

藏红花对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡过程中线粒体途径的影响

党晓洁

(西安市第四医院眼科,西安,710004)

摘要 目的:观察藏红花对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡过程中线粒体功能的影响。方法:采用随机数字表法将72只8~10周龄健康无眼疾SD雄性大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组、藏红花治疗组,每组24只。正常对照组大鼠不作任何处理。其余组采用链脲佐菌素(SYZ)25 mg/(kg·d)连续腹腔注射3 d,1次/d,建立2型糖尿病模型,以血糖 \geq 16.7 mmol/L为造模成功。模型成功建立后,藏红花治疗组50 mg/kg的剂量腹腔注射藏红花素溶液,1次/d,连续3个月。并检测3组大鼠视网膜醛糖还原酶(AR)、神经细胞凋亡及视网膜中B细胞淋巴瘤/白血病-2(bcl-2)、bcl-2相关X蛋白(bax)、细胞色素C(cyt-c)、半胱天冬酶-3(caspase-3)蛋白的表达。结果:糖尿病模型组大鼠视网膜中的AR活性明显高于正常对照组和藏红花治疗组,且差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组RGCs层见少量TUNEL染色阳性细胞,成棕褐色染色;B:糖尿病模型组RGCs、内核层可见大量TUNEL染色阳性细胞;C:藏红花治疗组RGCs、内核层可见量TUNEL染色阳性细胞,但数量远少于糖尿病模型组;糖尿病模型组大鼠视网膜中的bcl-2、bax、cyt-c及caspase-3蛋白表达均明显低于正常对照组和藏红花治疗组,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:藏红花可通过抑制AR活性、上调凋亡抑制基因bcl-2的表达及下调凋亡促进基因bax、cyt-c和caspase-3的表达,抑制线粒体凋亡途径活化,减少糖尿病大鼠视网膜神经细胞的凋亡,发挥对糖尿病视网膜损伤的保护作用。

关键词 藏红花;糖尿病;视网膜神经节;细胞凋亡;线粒体;功能

Effect of Saffron on Mitochondria Pathway during Apoptosis of Retinal Ganglion Cells in Diabetic Rats

Dang Xiaojie

(Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, China)

Abstract Objective: To observe the effect of saffron on mitochondrial function of diabetic rat retinal ganglion cell apoptosis process. **Methods:** Using random number table method, 72 SD male rats 8 ~ 10 weeks old with healthy eyes were randomly assigned to normal control group, diabetic model group, and saffron treatment group ($n = 24$). Normally controlled rats experienced no treatment. Other rats were given streptozocin (SYZ) 25 mg / (kg / D) by intraperitoneal injection for 3 days, once daily, to establish the model of type 2 diabetes and their blood sugar would be more than or equal to 16.7 mmol/L for a successful modeling. After the model was established, saffron treatment group was provided with intraperitoneal injection of crocin solution 50 mg / kg, once per day, for 3 consecutive months. And Retinal aldose reductase (AR), neural cell apoptosis and B cell lymphoma / leukemia-2 (Bcl-2), cell pigment and Bcl-2 associated X protein (BCX), cytochrome C (Cyt-C), caspase-3 protein expression were detected. **Results:** The AR activity in the retina of diabetic rats was significantly higher than that of the normal control group and the treatment group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); there was small amount of TUNEL positive cells in RGCs layers of the control group, brown staining; B: The RGCs and nuclear layer in diabetic model group had a number of TUNEL staining positive cells; C: there were TUNEL staining positive cells in RGCs and kernel layer in Saffron treatment group, but much less than the number of that of the diabetic model group; Retinal Bcl-2, Bax, Cyt-C and caspase-3 protein expression of diabetic rats were much lower than those of normal control group and treatment group, and the difference is statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Saffron inhibited AR activity and the activation of the mitochondrial apoptotic pathway, regulated expression of apoptosis inhibition of bcl-2 gene and apoptosis promoting gene Bax, Cyt-C and Caspase-3, reduced the apoptosis of nerve cells in the retina of diabetic rats and showed protective effect on diabetes optic omental injury.

