

# 新型海藻多糖化合物保护高糖诱导的 RPE 细胞异常增殖

谢佩玉<sup>1,2</sup>, 松仓诚<sup>2</sup>, 藤井绩<sup>2</sup>, 赵基恩<sup>3</sup>, 筱原诚<sup>3</sup>, 张晓梅<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一临床医学院附属眼科医院;<sup>2</sup>(860-0082)日本熊本县,崇城大学药学部药物治疗实验室;<sup>3</sup>(869-5461)日本熊本县,芦北发育性残疾人治疗机构

作者简介:谢佩玉,硕士,医师,现为日本熊本大学医学部在读博士,研究方向:眼底病。

通讯作者:张晓梅,博士,教授,主任,研究方向:眼底病. zhangxm66@tom.com

收稿日期:2010-11-22 修回日期:2011-01-27

## Protective effect of a novel polysaccharide compound derived from algae on abnormal proliferation of high glucose-induced retinal pigment epithelial cells

Pei-Yu Xie<sup>1,2</sup>, Makoto Matsukura<sup>2</sup>, Isao Fujii<sup>2</sup>, Ji-En Zhao<sup>3</sup>, Makoto Shinohara<sup>3</sup>, Xiao-Mei Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin150001, Heilongjiang Province, China;

<sup>2</sup>Laboratory of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, Kumamoto Prefecture, Japan; <sup>3</sup>Ashikita Institution for Developmental Disabilities, Kumamoto Prefecture, Japan

**Correspondence to:** Xiao-Mei Zhang. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin150001, Heilongjiang Province, China. zhangxm66@tom.com

Received:2010-11-22 Accepted:2011-01-27

## Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of a novel polysaccharide compound derived from algae on high glucose-induced abnormal proliferation of retinal pigment epithelial (RPE) cells.

• **METHODS:** RPE cells were divided into 3 groups: blank control group, high glucose group and polysaccharide compound group. RPE cells were exposed with 30 mmol/L high glucose in high glucose group, and exposed with 30 mmol/L high glucose and 200mg/L polysaccharide compound in polysaccharide compound group. Cell viability of RPE cells was determined by MTT cell viability assay at different time points (6, 12, 24, 36 hours).

• **RESULTS:** High glucose caused abnormal proliferation of RPE cells, which was abrogated in polysaccharide compound group ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** The novel polysaccharide compound derived from algae can protect RPE cells from high glucose-induced abnormal proliferation.

• **KEYWORDS:** high glucose; polysaccharide compound; retinal pigment epithelial cells

Xie PY, Matsukura M, Fujii I, *et al.* Protective effect of a novel polysaccharide compound derived from algae on abnormal proliferation of high glucose-induced retinal pigment epithelial cells. *Cuqi Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(3):409-410

## 摘要

**目的:**研究在高糖条件下,从海藻中萃取的新型多糖化合物对高糖诱导的视网膜色素上皮(RPE)细胞异常增殖的保护作用。

**方法:**将体外培养的 RPE 细胞分为空白组、高糖组和多糖化合物组,空白组为正常 RPE 细胞培养液,高糖组为含 30mmol/L 葡萄糖的培养液,多糖化合物组为含 30mmol/L 葡萄糖和 200mg/L 多糖化合物的培养液。应用 MTT 法测量 36h 内不同时间点(6, 12, 24 和 36h)高糖以及多糖化合物对 RPE 细胞增殖影响。

**结果:**高糖导致 RPE 细胞异常增殖,多糖化合物组 RPE 的细胞异常增殖明显得到保护,与高糖组比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**结论:**从海藻中萃取的新型多糖化合物可以明显保护高糖所导致的 RPE 细胞的异常增殖。

