

doi:10.3969/j.issn.0253-9896.2013.11.019

三七三醇皂苷对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的保护作用*

朱德森¹ 刘学政^{2△}

【摘要】 目的 探讨三七三醇皂苷(PTS)对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞(RGC)的保护作用及机制。方法 SD大鼠随机分为对照组、糖尿病组及治疗组,糖尿病组及治疗组腹腔注射链脲佐菌素诱导糖尿病动物模型,治疗组给予PTS 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,1个月后免疫荧光组化双标检测Nogo受体与RGC特异性标志物Brn3a的共存情况,Western blot检测视网膜Nogo受体表达,试剂盒检测视网膜丙二醛(MDA)含量,HE染色观察RGC数量。结果 Brn3a与Nogo受体于视网膜内大量共存。与对照组相比,糖尿病组视网膜Nogo受体表达上调,MDA含量增加,RGC数量减少(均 $P < 0.001$);与糖尿病组相比,治疗组视网膜Nogo受体表达减少,MDA含量降低,RGC数量增加($P < 0.001$)。结论 PTS可能通过抑制糖尿病大鼠视网膜RGC内Nogo受体的表达,抑制视网膜氧化应激,从而保护糖尿病视网膜RGC。

【关键词】 三七;皂苷类;糖尿病视网膜病变;视网膜神经节细胞;髓磷脂蛋白质类;氧化性应激

Protective Effects of Panax Notoginseng on Retinal Ganglion Cells in Diabetic Rats

ZHU Demiao¹, LIU Xuezheng²

1 Basic Discipline of Chinese and Western Integrative, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2 Department of Anatomy, Liaoning Medical University

【Abstract】 Objective To explore protective effects and potential underlying mechanisms of panax notoginseng (PTS) on retinal ganglion cell (RGC) in diabetic rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, diabetic group and treatment group. The diabetic model rats were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin. Rats were given PTS 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ in treatment group. One month later, the coexistence of nogo receptor and Brn3a (special marker of RGC) was observed by immunofluorescence staining double-labeled method. The expression of Nogo receptor was detected by Western blot assay. The level of malondialdehyde (MDA) in retina was measured with detection kit. HE-staining was introduced to reveal the number of retinal RGC. **Results** A large number of Brn3a and Nogo receptors were co-existed in the retina. The Nogo receptor was exclusively expressed in RGC, which was up regulated in diabetic group compared with that of control group. The level of retinal MDA was increased and the number of RGC decreased in diabetic group than that of control group ($P < 0.001$). Compared with diabetic group, there were decreased retina Nogo receptor, decreased level of MDA and increased number of RGC in treatment group ($P < 0.001$). **Conclusion** PTS attenuates diabetes-induced loss of RGC, which may ascribe for down-regulation of retina Nogo receptor and decreased oxidative stress.

【Key words】 panax notoginseng; saponins; diabetic retinopathy; retinal ganglion cells; myelin proteins; oxidative stress

糖尿病可诱导视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)凋亡,引发糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR),是成年人视力减退甚至失明的重要原因之一^[1]。三七三醇皂苷(Panax notoginseng, PTS)是中药三七的重要活性成分,可改善脑缺血所致的脑体积缩小及神经功能缺损,有明显的神经保护作用^[2-3]。本研究拟探讨PTS对糖尿病大鼠视网膜RGC的影响及其作用机制。

1 材料与方

1.1 材料 30只SD大鼠雌雄不限,体质量200~230 g,购自

辽宁医学院实验动物中心;PTS购自成都华神集团股份有限公司制药厂;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、羊抗大鼠Nogo受体一抗、小鼠抗大鼠Brn3a一抗、A594-驴抗羊二抗及A488-驴抗小鼠二抗均购自美国Sigma公司;MDA试剂盒购自北京碧云天生物公司。

1.2 糖尿病模型的建立及实验分组 动物随机分为对照组、糖尿病组和治疗组,每组10只。糖尿病组和治疗组腹腔注射

*国家自然科学基金资助项目(项目编号:31140072);辽宁省科技厅资助项目(项目编号:2011225015)

作者单位:1 辽宁中医药大学中西医结合基础学科(邮编100032);2 辽宁医学院人体解剖学教研室

[△]通讯作者 E-mail:liuxuezheng168@vip.sina.com

1% STZ溶液(60 mg/kg),48 h后尾静脉取血测血糖,若大于16.7 mmol/L即为模型建立成功。治疗组给予PTS 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药,每日2次。对照组及糖尿病组给予等剂量生理盐水。1个月后进行指标检测。