Key Words Saffron; Diabetes mellitus; Retinal ganglion cells; Apoptosis; Mitochondrial; Function

中图分类号:R587.1;R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.048

糖尿病视网膜病变(Diabetic Retinopathy, DR)发病机制既往认为主要与多元醇、蛋白激酶 C、糖基化终末产物、氨基己糖等途径有关^[1]。但单独应用针对这 4 条途径的特异性阻断剂不能取得满意的治疗效果,这 4 条途径似乎彼此独立^[2-3]。Cheung N^[4]提出活性氧(Reactive Oxygen, ROS)的过量产生与上述 4 条途径关系密切。ROS 主要生成于线粒体电子传递过程,可导致线粒体内 DNA 的氧化损伤,影响线粒体呼吸功能、降低线粒体膜电位,导致细胞功能障碍。视网膜缺血再灌注损伤(RIR)可引起视神经损伤,与细胞凋亡、炎症反应及氧自由基密切相关^[5]。藏红花是鸢尾科植物,主要成分藏红花素,通过抑制视网膜炎性反应因子 IL-1B、TNF- α 的含量,起到抗炎作用^[6]。我们观察藏红花素对 RIR 时大鼠视网膜组织结构及线粒体途径的影响,以探讨藏红花素对糖尿病大鼠视神经损伤作用及其机制。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 建立糖尿病大鼠模型、分组及视网膜取材 雄性 SD 大鼠 72 只,体重 200 ~ 250 g,无特定病原体级,医药大学实验动物中心提供。采用随机数字表法将 72 只 8 ~ 10 周龄健康无眼疾 SD 雄性大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组、藏红花治疗组,每组 24 只。正常对照组大鼠不作任何处理。其余组采用链脲佐菌素(SYZ)25 mg/(kg·d)连续腹腔注射 3 d,1 次/d,建立 2 型糖尿病模型,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为造模成功。模型成功建立后,藏红花治疗组 50 mg/kg 的剂量腹腔注射藏红花素溶液,1 次/d,连续 3 个月。大鼠水合氯醛麻醉后,取得视网膜血管组织。

1.2 紫外分光光度测定视网膜 AR 活性 取液氮中保存的视网膜,按体积比 1:4 加入预冷的(0.01 mmol/L PBS, pH 7.2 ~ 7.4)制成组织匀浆,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min,离心半径 13.5 cm,上清即为酶粗提取液,用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白的表达进行定量分析。AR 活性测定反应体系的组分(最终浓度)为:0.1 mol/L PBS [内含 0.4 mol/L (NH₄)₂SO₄, pH 6.2], 0.08 mmol/L NADPH, 5 mmol/L DL-甘油醛,5 L 酶粗提取液,反应体积 100 L。其中 DL-甘油醛为反应底物。反应自加入底物开始,37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min,加入预冷的 PBS 终止反应,采用 DU800 型紫外分光光度计(美国 Beckman Coulter 公司)测定 NADPH 在 340 nm 处的吸光度(A340)值。AR 活性单位定义为每毫克蛋白质每分

钟消耗 1 mol NADPH,以 1 mol/(min·L)表示。

1.3 培养细胞的免疫组织化学法鉴定 RPE 细胞在无菌条件下进行分离,EDTA 质量分数为 0.02% 和胰蛋白酶质量分数为 0.25% 进行消化,培养瓶内接种入细胞密度为 5×10^4 个/mL,体积分数 5% CO₂ 孵箱内温度 37 $^{\circ}$ C 进行培养。RPE 细胞的活力采用锥虫蓝染色法测定,首先预冷丙酮固定细胞爬片 10 min。细胞鉴定采用角蛋白单克隆抗体,用 1:3 000 稀释的鼠抗人角蛋白抗体为一抗,羊抗小鼠 IgG 采用生物素标记作为二抗,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色,充分冲洗脱水,封片,拍照。

