

生长激素释放肽对糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用

白洁¹, 张锦妹¹, 刘丽苹¹, 王佳妮¹, 孙雯², 杨帆³

引用: 白洁, 张锦妹, 刘丽苹, 等. 生长激素释放肽对糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用. 国际眼科杂志 2021; 21(11): 1861-1864

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.81900836); 2021年度第一批金华市重大(重点)科学技术研究计划(No.2021-3-007)

作者单位: (322000) 中国浙江省义乌市, 浙江大学医学院附属第四医院¹眼科; ³党政综合办; ²(310003) 中国浙江省义乌市, 浙江大学医学院附属第一医院眼科

作者简介: 白洁, 毕业于哈尔滨医科大学, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 副研究员, 研究方向: 晶状体、视网膜疾病。

通讯作者: 杨帆, 毕业于哈尔滨师范大学, 硕士, 科员, 研究方向: 医学教学方法. 576838247@qq.com

收稿日期: 2021-03-31 修回日期: 2021-10-11

摘要

目的: 探讨生长激素释放肽(ghrelin)对糖尿病大鼠视网膜病变的影响并研究其保护作用。

方法: 雄性SD大鼠18只分为对照组、模型组、ghrelin组, 采用HE染色观察视网膜形态, TUNEL染色观察细胞凋亡, 透射电镜观察视网膜色素上皮层超微结构, 免疫组化检测氧化应激指标, ELISA检测炎症因子含量。

结果: 形态学观察结果显示, ghrelin可减轻视网膜组织损伤程度, 降低糖尿病大鼠视网膜组织细胞凋亡; 免疫组化结果显示, 与模型组比较, ghrelin组大鼠视网膜组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性升高, 丙二醛(MDA)含量下降($P < 0.05$); ELISA结果显示, 模型组细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素- 1β (IL- 1β)表达较对照组升高($P < 0.05$), ghrelin干预后, 炎症因子表达均下降, 与模型组比较有差异($P < 0.05$)。

结论: Ghrelin治疗糖尿病大鼠后, 能有效延缓糖尿病大鼠视网膜病变的进程, 其作用机制与降低氧化应激水平、抑制炎症反应相关。

关键词: 生长激素释放肽; SD大鼠; 视网膜; 氧化应激; 炎症因子

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.11.05

Protective effect and mechanism of growth hormone releasing peptide on diabetic retinopathy in rats

Jie Bai¹, Jin-Mei Zhang¹, Li-Ping Liu¹, Jia-Ni Wang¹, Wen Sun², Fan Yang³

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81900836); Jinhua Major (Key) Science and Technology

Research in 2021 (No.2021-3-007)

¹Department of Ophthalmology; ³Department of Public, the Fourth Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Yiwu 322000, Zhejiang Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Yiwu 310003, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Fan Yang. Department of Public, the Fourth Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Yiwu 322000, Zhejiang Province, China. 576838247@qq.com

Received: 2021-03-31 Accepted: 2021-10-11

Abstract

• AIM: To investigate the effect of growth hormone releasing peptide (ghrelin) on diabetic retinopathy in rats and study its protective effect.

• METHODS: Eighteen male SD rats were divided into control group, model group and ghrelin group. HE staining was used to observe the morphology of retina, TUNEL staining was used to observe apoptosis, transmission electron microscope was used to observe the ultrastructure of retinal pigment epithelium, immunohistochemistry was used to detect oxidative stress index, and ELISA was used to detect the content of inflammatory factors.

• RESULTS: Morphological observation showed that ghrelin could reduce the degree of retinal tissue damage and the apoptosis of retinal tissue in diabetic rats. The results of immunohistochemistry showed that the activities of SOD (superoxide dismutase) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in retina tissue of ghrelin group were increased, and the content of malondialdehyde (MDA) was decreased, compared with model group ($P < 0.05$). ELISA results showed that intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- 1β (IL- 1β) in model group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). After ghrelin intervention, the expression of inflammatory factors decreased, compared with model group ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Ghrelin could effectively retard the progression of diabetic retinopathy in diabetic rats, and its mechanism was related to lowering the level of oxidative stress and inhibiting inflammation.

