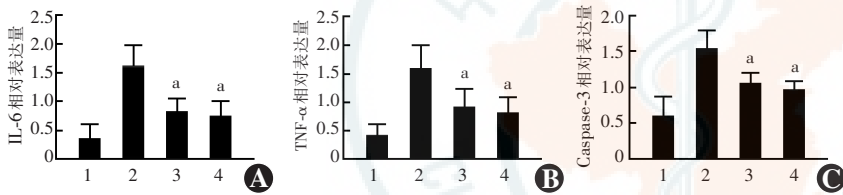


图 5 各组大鼠视网膜组织中炎症因子 mRNA 比较 A: 各组大鼠视网膜组织中 IL-6 mRNA 比较 与糖尿病组比较, ^a*P*<0.05 B: 各组大鼠视网膜组织中 TNF-α mRNA 比较 与糖尿病组比较, ^a*P*<0.05 C: 各组大鼠视网膜组织中 caspase-3 mRNA 比较 与糖尿病组比较, ^a*P*<0.05 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, *n*=6) IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子 1: 对照组 2: 糖尿病组 3: 低剂量虾青素组 4: 高剂量虾青素组

Figure 5 Comparison of mRNA of inflammatory factors in retinal tissue of rats among different groups A: Comparison of IL-6 mRNA among different groups compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 B: Comparison of TNF-α among different groups compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 C: Comparison of caspase-3 among different groups compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 (one-way ANOVA, LSD-*t* test, *n*=6) IL: interleukin; TNF: tumour necrosis factor 1: control group 2: diabetes group 3: low dose astaxanthin group 4: high dose astaxanthin group

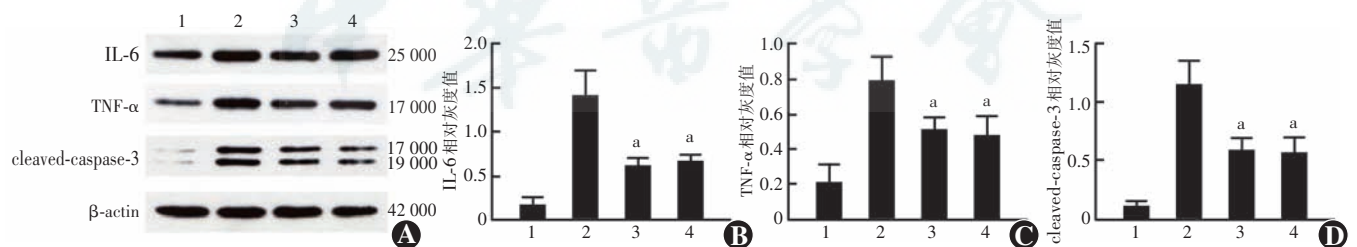


图 6 各组大鼠视网膜组织中炎症因子蛋白相对表达量比较 A: 各组大鼠视网膜组织中各炎症因子表达电泳图 B: 各组视网膜组织中 IL-6 蛋白相对表达量比较 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, *n*=6) 与糖尿病组比较, ^a*P*<0.05 C: 各组视网膜组织中 TNF-α 蛋白相对表达量比较 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, *n*=6) 与糖尿病组比较, ^a*P*<0.05 D: 各组视网膜组织中 cleaved-caspase-3 蛋白相对表达量比较 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, *n*=6) 与糖尿病组比较, ^a*P*<0.05 IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子; β-actin: β-肌动蛋白 1: 对照组 2: 糖尿病组 3: 低剂量虾青素组 4: 高剂量虾青素组

Figure 6 Comparison of relative expression of inflammatory factor protein among different groups A: Electrophoretogram of inflammatory factor protein among different groups B: Comparison of IL-6 protein among different groups (one-way ANOVA, LSD-*t* test, *n*=6) compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 C: Comparison of TNF-α protein among different groups (one-way ANOVA, LSD-*t* test, *n*=6) compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 D: Comparison of cleaved-caspase-3 protein among different groups (one-way ANOVA, LSD-*t* test, *n*=6) compared with the diabetes group, ^a*P*<0.05 IL: interleukin; TNF: tumour necrosis factor 1: control group 2: diabetes group 3: low dose astaxanthin group 4: high dose astaxanthin group

