

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01137

· 短篇论著 ·

番茄红素减轻糖尿病大鼠视网膜病变的作用及机制

周晓燕¹, 应长江^{2*}

1. 徐州医学院形态学教学实验室, 徐州 221009

2. 徐州医学院附属医院内分泌科, 徐州 221002

[摘要] **目的** 研究番茄红素(lycopene, LP)对大鼠糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的作用及相关机制。**方法** 采用一次性腹腔注射链脲佐菌素(56 mg/kg)进行建模,并将成功建立的20只DR模型随机分为DR组和LP组,每组10只;另设10只正常大鼠为对照组(NC组)。LP组给予LP灌胃(60 mg/kg)治疗,NC组和DR组给予等量生理盐水灌胃,每日1次。干预8周后,放射免疫测定法测定各组大鼠血清中内皮素(endothelin, ET)和降钙素基因相关蛋白(calcitonin gene related protein, CGRP)的含量,免疫组化和蛋白质印迹法检测各组大鼠视网膜中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达。**结果** 与NC组比较,DR组的ET含量增高、CGRP含量降低、VEGF的表达增加($P < 0.05$);与DR组比较,LP组的ET含量降低、CGRP含量增加、VEGF的表达降低($P < 0.05$)。**结论** LP通过降低DR大鼠血清ET含量、提高CGRP含量、下调视网膜中VEGF的表达而减轻大鼠DR。

[关键词] 番茄红素;糖尿病视网膜病变;内皮缩血管肽类;降钙素基因相关肽;血管内皮生长因子类

[中图分类号] R 587.26

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2014)10-1137-04

Protective effect of lycopene against diabetic retinopathy in rats and the related mechanism

ZHOU Xiao-yan¹, YING Chang-jiang^{2*}

1. Morphological Teaching Lab, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu, China

2. Department of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To study the protective effect of lycopene (LP) against diabetic retinopathy (DR) in rats and its related mechanism. **Methods** A single dose of streptozotocin (56 mg/kg) was injected intraperitoneally in SD rats to induce diabetes retinopathy (DR), and the 20 successful DR models were equally randomized into DR group and LP treatment group. Meanwhile, 10 normal rats served as normal control group (NC). LP group received LP gavage (60 mg/kg) once a day; NC and DR groups were gavaged with equivalent saline daily for 8 weeks. The serum levels of endothelin(ET) and calcitonin gene related protein(CGRP) were detected by using radioimmunoassay(RIA), and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retina was determined by immunohistochemistry and Western blotting analysis. **Results** The serum levels of ET and expression of VEGF in the retina were significantly increased in DR groups when compared with NC group ($P < 0.05$), and the serum CGRP was significantly decreased ($P < 0.05$); Compared with DR group, LP group had significantly lower VEGF expression and ET levels and significantly higher level of CGRP ($P < 0.05$). **Conclusion** LP can protect against DR in rats by decreasing serum ET, increasing serum CGRP, and subsequent down-regulating VEGF expression.

[Key words] lycopene; diabetic retinopathy; endothelins; calcitonin gene-related peptide; vascular endothelial growth factors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(10):1137-1140]

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的也是最为严重的微血管并发症,已成为世界性致盲的常见原因之一。高血糖、高血脂、氧化应激和炎性细胞因子的产生直接影响着DR的发生和发展^[1-3]。番茄红素是类胡萝卜素的一种,

具有抗氧化、清除氧自由基的功能,还能降低血糖,减轻和缓解糖尿病并发症^[4-5]。研究显示,提高糖尿病患者血清番茄红素的浓度可以抑制氧化应激反应,抑制DR的发生发展^[6-7],但其相关的机制尚未完全阐明。本实验通过研究番茄红素对大鼠DR模

[收稿日期] 2014-02-09 **[接受日期]** 2014-03-26

[作者简介] 周晓燕, 硕士生. E-mail: zhouxiaoyan0201@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0516-85802372, E-mail: ycj321651@163.com

型的保护作用,初步探讨番茄红素保护 DR 的相关机制以及其在 DR 防治中的作用价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 清洁级雄性 SD 大鼠, 体重 160~180 g, 8 周龄, 由徐州医学院实验动物中心 [许可证号: SYXK(苏)2010-0011] 提供; 链脲佐菌素 (STZ) 购自 Sigma 公司; 番茄红素购自郑州荔诺生物制剂公司; 血糖仪 (稳豪倍优) 和血糖试纸购自强生生物制药有限公司; RIA 试剂盒, 免疫组化试剂盒和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体购自中山金桥生物技术有限公司。