1.3 Nogo受体及Brn3a荧光免疫组化双标 快速摘除大鼠双侧眼球,于解剖显微镜下,以眼科剪沿角膜缘剪开眼球,去除角膜、晶状体及玻璃体,剥离视网膜,滤纸吸干后称质量。常规制备视网膜石蜡切片,脱蜡至水化。以羊抗大鼠Nogo受体/小鼠抗大鼠Brn3a一抗混合液于4℃孵育48 h,均稀释为1:200(Brn3a为RGC特异性标志物),再以A594-驴抗羊/A488-驴抗小鼠二抗混合液孵育室温4 h(均稀释为1:500),封片,荧光显微镜下观察。

1.4 Western blot检测Nogo受体表达 将视网膜以4℃生理盐水制备1%浓度组织匀浆。蛋白裂解液裂解后以12 000 r/min离心15 min,上清液以80 V电压聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干法移至PVDF膜,以Nogo受体及β-actin一抗于37℃分别孵育2 h,再以辣根过氧化物酶标记的二抗室温分别孵育1 h,试剂盒显影。Nogo与β-actin条带光密度值之比即为Nogo受体相对表达量。

1.5 视网膜丙二醛(MDA)含量检测 以4℃生理盐水制备5%的视网膜匀浆,4 000 r/min离心10 min后取上清,按试剂盒提供的操作步骤及公式,利用硫代巴比妥酸法检测视网膜中MDA含量。

1.6 视网膜HE染色 常规制备视网膜石蜡切片,脱蜡入水,经苏木精染色、分色、水洗、乙醇伊红染色液染色、乙醇逐级脱水及二甲苯透明等常规步骤,封片后镜下观察,每个视网膜随机读取3个视野,计数3次,取平均值,计算各组RGC密度。

1.7 统计学方法 采用SPSS 17.0软件对实验结果进行统计学处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖水平 造模48 h后,糖尿病组及PTS治疗组血糖明显高于对照组(均 $P < 0.001$),糖尿病模型构建成功,见表1。

Table 1 Comparison of blood glucose, expression of Nogo receptor, the level of MDA, and density of RGC between three groups

表1 3组大鼠血糖、视网膜Nogo受体表达、MDA含量及RGC密度比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	血糖 (mmol/L)	Nogo受体	MDA (μmol/g)	RGC密度 (个/mm ²)
对照组	4.5±0.3	0.20±0.06	3.51±0.61	1 201±305
糖尿病组	25.4±1.6 ^a	0.42±0.08 ^a	7.72±2.03 ^a	784±256 ^a
治疗组	20.1±1.2 ^a	0.27±0.10 ^b	4.12±1.48 ^b	1 038±284 ^b
<i>F</i>	248.149**	302.263**	324.462**	274.526**

** $P < 0.01$;^a与对照组比较,^b与糖尿病组比较, $P < 0.001$

2.2 Brn3a和Nogo受体表达情况 荧光免疫组化双

标显示,Brn3a与Nogo受体于视网膜内大量共存,见图1。

2.3 PTS对糖尿病大鼠视网膜Nogo受体表达的影响 糖尿病组Nogo受体表达水平明显高于对照组和治疗组,差异有统计学意义($P < 0.001$),见表1、图2。

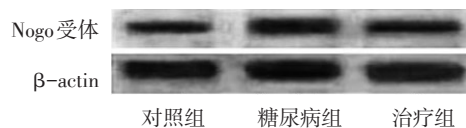


Figure 2 Expression levels of retinal Nogo receptor in three groups

图2 各组视网膜Nogo受体表达

2.4 PTS对糖尿病大鼠视网膜MDA含量的影响 3组间MDA含量差异有统计学意义($P < 0.01$),糖尿病组高于对照组和治疗组(均 $P < 0.001$),见表1。

2.5 PTS对糖尿病大鼠RGC密度的影响 糖尿病组视网膜神经节细胞层RGC密度较对照组和治疗组明显减少($P < 0.001$),见表1、图3。

3 讨论

糖尿病累及视网膜即发生DR,视网膜RGC受损是DR患者视力减退的重要原因^[4]。糖尿病患者DR发病率高,即使严格控制血糖也不能完全防治DR,患者仍有视力减退甚至失明的危险。糖尿病病程5年患者DR发病率约为44.4%,7年约为56%左右,10年约60%,15年则高达80%^[5-6]。预计2030年全球糖尿病患者将达3亿6千万^[7],DR已经成为成年人致盲的重要因素^[8]。

三七是一种传统中药,PTS是三七的重要活性成分之一。本研究发现,糖尿病大鼠视网膜RGC数量明显减少,给予PTS可恢复糖尿病大鼠视网膜RGC数量,表现出了明显的神经保护作用。