• KEYWORDS: growth hormone releasing peptide; SD rats; retina; oxidative stress; inflammation

Citation: Bai J, Zhang JM, Liu LP, et al. Protective effect and mechanism of growth hormone releasing peptide on diabetic retinopathy in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021; 21(11): 1861-1864

0 引言

研究显示,我国糖尿病发病率约为3%~5%,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病微血管病变中最重要的表现,其发病率大约占糖尿病患者的30%~60%,其病因与糖尿病患者胰岛细胞代谢异常有关^[1-2]。DR早期症状不明显,伴随病情进展,可出现视力下降、视物变形、眼前黑影飘动等症状,因此,早期治疗非常重要。生长激素释放肽(growth hormone releasing peptide, ghrelin)具有提高神经元存活率、调节细胞凋亡、抗炎、增强免疫力和抗氧化等生物活性。ghrelin已被证明是治疗多种疾病的有效药物,包括脑组织缺血再灌注、胃肠道间质瘤、糖尿病神经病变、心肌梗死和肺损伤等^[3-4]。在我们之前的工作中,评估了ghrelin对人晶状体上皮细胞的抗氧化作用,并证明它能够吸收入血,通过血眼屏障,可能对白内障有治疗作用^[5]。既然ghrelin对晶状体有保护作用,是否对眼部其他组织(视网膜)也能发挥保护作用呢,我们查阅了相关文献,尚未找到关于ghrelin对视网膜组织保护作用的相关报道。本实验中,我们进一步探索ghrelin对视网膜组织的保护作用,进一步为ghrelin作为临床药物在眼部组织的应用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

生长激素释放肽(批号:MB11195,大连美仑生物技术有限公司),高脂饲料(配方:基础饲料+15%猪油+20%蔗糖+蛋黄3%,北京小泰有泰生物科技有限公司),链脲佐菌素(美国Sigma公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione Peroxidase, GSH-PX)活性检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)活性检测试剂盒(上海奥陆生物科技有限公司),ELISA试剂盒(美国Abcam公司),苏木精和伊红(HE)染色试剂盒(上海威奥生物科技有限公司),TUNEL凋亡检测试剂盒(美国abcam公司)、DAB显色剂(上海朝瑞生物科技有限公司),光学显微镜(Leica A60 S,德国徕卡公司),透射电镜(JEM-1000,日本电子株式会社),酶标仪(MR-96T,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

实验动物及分组:清洁级健康SD雄性大鼠30只,体重220±30g,购自哈尔滨医科大学附属第二医院,动物许可证号:SCXK(黑)2019-001,动物伦理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)认证批准该研究方案。随机分为正常对照组(普通饲料喂养)、模型组、ghrelin组,模型组和ghrelin组大鼠高脂饲料喂养4wk后,一次性腹腔注射链脲佐菌素60mg/kg,诱导糖尿病大鼠模型,正常对照组大鼠腹腔注射等剂量的生理盐水。3d后用血糖仪测定尾静脉空腹血糖,造模成功标准:72h后空腹血糖≥16.7mmol/L,造模成功后继续高脂喂养6wk。模型组大鼠在注射链脲佐菌素后死亡4只,ghrelin组死亡3只。

1.2 方法

1.2.1 给药方法

每组各取6只大鼠进行后续实验。ghrelin组每日1次给予ghrelin(100μg/kg)灌胃,对照组及模型组大鼠每日1次给予等体积0.9% NaCl注射液灌胃,连续给药2wk。

1.2.2 HE染色观察大鼠视网膜组织病理形态学变化

每组随机取3只大鼠,摘除左侧眼球后将部分视网膜组织用4%多聚甲醛固定2h,将5μm的视网膜切片置于载玻片

上,梯度酒精冲洗后HE染色,光镜拍摄图像。视网膜厚度计算方法:自视网膜内界膜至视网膜色素上皮层垂直高度。

1.2.3 TUNEL染色检测大鼠视网膜细胞凋亡

视网膜切片脱蜡后用二甲苯浸洗2次,酒精梯度脱水后加入TUNEL反应混合液,湿盒内孵育2h,甩干切片并入DAB显色液,显微镜下观察细胞核呈棕黄色的为TUNEL阳性,磷酸盐缓冲液洗切片终止显色,中性树胶封片,光镜拍摄图像。

1.2.4 透射电镜

每组取3只大鼠,摘除左侧眼球后将视网膜组织用2%戊二醛固定24h,醋酸铀溶液染色,乙醇-丙酮梯度溶液脱水,用柠檬酸铅-醋酸铀对制备视网膜的超薄切片(80nm)染色5min,透射电子显微镜观察。

