

网络出版时间: 网络出版地址:

◇论 著◇

左卡尼汀对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞保护作用的实验研究

于常红¹, 韩彦毅¹, 曹玉², 安明², 时肖¹, 杨军廷¹, 焦俊¹, 李胜³, 王春波¹

(1. 青岛大学医学院生物学教研室, 2. 青岛大学医学院附属医院, 山东 青岛 266071; 3. 山东省医学科学院, 山东 济南 250062)

doi:10.3969/j.issn.1001-1978.2013.11.007

文献标志码: A 文章编号: 1001-1978(2013)11-1502-04

中国图书分类号: R-332; R322.91; R587.2; R774.102.2; R774.105

摘要:目的 研究左卡尼汀对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的保护作用。方法 通过 STZ 诱导建立 I 型糖尿病大鼠模型, 成模后采用灌胃方式给予不同剂量的左卡尼汀口服液, 6 周后行电镜观察, 比较疾病模型组与治疗组之间视网膜节细胞的超微结构变化, 并进行 DNA 末端转移酶介导缺口末端标记 (TUNEL) 染色, 观察细胞的凋亡情况。结果 电镜显示药物治疗组神经节细胞核异染色质及线粒体空泡化较对照组减少, 200 mg·kg⁻¹ 的治疗剂量效果优于 100 mg·kg⁻¹ 组 ($P < 0.05$)。药物治疗组减少了由糖尿病导致的视网膜神经节细胞的凋亡数目 ($P < 0.05$)。结论 左卡尼汀对糖尿病大鼠模型视网膜节细胞具有保护作用, 抗凋亡可能是作用机制之一。

关键词: 左卡尼汀; 糖尿病视网膜病变; 电镜; 凋亡; 视网膜神经节细胞; 大鼠

收稿日期: 2013-05-23, 修回日期: 2013-07-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No 81100697, 812710440); 山东省中青年科学家科研奖励基金计划项目 (No 2011BSB01433); 山东省高等学校科技计划项目 (No J111LF20); 青岛市科技计划基础研究项目 (No 11-2-4-2-(3)-jch)

作者简介: 于常红 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 眼科学应用基础, 通讯作者, E-mail: yuchqd@gmail.com; 王春波 (1955-), 女, 教授, 博士生导师, 通讯作者

糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病的严重并发症之一, 是成年人主要的致盲性眼病。由于发病机制复杂, 一直以来缺乏有效的治疗手段。由于激光和手术治疗不能阻止 DR 的病情发展, 随着对 DR 发病机制的深入研究, 人们发现药物治疗可以阻断 DR 发病的多个途径, 但目前常用的药物如抗血管内皮生长因子和糖皮质激素等等, 在评价其治疗有效性及远期安全性等方面备有争议^[1]。因此, 寻找安全有效的药物, 用于 DR 的早期治疗, 对降低致盲率尤为重要。

左卡尼汀 (L-carnitine, LC) 是机体能量代谢中必需的体内天然物质, 是组织缺血缺氧时主要的能量来源, 对神经组织有明显的保护作用。近年来发现其在血-视网膜屏障中具有较高的通透性, 本研究拟通过建立糖尿病鼠早期视网膜神经损害模型, 观察左卡尼汀对 DR 早期的治疗作用, 为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 成年 ♂ Wistar 大鼠, 体质量 240~280 g [山东鲁抗医药股份有限公司实验动物中心, 动物合格证号: SLXK(鲁)20110002]; 左卡尼汀口服液 (Sigma 公司, 美国); 链脲佐菌素 (STZ)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (凯基生物公司); 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器 倒置相差显微镜 (IX-50 型, 日本 OLYMPUS); 血糖仪 (北京怡成生物电子技术有限公

Modular deconstruction of complex drug-disease networks

ZHANG Ying-ying, CHEN Yin-ying, WANG Zhong, WANG Yong-yan

(Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: It is emphasized that drug combination fight against complex disease. Network pharmacology is considered to utilize network to analyze the complicated mechanism of drug actions. Deconstructing this network by module attracts our attention. Through the brief introduction of module related basics including conception, partitioning method and structural features, we hope

to enable you to understand that how to use module to decode the complex mechanisms of drug intervention in order to further identify the advantages of modular analytical method.