1.4 Western blot 法检测视网膜中 bcl-2、bax、cyt-c 及 caspase-3 的蛋白表达 视网膜组织细胞总蛋白进行 RIPA 裂解提取,并行蛋白定量检测,变性,上样,电泳,转至聚偏氟乙烯膜,质量分数 5% 脱脂奶粉封闭,加入相应抗体(1% 脱脂奶粉稀释作为一抗和二抗,1:300 为一抗效价比,1:1 000 为二抗效价比),曝光洗片,胶片扫描后用 Ipwin32 图像分析软件分析结果,450 nm 细胞吸光度作为测定波长,内参基因为 β -actin,目的基因 A 值/ β -actin A 值作为各凋亡调控因子的相对表达量,每个检测指标样本量为 3。分别计算 bcl-2、bax、cyt-c 及 caspase-3 条带与 B-actin 条带的灰度比值,以代表目的蛋白的相对表达水平。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析处理。各组样本均数经 Kolmogorov-Smirnov 检验呈正态分布($P > 0.05$),实验室测试指标的数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行单因素方差分析,组间比较行 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜组织中 AR 的活性 糖尿病模型组大鼠视网膜中的 AR 活性明显高于正常对照组和藏红花治疗组,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠视网膜 AR 活性和细胞 AI 的比较

组别	AR 活性[mol/(min·L)]	AI
对照组	0.3864 \pm 0.0675	0.0235 \pm 0.0042
糖尿病模型组	1.1152 \pm 0.1249	0.2243 \pm 0.0262
藏红花治疗组	0.5987 \pm 0.0886	0.1170 \pm 0.0195
<i>F</i>	90.115	165.540
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与糖尿病模型组比较,* $P < 0.001$;AR:醛糖还原酶,AI 凋亡指数。

表2 3组大鼠视网膜中 bcl-2、bax、cyt-c 及 caspase-3 蛋白表达

组别	bcl-2	bax	bcl-2/bax	cyt-c	caspase-3
对照组	1.0124 ± 0.0678 *	0.4577 ± 0.0254 *	2.2211 ± 0.2619 *	0.4661 ± 0.0556 *	0.1572 ± 0.0253 *
糖尿病模型组	0.2737 ± 0.0202	0.7398 ± 0.0398	0.3697 ± 0.0094	0.8845 ± 0.0346	0.5045 ± 0.0823
藏红花治疗组	0.5472 ± 0.1083 *	0.5252 ± 0.0110 *	1.0449 ± 0.2291 *	0.5886 ± 0.0533 *	0.2650 ± 0.0290 *
<i>F</i>	38.546	51.332	47.870	41.262	25.888
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与糖尿病模型组比较, * $P < 0.001$ 。

2.2 视网膜组织的 TUNEL 染色 结果见图 1。

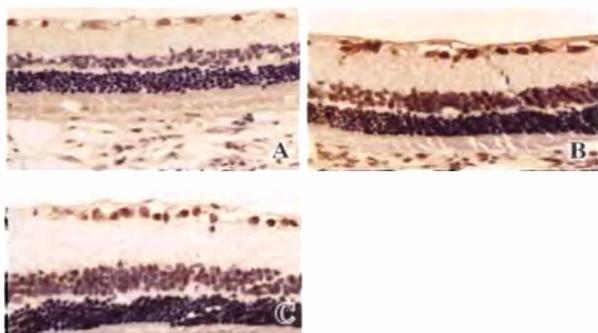


图1 TUNEL 法检测到 3 组大鼠 RGCs 凋亡情况 (×400)

注:A:对照组 RGCs 层见少量 TUNEL 染色阳性细胞,成棕褐色染色;B:糖尿病模型组 RGCs、内核层可见大量 TUNEL 染色阳性细胞;C:藏红花治疗组 RGCs、内核层可见量 TUNEL 染色阳性细胞,但数量远少于糖尿病模型组;注:RGCs:视网膜神经节细胞。

2.3 3 组大鼠视网膜中 bcl-2、bax、cyt-c 及 caspase-3 蛋白表达 糖尿病模型组大鼠视网膜中的 bcl-2、bax、cyt-c 及 caspase-3 蛋白表达均明显低于正常对照组和藏红花治疗组,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