1.2 糖尿病视网膜病变大鼠模型制备、分组和标本采集

1.2.1 造模 将 40 只大鼠腹腔一次性注射 2% STZ 56 mg/kg (枸橼酸钠缓冲液配制, pH 4.5), 72 h 后尾静脉采血, 血糖仪测定随机血糖 > 16.7 mmol/L 为建造糖尿病模型成功, 造模成功 32 只, 成模率 80%。12 周后查糖尿病模型大鼠眼底, 有明显出血、水肿及渗出者 20 只, 成模率 67%。

1.2.2 实验分组 将糖尿视网膜病造模成功的 20 只大鼠随机分为糖尿病视网膜病变组 (DR 组) 和番茄红素组 (LP 组), 每组 10 只; 另设 10 只正常大鼠为对照组 (NC 组)。LP 组于糖尿病视网膜病变造模成功后每日给予番茄红素灌胃 60 mg/kg, DR 组和 NC 组每日给予等量生理盐水灌胃, 均干预 8 周。实验过程中不给予胰岛素和其他降血糖药物, DR 组和 LP 组大鼠分别死亡 2 只, NC 组大鼠无死亡。

1.2.3 标本采集 DR 造模成功并治疗 8 周后, 大鼠禁食 12 h, 10% 水合氯醛麻醉后, 心脏采血置于抗凝管中, 4℃ 离心分离血浆后置于 -20℃ 冰箱保存, 待测内皮素 (endothelin, ET) 和降钙素基因相关蛋白 (calcitonin gene related protein, CGRP); 取大鼠左侧眼球于多聚甲醛中固定, 行石蜡包埋, 待免疫组化检测; 右侧眼球分离视网膜于 EP 管中置于 -80℃ 冰箱中保存, 待测 VEGF。

1.3 放射免疫测定法检测血浆 ET 和 CGRP 的水平 按照试剂盒说明书操作, 测定仪器为上海同济大学免疫研究所日环仪器厂 SN-695B 型智能放射免疫 γ 检测仪。

1.4 免疫组化法检测大鼠视网膜 VEGF 蛋白表达 糖尿病大鼠视网膜组织的 VEGF 蛋白检测采用 SP 法, 石蜡切片厚度 4 μ m, 石蜡切片脱蜡至水。微波炉中 (大火 2 min, 小火 10 min) 热抗原修复; 3% 过氧化氢 37℃ 孵育 5~10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性; PBS 冲洗 2 min \times 3 次, 按照 VEGF 免疫组化染色试剂盒的说明进行操作。

1.5 蛋白质印迹法测定大鼠视网膜 VEGF 蛋白表达 将视网膜组织中加入裂解液, 匀浆后, 800 \times g、4℃ 离心 15 min, 取上清, 15 000 \times g、4℃ 离心 15 min, 得上清即为胞质蛋白提取液。胞质蛋白用 4 \times 蛋白处理液配制成等浓度的蛋白样品。取等量蛋白样品行 10% SDS-PAGE 分离后, 以湿转移法转至 NC 膜上, 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入抗体孵育后洗膜, 显色后条带扫描、分析及打印。蛋白激活水平以免疫印迹中条带的灰度值与内参的比值来表示。

1.6 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用完全随机设计的方差分析 (ANOVA), 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 大鼠血浆 ET 和 CGRP 的含量 由表 1 可见, 与 NC 组比较, DR 组大鼠血浆 ET 含量升高, CGRP 含量降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 DR 组比较, LP 组大鼠血浆 ET 含量降低, CGRP 含量增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠血浆 ET 和 CGRP 的含量

$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}), \bar{x} \pm s$			
组别	<i>n</i>	ET	CGRP
NC 组	10	104.5 \pm 31.1	57.9 \pm 12.4
DR 组	8	329.8 \pm 61.5*	28.7 \pm 10.1*
LP 组	8	265.7 \pm 54.9* Δ	53.9 \pm 15.7 Δ