Key words: network; module; network pharmacology; module pharmacology; complex diseases; mechanism

司);石蜡切片机(日本 LEICA);透射电镜(JEM-1200EX型,日本 JEOL 电子公司)

1.3 实验方法

1.3.1 糖尿病大鼠模型的建立及分组 实验室标准条件下,32只大鼠适应性喂养2周后,随机分为4组:正常对照组、糖尿病模型组、低剂量药物治疗组和高剂量药物治疗组。糖尿病模型组和药物治疗组给予 $57\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ STZ腹腔注射,48 h后测尾静脉血糖,空腹血糖达到 $16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上为建模成功(测试前禁食12 h)。建模后,低剂量药物治疗组大鼠给予左卡尼汀口服液 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,每天1次;高剂量药物治疗组大鼠给予左卡尼汀口服液 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,每天1次;糖尿病模型组大鼠给予 0.35 ml 的 $142\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 生理盐水灌胃,每天1次。每周测1次体重及血糖,6周后处死大鼠,取视网膜行电镜等检查。

1.3.2 视网膜标本电镜检测 活体下摘除眼球,放入质量分数为2.5%的戊二醛(pH 7.2)中固定5 min后取出视网膜组织,切成 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 组织块继续固定。常规乙醇脱水,Epon812环氧树脂包埋,超薄切片(50 nm),醋酸双氧铀硝酸铅染色,透射电镜观察视网膜细胞的超微结构变化并拍片。

1.3.3 DNA末端转移酶介导缺口末端标记(TUNEL)染色观察视网膜节细胞凋亡 石蜡切片常规脱蜡后,PBS冲洗,分别滴加蛋白酶K、DNase及封闭工作液进行孵育,PBS冲洗后,TdT酶反应液室温下作用20 min后,用PBS冲洗,Streptavidin-HRP $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应0.5 h,PBS冲洗后进行DAB显色,苏木精复染。乙醇梯度脱水后封片,光镜下计数视网膜节细胞的凋亡数目,用IPP6.0图像分析软件分析染色结果,进行统计分析。计算凋亡指数AI以分析TUNEL染色结果:AI=(凋亡细胞数量/细胞总数量) $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件行统计学分析,各组用重复测量及单因素方差分析。多重比较用LSD(方差齐性)或Tamhane's T2(方差不齐性)法。

2 结果

2.1 血糖测定 模型组大鼠表现精神萎靡,反应迟钝,毛发散乱,多饮多食及体质量减轻等变化。模型组建模成功后6周内测空腹血糖均大于 $16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,分别于第1,3,5,6周测组内平均血糖为(5.1 ± 0.4)、(21.9 ± 2.5)、(21.6 ± 2.3)、(20.4 ± 2.1) $\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,单纯模型及治疗组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见Fig 1。

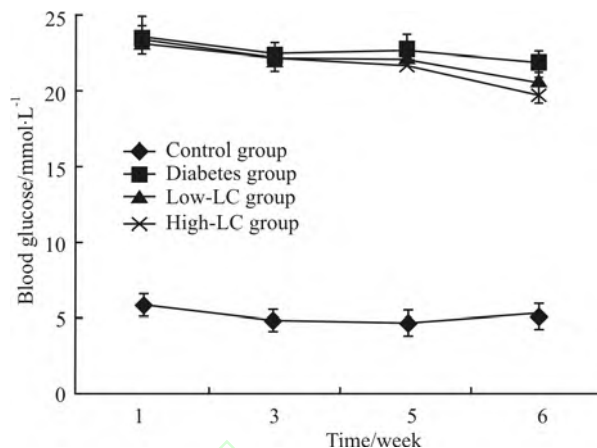


Fig 1 Blood-fasting sugar levels of 4 group rats in 6 weeks

2.2 视网膜神经节细胞电镜检查结果 透射电镜显示,单纯模型组视网膜节细胞核形态不规则,可见异染色质浓集边聚,吞饮小泡增多,粗面内质网及线粒体肿胀变性,甚至呈空泡状(Fig 2 C、D);正常对照组细胞核异染色质分布均匀,细胞器形态正常,线粒体嵴完整(Fig 2 A、B)。药物治疗组,细胞核染色较单纯模型组淡,异染色质减少,线粒体空泡化减轻,其中,高剂量组(Fig 2 G、H)较低剂量组(Fig 2 E、F)变化明显。