DR 早期病变主要是视网膜血管病变。目前研究已证实糖尿病血管病变与细胞凋亡和黏附分子表达、炎性损伤有密切关系^[7]。尽管发病机制尚不清楚。糖尿病视网膜疾病的疗法将会深刻影响遗传性视网膜疾病患者的生活质量^[8]。正因如此,这个领域吸引了大量的研究去开发相应的疗法^[9-11]。有几个因素使得眼睛成为基因替换疗法的理想器官,包括易接近性、免疫豁免、体积小、组织分区和天然的对侧对照。笔者观察藏红花对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡过程中线粒体功能的影响。相关研究认为视网膜主要损伤在视网膜色素上皮细胞、Muller 细胞及视网膜全层的线粒体^[12-15]。线粒体疾病是指病变发生在细胞的线粒体内,是线粒体基因组 (mtDNA) 和/或核基因组 (nDNA) 编码线粒体蛋白的基因变异引起的线粒体结构和氧化磷酸化功能

的损伤,而引起的疾病。线粒体病通常表现为 ATP 能量减少、活性氧自由基 (ROS) 增多和乳酸中毒等造成细胞损伤或细胞凋亡等^[16-17]。人的部分生理结构属于自然凋亡,如人的有尾阶段,尾部在发育过程中自动凋亡。细胞凋亡在人神经变性病中起重要作用^[18-22]。在营养因子匮乏的情况下,促凋亡分子 Bax 是交感神经元和运动神经元死亡所必需的。而且,成年 Bax 缺失性转基因小鼠比其野生型副本具有更多的神经元。这些发现表明,在许多神经元集群中,Bax 在发育过程中调控自然发生的细胞死亡。也观察到,在胚胎期 (Embryonic Life), Bax 是外周和 CNS 神经元自然发生死亡的关键调节剂 (Davies, 2000)。在一定的实验条件下,已知的抗凋亡蛋白 Bel-2 和 Bcl-xL 可中和 Bax 的活性。设想当促凋亡蛋白的浓度超过抗凋亡蛋白的浓度时,会刺激凋亡。此类凋亡包括线粒体中的变化,其最终导致称为半胱天冬酶 (Caspases) 的丝氨酸蛋白酶家族的激活^[23-25]。这导致死亡细胞从内部被消化,这是一种细胞凋亡标志对调节细胞凋亡的基因和蛋白特别是负调控 (即抑制) 细胞凋亡的那些蛋白的更多了解,可以设计出新的治疗法,从而可防止细胞凋亡的不适当激活^[26-27]。藏红花素是从藏红花中提取的单体,通过腹腔注射及口服后可以吸收入血液,到达视网膜;静脉注射藏红花提取液可以减少脑缺血再灌注模型的脑损伤,说明藏红花提取液可以通过血脑屏障^[28]。研究结果显示糖尿病模型组大鼠视网膜中的 AR 活性明显高于正常对照组和藏红花治疗组,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$);对照组 RGCs 层见少量 TUNEL 染色阳性细胞,成棕褐色染色;B:糖尿病模型组 RGCs、内核层可见大量 TUNEL 染色阳性细胞;C:藏红花治疗组 RGCs、内核层可见量 TUNEL 染色阳性细胞,但数量远少于糖尿病模型组;糖尿病模型组大鼠视网膜中的 bcl-2、bax、cyt-c 及 caspase-3 蛋白表达均明显低于正常对照组和藏红花治疗组,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示藏红花可通过抑制 AR 活性、上调凋亡抑制基因

bcl-2 的表达及下调凋亡促进基因 bax、cyt-c 和 caspase-3 的表达,抑制线粒体凋亡途径活化,减少糖尿病大鼠视网膜神经细胞的凋亡,发挥对糖尿病视网膜损伤的保护作用。但由于视网膜损伤本身是个多因素协同的结果,有关其具体机制还有待进一步拓展体内外实验研究,观察相关信号通路、视神经血流改变及相关基因表达情况加以探讨。