2.6 各组大鼠视网膜组织中炎症因子相关蛋白相对表达量的比较

Western blot 结果显示, 对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 IL-6 相对表达量分别为 0.15 ± 0.02、1.43 ± 0.51、0.63 ± 0.33 和 0.69 ± 0.22, 总体比较差异有统计学意义 (*F* = 61.440, *P* = 0.017), 其中低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 IL-6 相对表达量较糖尿病组低, 差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05) (图 6A)。

对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 TNF-α 相对表达量分别为 0.21 ± 0.13、0.79 ± 0.23、0.51 ± 0.14 和 0.49 ± 0.15, 总体比较差异有统计学意义 (*F* = 33.180, *P* = 0.027), 其中低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 TNF-α 相对表达量较糖尿病组低, 差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05) (图 6B)。

对照组、糖尿病组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 cleaved-caspase-3 (caspase-3 的活化形式) 相对表达量分别为 0.10 ± 0.08、1.15 ± 0.67、0.60 ± 0.13 和 0.57 ± 0.22, 总体比较差异有统计学意义 (*F* = 91.110, *P* = 0.021), 其中低剂量虾青素组和高剂量虾青素组 cleaved-caspase-3 相对表达量较糖尿病组低, 差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05) (图 6C)。

3 讨论

大鼠腹腔内注射 STZ 后可导致胰岛 β 细胞的选择性死亡,引起胰岛素分泌量的绝对不足,大鼠出现高血糖、多饮、多尿、体质量减轻等与 1 型糖尿病相似的症状。研究发现,虾青素能够改善实验动物的糖尿病相关症状,延缓糖尿病并发病的进展,如降低血糖、减少饮水量、增加体质量等^[9-10]。本研究中发现虾青素可以使 1 型糖尿病大鼠的体质量增加,但血糖水平无明显变化,说明虾青素无直接降血糖的作用,但可能通过调节体内氧化水平来改善糖尿病的一般症状,与 Chan 等^[11]的研究结果相似。

血-视网膜屏障(blood retina barrier, BRB)主要由内皮细胞、星形胶质细胞和周细胞组成^[12]。研究发现,周细胞凋亡发生在 DR 的早期阶段,是一个标志性事件^[13]。周细胞凋亡导致 BRB 受损,发生血管渗漏,由于周细胞的凋亡,周细胞丧失与随后出现的内皮细胞丧失共同导致无细胞性毛细血管形成,病程进一步发展导致毛细血管堵塞,微动脉瘤、黄斑水肿和新生血管的形成^[14]。早期周细胞丧失的机制仍不明确,目前多报道其与 DR 病变中过量释放的活性氧相关,容易受到自由基损害,活化线粒体凋亡途径^[15]。本研究中观察到糖尿病组大鼠周细胞数量少于对照组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组,而无细胞性毛细血管的数量多于对照组、低剂量虾青素组和高剂量虾青素组,表明虾青素可以抑制周细胞凋亡以及无细胞性毛细血管的形成。Robison 等^[14]研究发现,治疗组鬼影细胞(周细胞凋亡后的无细胞核胞体)数量较糖尿病对照组相比减少,与本研究结果类似。本研究的局限性在于周细胞和内皮细胞在显微镜下的形态相似,不易区分,对实验结果有一定影响。

研究表明,DR 进展过程中可出现慢性、低度的炎性反应^[16]。糖尿病患者的红细胞变形能力明显下降,血流阻力增加,循环负担加重,红细胞聚集在部分内皮细胞上,加上异常血流动力学的影响,对血管内皮细胞产生损伤,损伤的内皮细胞引起白细胞淤滞和血管通透性增加,进而激活免疫系统和补体系统,分泌大量炎性介质^[17]。研究表明,虾青素可以减少 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎性因子的释放^[17]。Park 等^[18]研究表明,每日补充虾青素可以有效下调 IFN- γ 和 IL-6 等炎性细胞因子的水平且抑制活性氧的释放。Fang 等^[19]研究提示,虾青素可抑制坏死组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放,抑制程度随其剂量增加而增加。同时,虾青素可以通过减轻炎症损伤和氧化应激反应减少细胞凋