1.2.5 检测氧化应激指标及炎症因子表达

取6只大鼠右侧视网膜组织,匀浆后按照试剂盒说明书检测SOD、GSH-PX及MDA活性;另取部分视网膜用ELISA法检测细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、肿瘤坏死因子-a(tumor necrosis factor-a, TNF-a)及白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)的水平,酶标仪测定每孔在450nm处的OD值。

统计学分析:采用SPSS17.0对实验数据进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SD大鼠视网膜组织病理改变

对照组视网膜组织完整,结构清晰;模型组视网膜厚度明显降低,内、外层细胞排布疏松;ghrelin组视网膜厚度较模型组增加,结构相对规整(图1)。对照组、模型组、ghrelin组视网膜厚度分别为 411.0 ± 5.77 、 353.00 ± 6.03 、 $390.00 \pm 5.77 \mu\text{m}$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组、ghrelin组与模型组视网膜厚度比较,差异均有统计学意义($t = 6.948$, $P = 0.002$; $t = 4.433$, $P = 0.011$,图2)。

2.2 视网膜TUNEL染色结果

对照组大鼠视网膜感光细胞层偶见深棕色的TUNEL染色阳性细胞。模型组TUNEL染色阳性细胞数明显增多。ghrelin干预后,TUNEL染色阳性细胞数量减少(图3)。

2.3 视网膜色素上皮层透射电镜观察

对照组细胞形态正常,细胞核呈圆形或椭圆形,细胞之间界限清晰。模型组细胞胞浆空泡化明显,细胞膜不完整或破裂,可见大量空泡及脂滴。ghrelin干预后的细胞核和细胞质结构有所改善,细胞内仍有大量空泡存在(图4)。

2.4 大鼠视网膜组织中SOD和GSH-PX及MDA相对表达量

与对照组比较,模型组大鼠视网膜组织中SOD、GSH-PX活性降低,MDA含量升高($t = 35.808$ 、 8.823 、 8.696 ,均 $P < 0.05$);与对照组比较,ghrelin组大鼠视网膜组织中SOD、GSH-PX活性降低,MDA含量升高($t = 15.410$ 、 6.710 、 11.770 ,均 $P < 0.05$);与模型组比较,ghrelin组大鼠视网膜组织中SOD、GSH-PX活性升高,MDA含量下降,差异均有统计学意义($t = 9.807$ 、 3.671 、 10.600 ,均 $P < 0.05$),见表1。

2.5 各组对大鼠视网膜组织炎症因子水平的比较

与对照组比较,模型组大鼠视网膜组织中炎症因子ICAM-1、TNF-a及IL-1β表达均升高,差异有统计学意义($t = 13.450$ 、 7.170 、 46.700 ,均 $P < 0.05$);与对照组比较,ghrelin组