2.3 视网膜神经节细胞凋亡检测 光学显微镜下观察视网膜各层,细胞核呈棕黄色颗粒染色的即为凋亡细胞。TUNEL检测结果分析各组平均凋亡细胞指数依次为(3.7 ± 0.3)%、(12.3 ± 2.6)%、(10.5 ± 1.5)%和(8.1 ± 0.8)%。每一组与前一组间及高剂量治疗组与糖尿病组间分别做两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见Fig 3。

3 讨论

作为人类糖尿病视网膜病变的背景期病理模型,STZ诱导的I型糖尿病大鼠是目前比较成熟的模型,因为二者的早期视网膜病理变化过程极其相似^[2]。血-视网膜屏障的破坏和微血管病变一直被认为是DR早期的典型特征。近年来发现,在患者出现典型的视网膜微血管改变之前,就已出现了视功能的减退及视神经的损伤,包括对比敏感度、色觉和视网膜电图等的异常。国外研究发现:建立I型糖尿病大鼠模型4周后,就出现了视网膜内层变薄及神经细胞的丢失与凋亡^[3],神经节细胞的损害在DR患者体内也得到证实^[4],作为视觉传导通路中的枢纽,节细胞对细胞损伤和神经毒性作用高度敏感,为糖尿病视网膜早期病变提供了一个非常有效的研究对象^[5]。早期有效的抑制视网膜神经细胞的受损及凋亡是遏制DR的发生和发展,保护糖

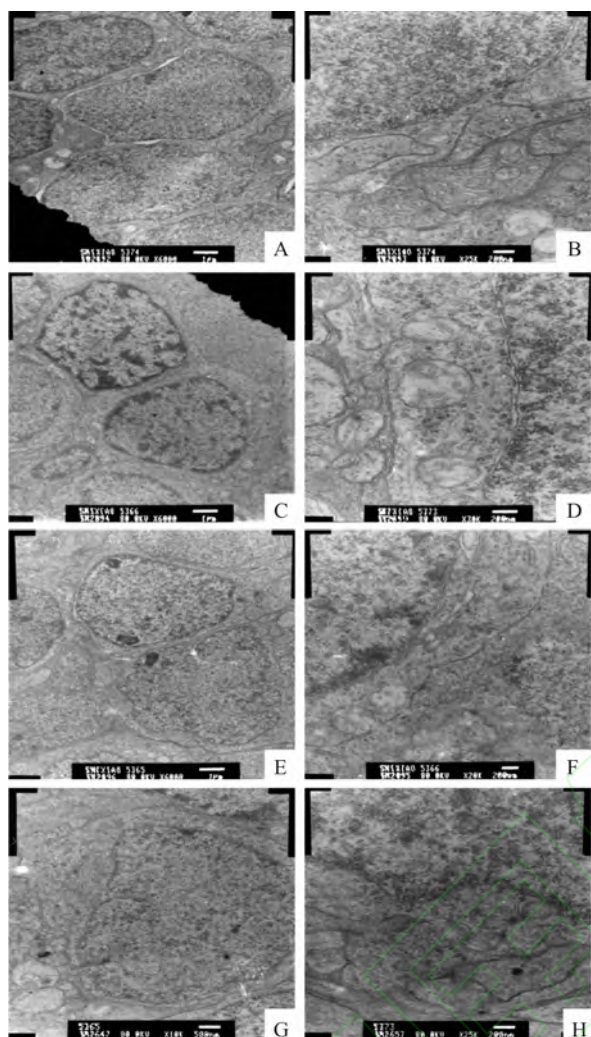


Fig 2 Ultrastructure of retinal ganglion cell of the diabetic rat by electron microscope

Nucleus(A,C,E,G) & mitochondria (B,D,F,H) ($\times 6\ 000 - \times 30\ 000$). A,B: Control group; C,D: Diabetes group; E,F: Low-LC group; G,H: High-LC group