ET: 内皮素; CGRP: 降钙素基因相关蛋白; NC: 正常对照; DR: 糖尿病视网膜病变; LP: 番茄红素. * $P < 0.05$ 与 NC 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 DR 组比较

2.2 大鼠视网膜细胞中 VEGF 的表达 由图 1 可见, DR 组大鼠视网膜细胞质中 VEGF 的表达高于 NC 组和 LP 组。

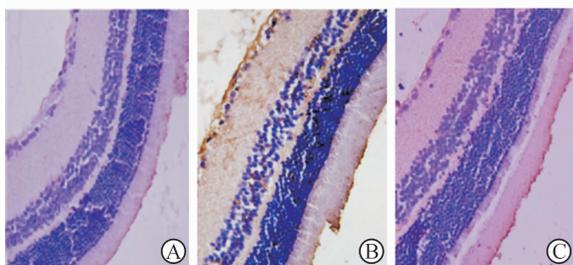


图1 各组大鼠视网膜细胞中 VEGF 的表达(SP法)

VEGF: 血管内皮生长因子. A: 正常对照(NC)组; B: 糖尿病视网膜病变(DR)组; C: 番茄红素(LP)组. Original magnification: $\times 400$

2.3 大鼠视网膜 VEGF 蛋白的表达 与 NC 组比较, DR 组及 LP 组大鼠视网膜中 VEGF 蛋白表达量均升高($P < 0.05$); 但 LP 组大鼠视网膜中 VEGF 蛋白的表达量低于 DR 组($P < 0.05$), 见图 2。

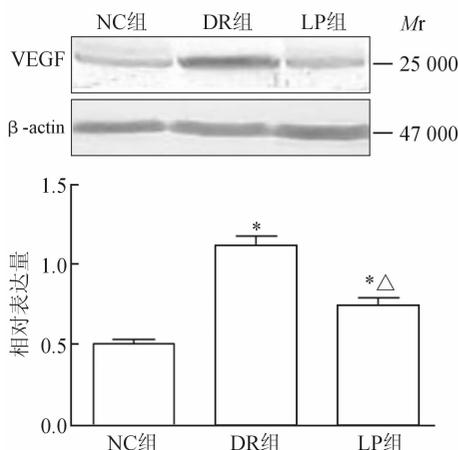


图2 各组大鼠视网膜 VEGF 蛋白的表达

NC: 正常对照; DR: 糖尿病视网膜病变; LP: 番茄红素; VEGF: 血管内皮生长因子. * $P < 0.05$ 与 NC 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 DR 组比较. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

糖尿病视网膜病的发病机制迄今尚不完全明了, 其基本病理过程表现为微循环障碍, 病理特征为视网膜新生血管形成和血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)破坏。糖尿病时由于血管及血液因素导致毛细血管闭塞, 从而引起毛细血管扩张, 微动脉瘤形成, 最终导致视网膜缺血缺氧、生长因子释放增加, 致使视网膜形成新生血管和纤维化。具有代表性的细胞因子有 ET 和 VEGF, ET 是迄今所知血管内皮细胞分泌的体内最强的缩血管物质, 生理量的 ET 通过内皮细胞-周期细胞间相互作用调节视网膜

血管的管径和局部血流量。糖尿病患者血管内皮损伤, 引起血浆 ET 过量释放并强烈刺激视网膜周细胞收缩, 导致视网膜局部循环调节功能紊乱, 从而促进和加剧糖尿病视网膜病变的发生发展^[8]。VEGF 是目前所知最强的内皮细胞选择性促有丝分裂因子和血管生成因子, 能特异性地刺激视网膜血管内皮细胞增殖, 增加血管的通透性, 促进新生血管的形成, 一旦新生血管形成, 则标志着视网膜发生增殖性病变^[9]。有研究证明, 在糖尿病视网膜病变早期, VEGF 即发挥作用, 促进和加重糖尿病视网膜病变的发生发展^[10]。CGRP 是体内已知的作用最强、持续时间最长的舒血管肽, 与 ET 的缩血管作用相互拮抗。CGRP/ET 分泌失衡在血管内皮细胞损伤的病理过程中起着重要的作用^[11], 若糖尿病病情长期控制不良, 血管内皮细胞损伤加重、增殖减弱, 从而引起 ET 和 VEGF 的大量释放^[7]。由于 CGRP 的减少致血管收缩、微循环障碍加重、毛细血管通透性增加, 导致视网膜微血管出血、渗出性改变, 血管内皮细胞增殖、新生血管形成等, 最终加重糖尿病视网膜病变。