亡。促进凋亡的 caspase 家族可大致分为引发剂(通常是 caspase 9)和效应器(通常是 caspase 3),caspase 3 被激活后转化为活化的 caspase 3,一系列的级联反应导致细胞的形态和生物化学改变,促使视网膜毛细血管细胞发生凋亡^[20]。研究表明,虾青素可以通过抑制 caspase 级联反应降低活化 caspase 3 的水平,进而减少视网膜毛细血管周细胞的凋亡^[21-22]。Kowluru 等^[15]研究表明,炎性因子在视网膜毛细血管周细胞凋亡的进程中起重要作用。TNF- α 可促进凋亡蛋白 caspase-3 激活,诱导视网膜周细胞及内皮细胞凋亡^[23]。本研究中通过检测促炎因子在视网膜组织中的蛋白和 mRNA 水平,发现虾青素可降低 IL-6、TNF- α 和 caspase-3 的表达,提示虾青素可以通过减少炎性因子和凋亡蛋白的表达抑制炎性反应,并且这些指标在糖尿病大鼠中表达明显增加,验证了 DR 与炎症损伤之间的关系。

本研究中发现虾青素能有效保护视网膜微血管,减轻视网膜组织的炎性损伤,减少凋亡蛋白表达,为延缓 DR 的药物治疗提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

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] Kim SY, Johnson MA, McLeod DS, et al. Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas [J]. Diabetes, 2005, 54(5): 1534-1542. DOI: 10.2337/diabetes.54.5.1534.
- [3] Meleth AD, Agrón E, Chan CC, et al. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(11): 4295-4301. DOI: 10.1167/iovs.04-1057.
- [4] Hernández C, Segura RM, Fonollosa A, et al. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. Diabet Med, 2005, 22(6): 719-722. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2005.01538.x.
- [5] Kim B, Farruggia C, Ku CS, et al. Astaxanthin inhibits inflammation and fibrosis in the liver and adipose tissue of mouse models of diet-induced obesity and nonalcoholic steatohepatitis [J]. J Nutr Biochem, 2017, 43: 27-35. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.01.006.
- [6] Miyachi M, Matsuno T, Asano K, et al. Anti-inflammatory effects of astaxanthin in the human gingival keratinocyte line NDUSD-1 [J]. Clin Biochem Nutr, 2015, 56(3): 171-178. DOI: 10.3164/jc.14-109.
- [7] Yeh PT, Huang HW, Yang CM, et al. Astaxanthin inhibits expression of retinal oxidative stress and inflammatory mediators in streptozotocin-induced diabetic rats [J/OL]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146438 [2020-01-19]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146438>. DOI: 10.1371/journal.pone.0146438.
- [8] Nakajima Y, Inokuchi Y, Shimazawa M, et al. Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress *in-vitro* and in mice *in-vivo* [J]. Pharm Pharmacol, 2008, 60(10): 1365-1374. DOI: 10.1211/jpp/60.10.0013.
- [9] Kim YJ, Kim YA, Yokozawa T. Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin [J]. Agric Food Chem, 2009, 57(19): 8793-8797. DOI: 10.1021/jf9019745.
- [10] Dong LY, Jin J, Lu G, et al. Astaxanthin attenuates the apoptosis of

- retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(3): 960-974. DOI: 10.3390/md11030960.
- [11] Chan KC, Pen PJ, Yin MC, et al. Anticoagulatory and antiinflammatory effects of astaxanthin in diabetic rats [J]. *Food Sci*, 2012, 77(2): 76-80. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02558.x.
- [12] Klaassen I, van Noorden CJ, Schlingemann RO, et al. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 34: 19-48. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.02.001.
- [13] Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M, et al. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy [J]. *Clin Invest*, 1996, 97(12): 2883-2890. DOI: 10.1172/JCI118746.
- [14] Robison WG, McCaleb ML, Feld LG, et al. Degenerated intramural pericytes ('ghost cells') in the retinal capillaries of diabetic rats [J]. *Curr Eye Res*, 1991, 10(4): 339-350. DOI: 10.3109/02713689108996340.
- [15] Kowluru RA, Zhong Q, Kanwar M, et al. Metabolic memory and diabetic retinopathy: role of inflammatory mediators in retinal pericytes [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90(5): 617-623. DOI: 10.1016/j.exer.2010.02.006.
- [16] Liu S, Lin YU, Liu X, et al. Protective effects of SIRT1 in patients with proliferative diabetic retinopathy via the inhibition of IL-17 expression [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(1): 257-262. DOI: 10.3892/etm.2015.2877.
- [17] Yasui Y, Hosokawa M, Mikami N, et al. Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 193(1): 79-87. DOI: 10.1016/j.cbi.2011.05.006.
- [18] Park JS, Chyun JH, Kim YK, et al. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2010, 7: 18-25. DOI: 10.1186/1743-7075-7-18.
- [19] Fang Q, Guo S, Zhou H, et al. Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41440-41447. DOI: 10.1038/srep41440.
- [20] Nahomi RB, Palmer A, Green KM, et al. Pro-inflammatory cytokines downregulate Hsp27 and cause apoptosis of human retinal capillary endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(2): 164-174. DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.11.011.
- [21] Xu L, Zhu J, Yin W, et al. Astaxanthin improves cognitive deficits from oxidative stress, nitric oxide synthase and inflammation through upregulation of PI3K/Akt in diabetes rat [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6083-6094.
- [22] Xuan RR, Niu TT, Chen HM, et al. Astaxanthin blocks preeclampsia progression by suppressing oxidative stress and inflammation [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2697-2704. DOI: 10.3892/mmr.2016.5569.
- [23] Blocksom JM, Huang J, Kerker S, et al. Endothelial cells protect against lipopolysaccharide-induced caspase-3-mediated pericyte apoptosis in a coculture system [J]. *Surgery*, 2004, 136(2): 317-322. DOI: 10.1016/j.surg.2004.05.006.

(收稿日期:2020-01-19 修回日期:2020-05-26)

(本文编辑:杜娟)

读者·作者·编者

眼科常用英文缩略语名词解释

- AMD: 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration)
- ANOVA: 单因素方差分析 (one-way analysis of variance)
- BUT: 泪膜破裂时间 (breakup time of tear film)
- DR: 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy)
- EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis)
- EGF: 表皮生长因子 (epidermal growth factor)
- ELISA: 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ERG: 视网膜电图 (electroretinogram)
- FFA: 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography)
- FGF: 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor)
- GFP: 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein)
- IFN- γ : γ 干扰素 (interferon- γ)
- IL: 白细胞介素 (interleukin)
- IOL: 人工晶状体 (intraocular lens)
- IRBP: 光间受体视黄类物质结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein)
- LASIK: 准分子激光角膜原位磨镶术 (laser in situ keratomileusis)
- ICGA: 吲哚菁绿血管造影 (indocyanine green angiography)
- LECs: 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells)
- miRNA: 微小 RNA (microRNA)
- MMP: 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase)
- mTOR: 哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin)
- MTT: 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium)
- NF: 核转录因子 (nuclear factor)
- OCT: 光相干断层扫描 (optical coherence tomography)
- OR: 优势比 (odds ratio)
- PACG: 原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma)
- PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)
- RGCs: 视网膜节细胞 (retinal ganglion cells)
- POAG: 原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma)
- RB: 视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma)
- RPE: 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium)
- RNV: 视网膜新生血管 (retinal neovascularization)
- RP: 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa)
- S I t: 基础泪液分泌试验 (Schirmer I test)
- shRNA: 小发夹 RNA (short hairpin RNA)
- siRNA: 小干扰 RNA (small interfering RNA)
- α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin)
- TAO: 甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy)
- TGF: 转化生长因子 (transforming growth factor)
- TNF: 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)
- UBM: 超声生物显微镜 (ultrasound biomicroscope)
- VEGF: 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)
- VEP: 视觉诱发电位 (visual evoked potential)

(本刊编辑部)