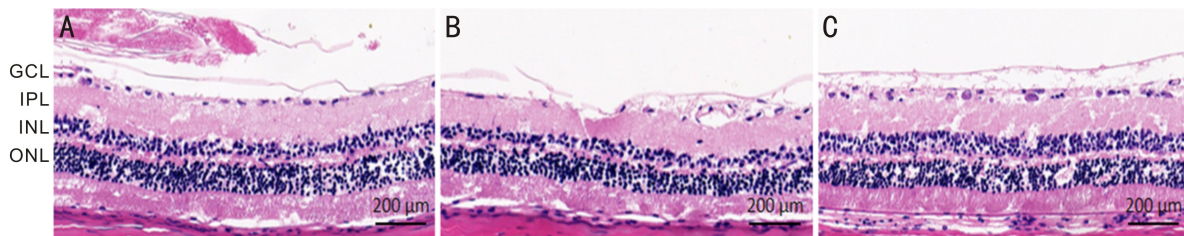


图1 大鼠视网膜组织病理改变(HE) A:对照组;B:模型组;C:ghrelin组。

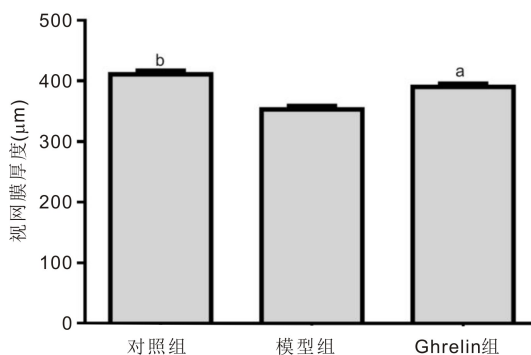


图2 三组视网膜厚度的比较 ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组。

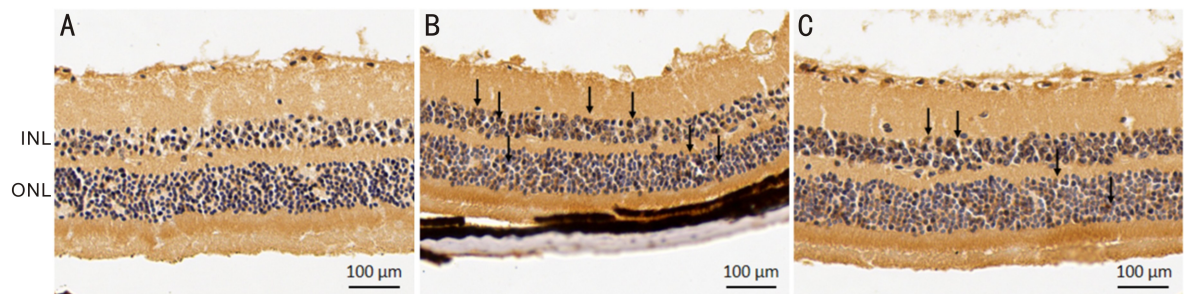


图3 大鼠视网膜 TUNEL 染色结果 箭头所示为 TUNEL 染色阳性细胞。A:对照组;B:模型组;C:ghrelin组。

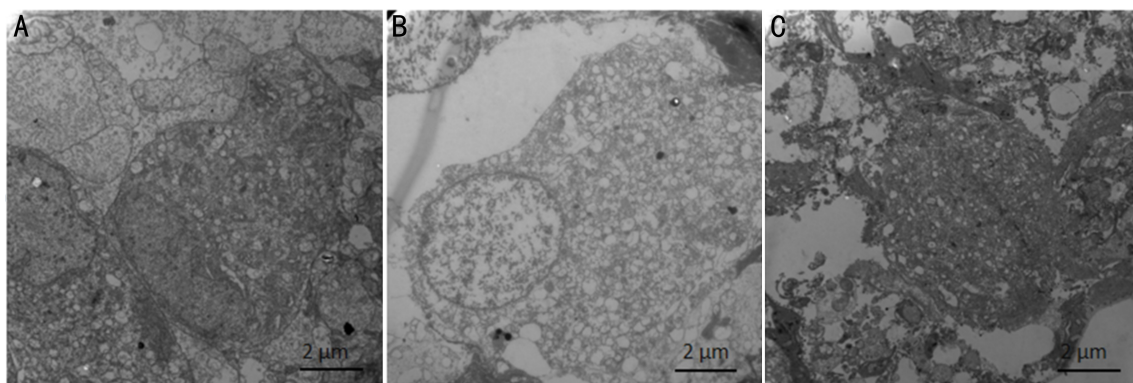


图4 电镜观察 RPE 层超微结构 A:对照组;B:模型组;C:ghrelin组。

表1 各组 SD 大鼠视网膜组织中 SOD、GSH-PX 及 MDA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, U/mg)

组别	n	SOD	GSH-PX	MDA
对照组	6	95.77±6.26	106.06±7.44	44.76±3.97
模型组	6	35.86±3.64 ^a	57.20±5.16 ^a	80.31±4.46 ^a
ghrelin 组	6	64.70±5.05 ^{a,c}	74.70±7.38 ^{a,c}	64.76±5.37 ^{a,c}
F		103.881	144.878	65.309
P		<0.05	<0.05	<0.05

注:对照组:普通饲料喂养,给予等体积 0.9% NaCl 注射液灌胃;模型组:给予糖尿病大鼠等体积 0.9% NaCl 注射液灌胃;ghrelin 组:给予糖尿病大鼠 ghrelin 灌胃。^a $P < 0.05$ vs 对照组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