参考文献

- [1] Madsen-Bouterse SA, Mohammad G, Kanwar M, et al. Role of mitochondrial DNA damage in the development of diabetic retinopathy, and the metabolic memory phenomenon associated with its progression [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(6):797-805.
- [2] Kusari J, Zhou S, Padillo E, et al. Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(11):5152-5159.
- [3] Bidani AK, Picken M, Hacioglu R, et al. Spontaneously reduced blood pressure load in the rat streptozotocin-induced diabetes model: potential pathogenetic relevance [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(2):F647-654.
- [4] Cheung N, Wong TY. Diabetic retinopathy and systemic vascular complications [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27(2):161-176.
- [5] Ruchko M, Gorodnya O, LeDoux SP, et al. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in oxidant-challenged lung endothelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(3):L530-535.
- [6] Wright E Jr, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia [J]. *Int J Clin Pract*, 2006, 60(3):308-314.
- [7] Miyahara S, Kiryu J, Yamashiro K, et al. Simvastatin inhibits leukocyte accumulation and vascular permeability in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(5):1697-1706.
- [8] McDonnell MA, Abedin MJ, Melendez M, et al. Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29):20149-20158.
- [9] Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I. Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(6):2753-2759.
- [10] Zeidan YH, Wu BX, Jenkins RW, et al. A novel role for protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation of acid sphingomyelinase in UV light-induced mitochondrial injury [J]. *FASEB J*, 2008, 22(1):183-193.
- [11] Zhang Z, Qin X, Zhao X, et al. Valproic acid regulates antioxidant enzymes and prevents ischemia/reperfusion injury in the rat retina [J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37(5):429-437.
- [12] Shi Y, Wu X, Gong Y, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on retinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Curr Eye Res*, 2010, 35(10):930-937.
- [13] Berger S, Savitz SI, Nijhawan S, et al. Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(8):3605-3610.
- [14] Yang R, Tan X, Thomas AM, et al. Crocetin inhibits mRNA expression for tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic shock [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2006, 30(4):297-301.
- [15] Maccarone R, Di MS, Bisti S. Saffron supplement maintains morphology and function after exposure to damaging light in mammalian retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(3):1254-1261.
- [16] Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(4):578-584.
- [17] Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke [J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 184(1-2):53-68.
- [18] 庞东渤, 洪晶. 视网膜色素上皮细胞凋亡途径的研究 [J]. *眼科新进展*, 2007, 27(6):405-407.
- [19] 蔡善君, 严密, 毛咏秋, 等. 蓝光致人视网膜色素上皮细胞凋亡与线粒体膜电位和细胞色素 C 的关系 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(12):1095-1102.
- [20] 周琼, 李恩辉, 刘永琰, 等. 不同激光强度经瞳孔温热疗法对色素免视网膜细胞凋亡的影响 [J]. *中华眼底病杂志*, 2006, 22(4):249-252.
- [21] 陈丽娟, 曹西友, 苗林. 兔眼经瞳孔温热疗法阈值能量治疗的组织病理反应和细胞凋亡 [J]. *国际眼科杂志*, 2007, 7(4):993-996.
- [22] 张跃红, 牛膺筠, 王红云, 等. 低氧预适应对小鼠视网膜光感受器细胞光损伤的防护作用 [J]. *中华眼科杂志*, 2005, 41(7):631-635.
- [23] Dentechev T, Yao Y, Pratico D, et al. Isoprostane F2alpha-VI, a new marker of oxidative stress, increases following light damage to the mouse retina [J]. *Mol Vis*, 2007, 13:190-195.
- [24] Lansel N, Hafezi F, Marti A, et al. The mouse ERG before and after light damage is independent of p53 [J]. *Doc Ophthalmol*, 1998, 96(4):311-320.
- [25] Krishnanorthy RR, Crawford MJ, Chaturvedi MM, et al. Photo-oxidative stress down-modulates the activity of nuclear factor-kappa B via involvement of caspase-1, leading to apoptosis of photoreceptor cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(6):3734-3743.
- [26] Ballinger SW, Van Houten B, Jin GF, et al. Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells [J]. *Exp Eye Res*, 1999, 68(6):765-772.
- [27] Hansson MJ, Mattiasson G, Månsson R, et al. The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, 36(4):407-413.
- [28] Qi Y, Chen L, Zhang L, et al. Crocin prevents retinal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis in retinal ganglion cells through the PI3K/AKT signalling pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 107:44-51.