**关键词:**高糖;多糖化合物;视网膜色素上皮细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.03.010

谢佩玉,松仓诚,藤井绩,等.新型海藻多糖化合物保护高糖诱导的 RPE 细胞异常增殖.国际眼科杂志 2011;11(3):409-410

## 0 引言

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞在维持视网膜正常的代谢和功能中起着重要的作用<sup>[1,2]</sup>。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)时所发生的视觉异常和丧失,与高糖所导致的 RPE 细胞的过度氧化损伤及数量减少密切相关<sup>[3]</sup>。近年来,人们对海洋生物学制剂的研究日益加深<sup>[4]</sup>,将海藻中萃取的化合物作为防治糖尿病(diabetes mellitus, DM)并发症药物方面的研究也在广泛地进行。本实验中,我们应用一种从海藻中萃取的新型多糖化合物,探讨其对高糖诱导的 RPE 细胞异常增殖的保护作用,为 DR 的防治以及海洋生物制药的开发提供了实验基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 将有色兔麻醉处死,摘取眼球, D-Hank's 液冲洗数遍,4℃冰箱内庆大霉素盐水浸泡 30min,显微镜下除去眼前节及视网膜,应用酶消化法,在眼杯中加入 250g/L 胰蛋白酶,37℃水浴消化 30min,用 100mL/L 胎牛血清(FBS)(BioTech 公司)的 DMEM/F12 培养液终止消化,将

眼杯内细胞反复吹打下制成细胞悬液。细胞培养应用含有100mL/L FBS的DMEM/F12培养液,每100mL培养液中含有88mL DMEM/F12培养液,10mL FBS和2mL青霉素( $10^7$ U/L)-链霉素(10g/L)(Gibco公司)。应用ABC法进行细胞鉴定。细胞培养在37°C 50mL/L CO<sub>2</sub>孵箱内,每2~3d换一次培养液,每7~8d传一次代,传代时应用2.5g/L胰蛋白酶。海藻多糖化合物是由日本国芦北发育性残疾人治疗机构、芦北药园生产并为本实验无偿提供的。该多糖化合物由不同的单糖基通过糖苷键(C1,3-键和C1,4-键)相连而成,其制作过程简单概括:将海藻通过应用氯仿、乙酸乙酯和n-丁酰乙醇提取,在硅胶和LH-20葡聚糖凝胶层析仪上分离,再经过大孔吸收树脂提纯以及硫酸的磺化作用制成,其分子量是11680。MTT试剂盒购买自Amersco公司(美国)。

**1.2 方法** 将体外培养的RPE细胞分为3组:空白组、高糖组和多糖化合物组。空白组为正常RPE细胞培养液,高糖组为含30mmol/L葡萄糖的培养液,多糖化合物组为含30mmol/L葡萄糖和200mg/L多糖化合物的培养液。应用MTT法测量36h内不同时间点(6,12,24和36h)各组内RPE细胞的增殖情况,根据培养基中生长细胞的吸光度(A)数值进行测量计算。

统计学分析:所有数据均采用SPSS 13.0统计学软件进行处理,统计分析方法应用Student's-t检验,分析数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。当 $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

## 2 结果

应用MTT法测量6,12,24和36h高糖对RPE细胞增殖的结果显示:应用30mmol/L高浓度葡萄糖作用后,RPE细胞呈现明显的异常增殖,与空白组比较,差异具有明显统计学意义( $P < 0.01$ );在30mmol/L高糖和200mg/L多糖化合物作用后,明显阻止RPE细胞的异常增殖,与高糖组比较,差异具有明显统计学意义( $P < 0.01$ ,表1)。

## 3 讨论

DR是DM最为常见的并发症<sup>[5]</sup>,DR的视觉丧失与RPE细胞的损伤密切相关<sup>[3]</sup>。RPE细胞是位于神经视网膜与脉络膜之间的具有分泌功能的上皮细胞,其生理功能主要包括:物质转运、视黄醛的转运储存、遮光、清除自由基、合成多种细胞因子、构成血-视网膜屏障、将营养和离子在脉络膜和视网膜之间相互转运、固定以及重吸收和消化由视锥和视杆细胞产生的光感受器外节段、处理入射光线产生的热能等。正常数量的RPE细胞在维持视网膜的生理代谢及病理状况下抵御氧化损伤方面起着重要的作用<sup>[6,7]</sup>,高糖是造成RPE细胞的氧化损伤以及诱发RPE细胞异常增殖的重要原因<sup>[8]</sup>。因此,维持RPE细胞的正常数量和功能显得尤为重要。

近年来,人们对海洋有机体内生物活性成分的兴趣日益增加,多种海洋有机物中获得的原料都在被研究,关于用海洋有机物原料作为防治DM并发症药物的研究也正在进行着<sup>[9]</sup>。以往对海藻的研究表明<sup>[10]</sup>,海藻多糖作为海藻细胞间和细胞内所含有的高分子碳水化合物,可以调节细胞的生长和衰老、抵抗光辐射、清除超氧化阴离子、促进机体对谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的生物合成,抑制氧自由基对不饱和脂肪酸的氧化作用<sup>[11]</sup>。本实验中所研究的新型多糖化合物就是具备上述生物活性的海藻多糖成分中具有代表性的一种。