大鼠视网膜组织中炎症因子 ICAM-1、TNF- α 及 IL-1 β 表达均升高,差异有统计学意义($t = 7.723, 6.197, 9.634$, 均 $P < 0.05$);与模型组比较,ghrelin 组大鼠视网膜组织炎症因子 ICAM-1、TNF- α 及 IL-1 β 表达均降低,差异有统计学意义($t = 6.813, 6.183, 5.767$, 均 $P < 0.05$),见表 2。

3 讨论

随着医学技术的发展,糖尿病患者平均寿命延长,DR 的发病率也随之增加^[6]。本实验模拟人类 2 型糖尿病的发病机制,通过腹腔注射链脲佐菌素诱发机体高血糖,建立糖尿病大鼠模型,研究药物对视网膜组织的保护作用。ghrelin 是一种内源性脑肠肽,人体胃底细胞可以少量分泌,对人体安全、无毒,保证了药物的安全性^[3,7-8]。ghrelin

表2 各组 SD 大鼠视网膜组织炎症因子水平的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	ICAM-1 (ng/L)	TNF- α (μ g/L)	IL-1 β (μ g/L)
对照组	6	24.65 \pm 3.54	15.57 \pm 3.67	79.44 \pm 8.09
模型组	6	52.77 \pm 4.75 ^a	33.54 \pm 4.73 ^a	166.30 \pm 14.54 ^a
ghrelin 组	6	38.87 \pm 5.21 ^{a,c}	23.40 \pm 3.06 ^{a,c}	115.51 \pm 12.10 ^{a,c}
F		62.332	21.545	109.844
P		<0.05	<0.05	<0.05

注:对照组:普通饲料喂养,给予等体积 0.9% NaCl 注射液灌胃;模型组:给予糖尿病大鼠等体积 0.9% NaCl 注射液灌胃;ghrelin 组:给予糖尿病大鼠 ghrelin 灌胃。^aP<0.05 vs 对照组;^cP<0.05 vs 模型组。

可减少过氧化氢、高糖等多种病理刺激诱导的细胞凋亡^[9]。ghrelin 在眼部组织中的抗凋亡作用已有多个研究报道:Liu 等^[10]已经证实 ghrelin 可以通过抑制 RGC-5 细胞的凋亡和恢复线粒体功能来保护大鼠视网膜神经节细胞免受鱼藤酮的伤害。Shimada 等^[11]测试了 Des-ghrelin 对人视网膜微血管内皮细胞的作用,发现 Des-ghrelin 可以通过减少 ROS 生成、增加抗氧化酶(MnSOD 和 CAT)的表达来减轻过氧化氢引起的损伤。但是,目前国内外尚未见关于 ghrelin 对视网膜保护作用的研究,本实验以链脲菌素诱导的 SD 大鼠为模型,率先研究了 ghrelin 对糖尿病鼠视网膜组织的影响,在国内外属于首创。

DR 早期最主要的表现为视网膜组织及细胞的凋亡。我们采用了 HE 染色、TUNEL 染色及透射电镜三种形态学检查方法观察视网膜组织的病理结构变化。HE 结果显示,模型组大鼠视网膜变薄,组织结构不清晰,结构紊乱,神经节细胞数量减少,内、外核层细胞排列疏松,表明 2 型 DR 大鼠模型造模成功,ghrelin 干预后,视网膜结构相对规整,细胞排列方式得到改善;TUNEL 染色可标记早期的凋亡细胞,模型组视网膜内核层及外核层出现明显染色阳性的凋亡细胞(深棕色类圆形),而 ghrelin 组明显降低,说明 ghrelin 干预能够减轻糖尿病大鼠视网膜组织细胞的凋亡;此外,我们还通过透射电镜对视网膜色素上皮层细胞进行了更微观的观察,以上观察结果均提示,高糖破坏了视网膜组织正常结构,诱导细胞及组织凋亡,ghrelin 可修复高糖诱导的视网膜病变。

控制 DR 的氧化应激损伤和炎症反应是治疗 DR 的重要手段之一,机体长期高糖状态使视网膜细胞处于氧化应激环境^[12]。SOD、GSH-PX 及 MDA 是氧化应激的标志性物质,ghrelin 组 SOD、GSH-PX 活性升高,MDA 含量显著降低,说明 ghrelin 可以对抗氧化因子对视网膜的“攻击”,降低了视网膜组织的氧化损伤。