尿病患者视功能的关键。

左卡尼汀可明显改善脂质代谢紊乱,促进葡萄糖转化,改善糖耐量,逆转胰岛素抵抗,已广泛用于代谢性及神经性疾病的治疗。本实验中发现在高血糖的内环境中,6周后大鼠视网膜已出现了DR早期的超微结构变化,通常缺氧会导致细胞中脂酰-CoA堆积,进而改变细胞膜结构的通透性,致使膜相崩解,细胞死亡^[6-8]。另外,由于线粒体是有氧呼吸细胞器,一旦缺氧必将引起氧化磷酸化障碍,ATP产生减少及线粒体肿胀,细胞内的这些病理改变会导致神经节细胞退化消失,表现为神经传导迟滞,视觉功能受损。而足够量的游离卡尼汀可促使堆积的脂酰-CoA进入线粒体内,减少其对腺嘌呤核苷酸转位酶的抑制,使氧化磷酸化得以顺利进行,增加组

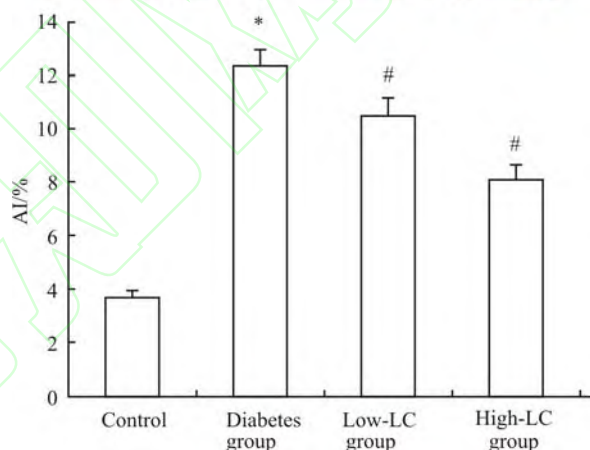
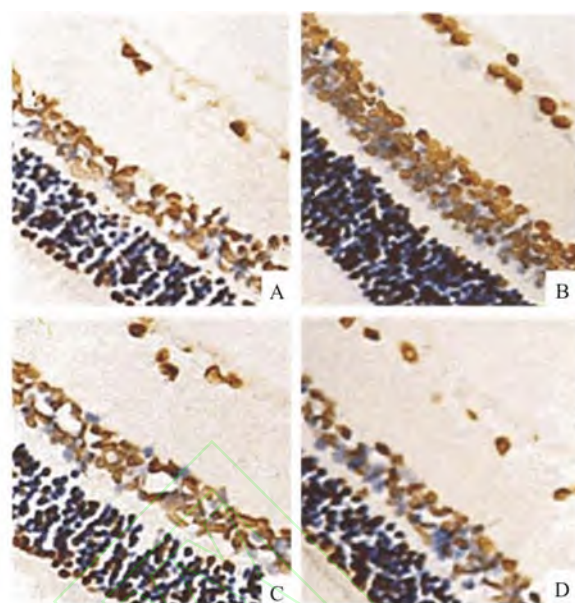


Fig 3 Apoptosis of retinal ganglion cell in the diabetic rat by TUNEL(400 ×)

A: Control; B: Diabetes group; C: Low-LC group; D: High-LC group. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs diabetes group

织供能,改善微循环,缓解DR进程^[9-10]。

我们通过TUNEL检测到的凋亡率与国外报道的一致^[11],实验中 $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的左卡尼汀口服液对节细胞表现出明显的保护作用,减轻了细胞核及线粒体的损害程度,降低了凋亡率。通过人体与大鼠体表面积换算,人体相应治疗剂量约为 $35\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天1次。相关研究证实,在糖尿病患者的并发症期,血清游离左卡尼汀降低了约25%^[12-13],近年来又发现左卡尼汀具有渗透特性,国外已用于年龄相关性眼病的治疗,证明安全有效^[14]。这些研究为预防和逆转DR的发生发展带来了新的希望。

总之,视网膜神经细胞中丰富的类脂含量以及以糖酵解为主要供能方式的特点,都使得左卡尼汀与视网膜的代谢息息相关。作为能量代谢中一种必需的营养素,左卡尼汀可能通过抗氧化与抗凋亡等

机制参与对视网膜的保护作用,但具体发生的机制我们将进一步探究。

参考文献:

- [1] Stitt A W, Lois N, Medina R J, et al. Advances in our understanding of diabetic retinopathy[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, **125** (1):1-17.
- [2] Robinson R, Barathi V A, Chaurasia S S, et al. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals[J]. *Dis Model Mech*, 2012, **5** (4):444-56.
- [3] Alistair J, Barber Thomas W, Gardner Steven F, et al. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, **52** (2):1156-63.
- [4] Araszkievicz A, Zozulińska-Ziókiewicz D, Meller M, et al. Neurodegeneration of the retina in type 1 diabetic patients[J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2012, **122** (10):464-70.
- [5] You Y, Gupta V K, Li J C, et al. Optic neuropathies: characteristic features and mechanisms of retinal ganglion cell loss[J]. *Rev Neurosci*, 2013, **24** (3):301-21.
- [6] Calandrella N, De Seta C, Scarsella G, Risuleo G. Carnitine reduces the lipoperoxidative damage of the membrane and apoptosis after induction of cell stress in experimental glaucoma[J]. *Cell Death Dis*, 2010, **1**:e62. doi: 10.1038/cddis.2010.40.
- [7] 孙振龙,王晨静,曲海军,等. 左卡尼汀口服液对2型糖尿病肾病的治疗作用及体内代谢研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, **28** (6):815-8.
- [7] Sun Z L, Wang C J, Qu H J, et al. The metabolism and effect of LC oral liquid on type 2 diabetic nephropathy[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2012, **28** (6):815-8.
- [8] 姚秀云,杨育红,宋莹,等. 左卡尼汀对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥厚的保护作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, **28** (4):540-4.
- [8] Yao X Y, Yang Y H, Song Y, et al. Preventing effect of L-carnitine on isoindol-3-pyridine induced myocardial hypertrophy and its mechanism[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2012, **28** (4):540-4.
- [9] Evans J D, Jacobs T F, Evans E W. Role of acetyl-L-C in the treatment of diabetic peripheral neuropathy[J]. *Ann Pharmacother*, 2008, **42** (11):1686-91.
- [10] Pescosolido N, Imperatrice B, Karavitis P. Ocular disorders secondary to systemic disease and the potential role of LCs[J]. *Drugs R D*, 2008, **9** Suppl 1:15-22.
- [11] Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, et al. A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat[J]. *Diabetes*, 2003, **52** (2):506-11.
- [12] Poorabbas A, Fallah F, Bagdadchi J, et al. Determination of free L-C levels in type II diabetic women with and without complications[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2007, **61** (7):892-5.
- [13] Tamamoğullari N, Siliğ Y, İçağasıoğlu S, Atalay A. Carnitine deficiency in diabetes mellitus complications[J]. *J Diabetes Complications*, 1999, **13** (5-6):251-3.
- [14] Pescosolido N, Imperatrice B, Karavitis P. The aging eye and the role of L-carnitine and its derivatives[J]. *Drugs R D*, 2008, **9** Suppl 1:3-14.

Protective effect of L-carnitine on retinal ganglion cells in the diabetic rat

YU Chang-hong¹, HAN Yan-tao¹, CAO Yu², AN Ming², SHI Xiao¹,
YANG Jun-ting¹, JIAO Jun¹, LI Sheng³, WANG Chun-bo¹

(1. Dept of Biology, Medical College of Qingdao University, Qingdao Shandong 266071, China;

2. the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao Shandong 266071, China;

3. Academy of Medical Science of Shandong, Jinan 250062, China)

Abstract: Aim To investigate the protective effect of L-carnitine (LC) on the diabetic retinopathy of the rat.

Methods Different doses of LC were given to experimental rats by intragastric administration, to treat type I diabetic rat model induced by streptozotocin (STZ) for 6 weeks. As a result, the ultrastructure of retinal ganglion cells between the diabetic model group and the treat groups was detected and compared with electron microscope technique, and subsequently the apoptosis state of retina ganglion cells was assessed by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique. **Results** Com-

pared with the control group, a decrease in the nuclear heterochromatin and mitochondria vacuolization in the ganglion cells of the treat groups was observed, and the better effect was also found in 200 mg · kg⁻¹ group than in 100 mg · kg⁻¹ group ($P < 0.05$). In addition, the apoptotic cells were less in treat groups than in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** LC could protect the rat retinal ganglion cells against diabetic damage, and anti-apoptosis is probably one mechanism concerned.

Key words: L-carnitine; diabetic retinopathy; electron microscope; apoptosis; retinal ganglion cells; rat