番茄红素广泛存在于水果及蔬菜中, 具有抗氧化、降血糖、抑制突变、减少心血管疾病及抗癌等生物学作用^[6-7, 12-13]。人体内不能合成番茄红素, 只能依靠食物补充。临床研究结果显示, 提高糖尿病患者血清番茄红素水平, 可以减轻糖尿病患者视网膜病变, 降低糖化血红蛋白的值, 患者血清番茄红素水平的降低与 DR 的诊断、严重程度和治疗密切相关^[6]。本研究旨在从细胞因子层面揭示番茄红素治疗糖尿病视网膜病变与细胞因子 ET、VEGF 和 CGRP 之间的联系。本研究结果显示, 与 DR 组比较, LP 组大鼠血浆 ET 和视网膜中 VEGF 的含量均降低($P < 0.05$), 而血浆 CGRP 含量增加($P < 0.05$)。这一结果提示, 番茄红素减轻大鼠糖尿病视网膜病是通过降低血浆中 ET 含量、提高血浆中 CGRP 含量和降低视网膜细胞因子 VEGF 的表达, 抑制视网膜细胞异常增殖, 阻止新生血管的生成, 从而抑制视网膜增厚而实现的。本研究仅限于对实验动物现象的观察, 有关番茄红素保护糖尿病视网膜病变的具体作用机制还需要更多临床研究予以揭示。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Matthews D R, Stratton I M, Aldington S J, Holman R R, Kohner E M; UK Prospective Diabetes Study Group. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69[J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122: 1631-1640.
- [2] Noda K, Nokao S, Zandi S, Hares K C, Hafezi-Moqhadam A. Retinopathy in a novel model of metabolic syndrome and type 2 diabetes; new insight on the inflammatory paradigm[J]. *FASEB J*, 2014, 28: 2038-2046.
- [3] Tawfik A, Sanders T, Kahook K, Akeel S, Elmarakby A, Al-Shabrawey M. Suppression of retinal peroxisome proliferator-activated receptor gamma in experimental diabetes and oxygen-induced retinopathy; role of NADPH oxidase[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 878-884.
- [4] Bayramoglu A, Bayramoglu G, Senturk H. Lycopene partially reverses symptoms of diabetes in rats with streptozotocin-induced diabetes[J]. *J Med Food*, 2013, 16: 128-132.
- [5] Ali M M, Agha F G. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009, 69: 371-379.
- [6] Brazionis L, Rowley K, Itsiopoulos C, O'Dea K. Plasma carotenoids and diabetic retinopathy[J]. *Br J Nutr*, 2009, 101: 270-277.
- [7] Valero M A, Vidal A, Burgos R, Calvo F L, Martínez C, Luengo L M, et al. Meta-analysis on the role of lycopene in type 2 diabetes mellitus [J]. *Nutr Hosp*, 2011, 26: 1236-1241.
- [8] Koleva-Georgieva D N, Sivkova N P, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy[J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2011, 53: 44-50.
- [9] Selim K M, Sahan D, Muhittin T, Osman C, Mustafa O. Increased levels of vascular endothelial growth factor in the aqueous humor of patients with diabetic retinopathy [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2010, 58: 375-379.
- [10] Funatsu H, Yamashita H, Nakamura S, Mimura T, Eguchi S, Noma H, et al. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema [J]. *Ophthalmology*, 2006, 113: 294-301.
- [11] Yang J H, Meng X X, Xie L S, Guo Z. Acute myocardial ischemia up-regulates substance P in the retina of rats [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 443: 218-222.
- [12] Chen J, O'Donoghue A, Deng Y F, Zhang B, Kent F, O'Hare T. The effect of lycopene on the PI3K/Akt signaling pathway in prostate cancer [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14: 800-805.
- [13] Aman U, Vaibhav P, Balaraman R. Tomato lycopene attenuates myocardial infarction induced by isoproterenol: electrocardiographic, biochemical and anti-apoptotic study [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2: 345-351.

[本文编辑] 魏学丽