炎症因子的表达水平与 DR 病情的严重程度正相关^[13]。炎症细胞因子通过破坏血-视网膜屏障在 DR 患者视网膜内高表达,促进了 DR 的发生发展^[14]。ICAM-1 是介导黏附反应重要的黏附分子,近些年逐渐引起学者关注,ICAM-1 不仅是疾病严重程度和解剖反应的生物标志物,而且可能是治疗糖尿病性黄斑水肿的一个潜在靶点;TNF- α 通过介导促进 ICAM-1 的表达介导炎症反应,增加血管通透性,刺激视网膜血管内皮细胞增殖,诱导视网

膜血流动力学异常,从而促进 DR 新生血管的形成;IL-1 β 参与免疫应答并促进微血管内皮细胞黏附分子的表达,增加缺血后中性粒细胞的黏附性和趋化性,损害血管内皮功能^[15]。本实验中,上述炎症因子在 ghrelin 干预后均明显降低,一方面证实了炎症反应在 DR 中的参与作用,另一方面说明 ghrelin 可通过降低视网膜组织细胞炎症因子表达,缓解糖尿病大鼠视网膜病理变化的进程。

综上所述,ghrelin 治疗糖尿病大鼠后,能有效延缓糖尿病大鼠视网膜病变的进程,其作用机制与降低氧化应激水平、抑制炎症反应相关。本研究依然存在不足,尚缺乏体外细胞实验进一步验证 ghrelin 对视网膜色素上皮细胞或视网膜血管内皮细胞作用的研究;另外,更深层次的机制学研究也需要探讨。随着研究内容的不断深入,我们将从更深层次出发,对 ghrelin 的生物学功效进一步探讨。

参考文献

- 1 Wang W, Amy C Y Lo. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci* 2018; 19(6):1816
- 2 Lechner J, O'Leary OE, Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res* 2017;139:7-14
- 3 Chen YY, Wu TT, Ho CY, et al. Dapagliflozin prevents NOX- and SGLT2-dependent oxidativestress in lens cells exposed to fructose-induced diabetes mellitus. *Int J Mol Sci* 2019;20:4357
- 4 Liao P, Yang D, Liu D, et al. GLP-1 and ghrelin attenuate high glucose/high lipid-induced apoptosis and aenescence of human microvascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2017; 44: 1842-1855
- 5 Bai J, Yang F, Dong L, et al. Ghrelin Protects Human Lens Epithelial Cells against Oxidative Stress-Induced Damage. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:1910450
- 6 Wang W, Lo A. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *Int J Mol Sci* 2018;19(6):1816
- 7 Fang C, Xu H, Guo S, et al. Ghrelin signaling in immunometabolism and inflamm-aging. *Adv Exp Med Biol* 2018;1090:165-182
- 8 Liao P, Yang D, Liu D, et al. GLP-1 and ghrelin attenuate high glucose/high lipid-induced apoptosis and aenescence of human microvascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2017; 44: 1842-1855
- 9 Dos-Santos RC, Reis LC, Perello M, et al. The actions of ghrelin in the paraventricular nucleus: energy balance and neuroendocrine implications. *Ann N Y Acad Sci* 2019;1455:81-97
- 10 Liu S, Chen S, Ren J, et al. Ghrelin protects retinal ganglion cells against rotenone via inhibiting apoptosis, restoring mitochondrial function, and activating AKT-mTOR signaling. *Europeptides* 2018; 67:63-70
- 11 Shimada T, Furuta H, Doi A, et al. Des-acyl ghrelin protects microvascular endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis through sirtuin 1 signaling pathway. *Metabolism* 2014;63:469-474
- 12 周亚男, 李琰, 李猛, 等. 木犀草素对糖尿病大鼠视网膜病变氧化应激通路的影响. *世界最新医学信息文摘* 2019;19(74):113-114
- 13 RübSam A, Parikh S, Fort PE. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):942
- 14 Mallmann F, Canani LH. Intravitreal neurodegenerative and inflammatory mediators in proliferative diabetic retinopathy. *Arq Bras Ophthalmol* 2019;82(4):275-282
- 15 Xie ZK, Liang H. Association between diabetic retinopathy in type 2 diabetes and the ICAM-1 rs5498 polymorphism: a meta-analysis of case-control studies. *BMC Ophthalmol* 2018;18(1):297