PTS保护缺血脑神经元的机制尚不完全清楚,可能与PTS抑制神经元Nogo受体及其配体Nogo-A的表达,促进脑缺血后的神经再生有关^[2-3]。Nogo受体是一种髓磷脂相关蛋白,可抑制神经再生,在视网膜仅表达于RGC细胞内^[9]。本研究也发现,Nogo受体与Brn3a在视网膜内大量共存,仅表达于视网膜RGC内。青光眼时视网膜RGC细胞Nogo受体表达增加,抑制Nogo受体表达可抑制RGC细胞凋亡,Nogo受体表达增加是视网膜RGC凋亡的重要机制之一^[10]。本研究结果显示,PTS恢复糖尿病大鼠视网膜RGC数量的同时,视网膜Nogo受体表达减少,提示下调Nogo受体表达可能是PTS保护糖尿病视网膜RGC的重要机制之一。

Nogo 受体抑制细胞凋亡的机制复杂,可影响线粒体膜电位,是细胞氧自由基堆积,导致凋亡的重要因素之一^[11]。因此,Nogo 受体可能通过氧自由基堆积诱导 RGC 细胞凋亡。高血糖可诱发氧化应激,MDA 水平是氧化应激的重要指标之一。本研究表明,糖尿病时视网膜 MDA 水平增高,说明糖尿病视网膜氧化应激明显。PTS 下调糖尿病大鼠视网膜 Nogo 受体表达的同时,伴有视网膜 MDA 含量的降低,表明 PTS 下调糖尿病大鼠视网膜 Nogo 受体表达的同时可降低视网膜氧化应激水平。因此,PTS 可能通过下调 RGC 内 Nogo 受体的表达,抑制 RGC 氧化应激反应,从而对糖尿病视网膜 RGC 发挥保护作用。

本研究证实了 PTS 对糖尿病大鼠视网膜 RGC 的保护作用,并研究了作用机制,为 DR 的临床治疗提供了思路,但 DR 发病机制复杂,PTS 在 DR 防护中的作用仍需深入探讨。

(图 1、3 见插页)

参考文献

- [1] Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, et al. Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(2): 2559-2572.
- [2] 朱陵群,王席玲,邹忆怀,等.三七三醇皂苷对 MCAO 大鼠不同恢复时点 Nogo-A 和其受体 NgR mRNA 表达的影响[A]. 中华中医药学会脑病分会成立大会暨 2008 年全国中医脑病学术研讨会论文汇编,2008, 181-185.
- [3] 翟建英,崔方圆,邹蔚萌,等.三七三醇皂苷对脑梗死后不同时点 Nogo-A 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(4):470-473.
- [4] 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.
- [5] Malone JL, Morrison AD, Pavan PR, et al. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial [J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(3): 522-526.
- [6] Nakajima M, Cooney MJ, Tu AH, et al. Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(9): 2110-2114.
- [7] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5): 1047-1053.
- [8] Silva PS, Cavallerano JD, Sun JK, et al. Effect of systemic medications on onset and progression of diabetic retinopathy [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 6(9): 494-508.
- [9] Yin X, Chen C, Yuan R, et al. An immunofluorescence-histochemistry study of the Nogo receptor in the rat retina during postnatal development [J]. *Ann Ophthalmol (Skokie)*, 2007, 39(2):140-144.
- [10] Fu QL, Liao XX, Li X, et al. Soluble Nogo-66 receptor prevents synaptic dysfunction and rescues retinal ganglion cell loss in chronic glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(11):8374-8380.
- [11] Al-Shabraway M, Smith S. Prediction of diabetic retinopathy: role of oxidative stress and relevance of apoptotic biomarkers [J]. *EPMA J*, 2010, 1(1):56-72.

(2013-05-17 收稿 2013-06-27 修回)

(本文编辑 魏杰)

读者·作者·编者

我刊稿件可实现数字优先出版

为了缩短优秀稿件与读者见面的时间,我刊已经与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社签署了数字优先出版协议。凡是具有国家级或省部级以上级别的基金文章,只要文章内容与基金内容相符,待文章定稿并交纳版面费后,作者可与编辑部另签署一份授权协议,即可使该文在纸质版见刊前以数字出版的形式提前与读者见面。届时,该文章可在中国知网数据库中被检索到。数字出版等同于正式出版。

《天津医药》编辑部

三七三醇皂苷对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的保护作用

(正文见 1103 页)