Ca<sup>2+</sup>是细胞增殖活动中重要的第二信使和启动因子,其浓度的变化对细胞的生长和有丝分裂具有重要的调控

表1 多糖化合物对高糖条件下RPE细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, A$ )

分组	6h	12h	24h	36h
空白组	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.46 ± 0.01
高糖组	0.22 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.61 ± 0.02
多糖化合物组	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.48 ± 0.01

作用<sup>[12]</sup>。高浓度葡萄糖可以通过信号传递方式作用于RPE细胞表面,增加跨膜Ca<sup>2+</sup>的内流<sup>[13]</sup>,同时引起细胞磷脂酶C的活化,进而引起细胞内磷脂酰肌醇的周转,使磷脂酰肌醇水解生成二酰基甘油(DAG)和三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>),IP<sub>3</sub>又可以动员细胞内钙库中的Ca<sup>2+</sup>释放到胞浆<sup>[14]</sup>,从而破坏了RPE细胞中Ca<sup>2+</sup>的稳态,致使RPE细胞异常增殖。也有研究表明,RPE细胞的增殖与ERK以及p38MAPK密切相关<sup>[15]</sup>。我们猜测,从海藻中萃取的新型多糖化合物可能影响到上述某一个或多个途径,阻止高糖对RPE细胞Ca<sup>2+</sup>稳态的破坏,从而保护高糖所导致的RPE细胞的异常增殖,但具体的作用机制尚需应用Western blot等实验技术进行更深一步的研究。

本实验研究从细胞水平上成功地证明了从海藻中萃取的新型多糖化合物可以保护高糖诱导的RPE细胞的异常增殖,为DR的防治以及海洋生物制药的开发开辟了一个新的领域。

## 参考文献

- 1 Udono T, Takahashi K, Nakayama M, et al. Induction of adrenomedullin by hypoxia in cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(5):1080-1086
- 2 何守志,侯豹可,唐维强,等.缺氧对人视网膜色素上皮细胞蛋白质表达的影响. *中华眼科杂志* 2008;44(6):534-539
- 3 Beatty S, Koh H, Phil M, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000;45(2):115-134
- 4 Onofrejevová L, Vasicková J, Klejdus B, et al. Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J Pharm Biomed Anal* 2010;51(2):464-470
- 5 张晓梅,李钟睿,刘玲华,等.增生性糖尿病视网膜病变患者血清及玻璃体白细胞介素-2受体水平. *中华眼底病杂志* 2004;20(6):377-378
- 6 Vinoso SA, Campochiaro PA, Conway BP. Ultrastructural and electron-immunocytochemical characterization of cells in epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(1):14-28
- 7 谢佩玉,张晓梅,松仓诚,等.高糖条件下糖康乐对RPE细胞GSH表达的影响. *眼科研究* 2009;27(2):141-143
- 8 帅捷,洪瑾,袁志兰.金雀异黄素对高糖诱导的人RPE细胞损伤的保护作用. *眼科新进展* 2007;27(12):888-891
- 9 Zhang D, Fujii I, Lin C, et al. The stimulatory activities of polysaccharide compounds derived from algae extracts on insulin secretion *in vitro*. *Biol Pharm Bull* 2008;31(5):921-924
- 10 谢佩玉,张晓梅,松仓诚,等.高糖条件下糖康乐对兔视网膜色素上皮细胞超氧化物歧化酶表达的影响. *国际眼科杂志* 2007;7(6):1584-1586
- 11 Kim IT, Park HJ, Nam JH, et al. *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of the roots of *Morinda officinalis*. *J Pharm Pharmacol* 2005;57(15):607-615
- 12 庞东渤,洪晶.维拉帕米诱导人视网膜色素上皮细胞凋亡及细胞内钙变化. *国际眼科杂志* 2006;6(2):324-327
- 13 Höflich A, Lahm H, Blum W, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. *FEBS Lett* 1998;434(3):329-334
- 14 孙兆义.钙离子拮抗剂对视网膜色素上皮细胞影响的实验研究. *牡丹江医学院学报* 2006;27(2):21-23
- 15 Yuan Z, Feng W, Hong J, et al. p38MAPK and ERK promote nitric oxide production in cultured human retinal pigmented epithelial cells induced by high concentration glucose. *Nitric Oxide* 2009;20(1):9-15