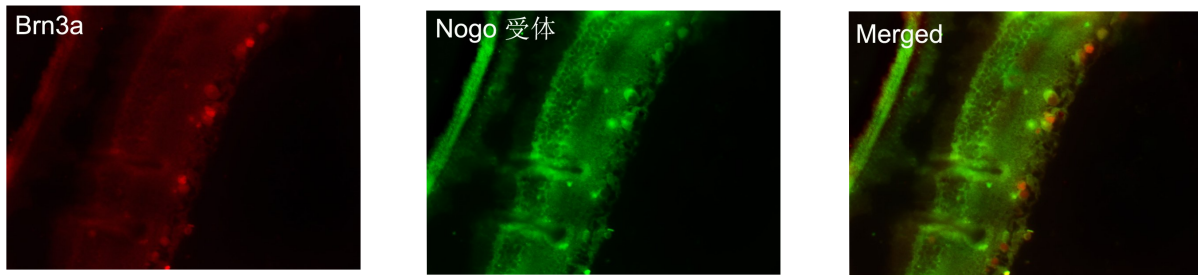
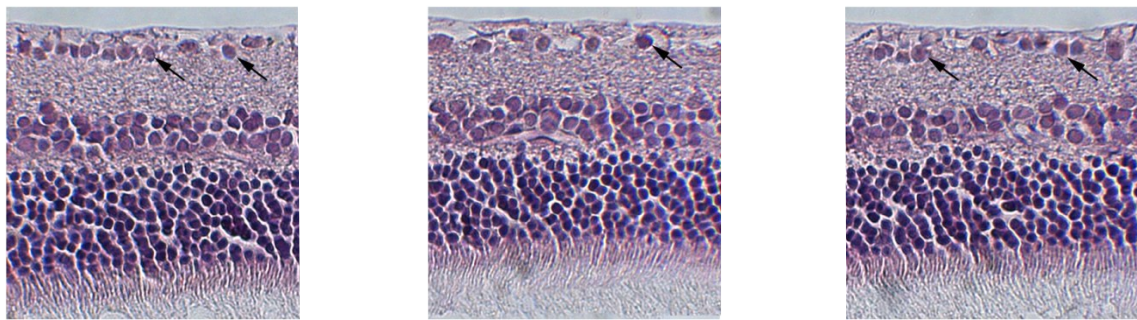


Figure 1 Colocalization of Brn3a and Nogo receptor in retina (immunofluorescence histochemical double-staining×200)

图1 Brn3a与Nogo受体在视网膜内的共存(荧光免疫组化双标,×200)



对照组

糖尿病组

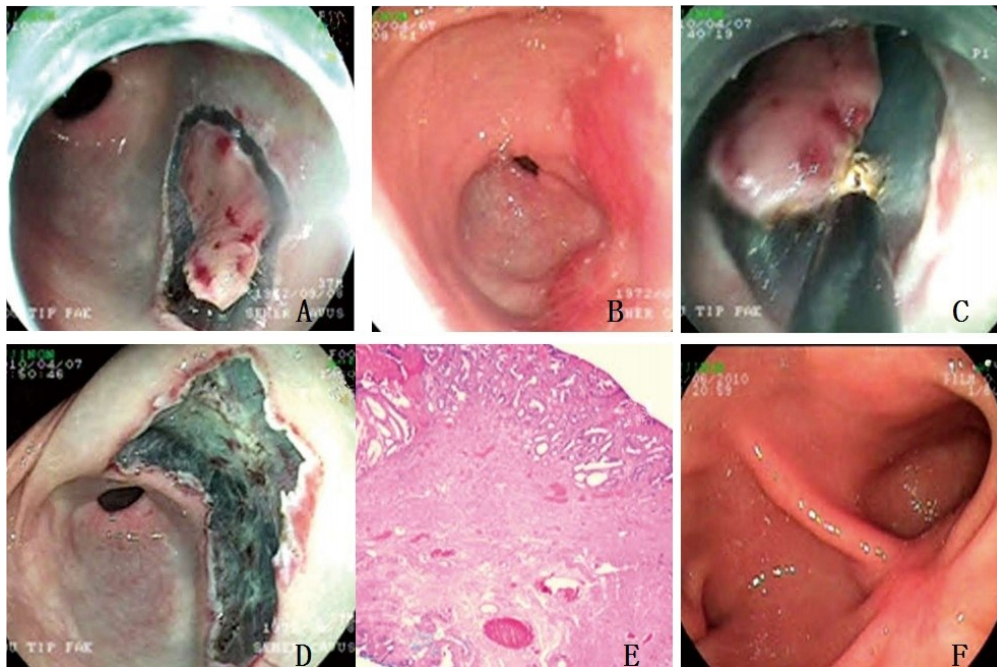
治疗组

Figure 3 Photos showing the number of RGC in three groups of diabetic rats (HE staining,×200)

图3 3组糖尿病大鼠RGC密度(HE染色,×200)

内镜黏膜下剥离治疗早期胃癌的临床疗效

(正文见 1129 页)



A: 标记病灶范围; B: 内镜显示平坦型腺瘤位于胃窦部; C: 黏膜下切除病灶; D: 病灶切除后; E: 组织病理示为腺瘤, 胃黏膜异型腺体扩张 (HE,×400); F: 术后1年肿瘤无复发

Figure 1 The diagnosis of early gastric cancer by endoscopy

图1 内镜下诊断为早期胃癌