

# N-乙酰半胱氨酸和曲尼司特对糖尿病视网膜病变的作用

张 博, 庞东渤, 孟庆芸

作者单位:(121000)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介:张博,男,在读硕士研究生,研究方向:糖尿病视网膜病变。

通讯作者:庞东渤,男,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:眼底病临床与基础. Pang2000@163.com

收稿日期:2011-12-09 修回日期:2012-02-06

## Therapeutic action and mechanism of N-acetylcysteine and Tranilast on diabetic retinopathy

Bo Zhang, Dong-Bo Pang, Qing-Yun Meng

Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong-Bo Pang, Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. Pang2000@163.com

Received:2011-12-09 Accepted:2012-02-06

### Abstract

• AIM: To investigate the change of the endothelial and perivascular cell in an model of diabetic retinopathy (DR), correlate retinal and plasma results and to evaluate the influence of treatment by N-acetylcysteine (NAC) and Tranilast(TNL).

• METHODS: Five groups were studied: control (Group NOR), streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (Group DM), STZ rats following 12 weeks of NAC (Group NAC), TNL(Group TNL) and both NAC and TNL(Group COM). Plasma levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were obtained. Primary antibodies against tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) were used. The retinal vasculature isolated by using the trypsin digest method was observed.

• RESULTS: Plasma levels of SOD and GSH were lower in Group DM and TNL than the others. Expression of TNF- $\alpha$  was robust in Group DM, mild in Group COM, TNL and NAC, weak in Group NOR. Intensity of NF- $\kappa$ B was higher in Group DM, TNL and NAC compared with Group NOR and COM. The vascular structures of Group COM were much improved than other STZ models.

• CONCLUSION: Pericyte loss and endothelial cell hyperplasia occur early in DR. These changes are associated with oxidative stress and inflammation and could be minimized by treatment with NAC and TNL. The results suggest that the therapy worked through reducing ROS and inhibiting degranulation of mast cell. This

treatment could neutralize the events in diabetic retinopathy in STZ model.

• KEYWORDS: N-acetylcysteine;tranilast;diabetic retinopathy; endothelial cell; pericyte

Zhang B, Pang DB, Meng QY. Therapeutic action and mechanism of N-acetylcysteine and Tranilast on diabetic retinopathy. *Guji Yanke Zazhi( Int Eye Sci)* 2012;12(3):407-409

### 摘要

目的:观察 N-乙酰半胱氨酸与曲尼司特联合使用对糖尿病大鼠视网膜相关检测指标的影响,评估其对血管内皮细胞和周细胞的保护作用。

方法:用链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型 60 只,分为曲尼司特(TNL)组、N-乙酰半胱氨酸(NAC)组、联合用药(COM)组、模型(DM)组和空白对照(NOR)组。常规饲养 12wk 测定大鼠血清 GSH-Px 与 SOD,免疫组织化学检测视网膜 TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 的表达,观察视网膜血管消化铺片形态,并行血管内皮细胞与周细胞计数。

结果:与正常组相比,糖尿病模型各组 GSH-Px 与 SOD 均不同程度降低,其中 DM 与 TNL 组较 NAC 组和 COM 组降低显著。TNF- $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 在 DM 组表达均为最高,NOR 最低,其余三组均不同程度降低,以 COM 组降低为著( $P < 0.01$ )。血管铺片示 DM 组血管形态以及周细胞与内皮细胞的损害明显,用药后有改善,以 COM 组为著。

结论:NAC 与 TNL 联合使用对 DR 血管内皮细胞与周细胞的损害有明显治疗作用,其作用机制可能与拮抗自由基、炎症反应以及抑制肥大细胞释放细胞因子有关。

关键词:N-乙酰半胱氨酸;曲尼司特;糖尿病视网膜病变;内皮细胞;周细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.03.09

张博,庞东渤,孟庆芸. N-乙酰半胱氨酸和曲尼司特对糖尿病视网膜病变的作用. 国际眼科杂志 2012;12(3):407-409

### 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(DM)最严重和最常见的并发症之一。其特征性改变是微血管病变、血管闭塞,导致视网膜缺血、新生血管生成,继而出血、机化,最终牵拉视网膜脱离,视力完全丧失。氧化应激是 DR 发病机制中非常重要的一环,多条发病通路与之相关<sup>[1]</sup>。高血糖及其诱导的氧化应激作用于转录因子 NF- $\kappa$ B,并通过其调控与炎症、细胞增殖、细胞分化等密切相关的多种基因的表达<sup>[2]</sup>。TNF- $\alpha$  在 DM 患者血清及视网膜局部高表达,损伤血-视网膜屏障,增强视网膜血管通透性,诱导血管源性生长因子生成,从而引发眼内新生血管。

抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)已被证实具有显著减轻 DM 大鼠血浆氧化应激及炎症反应的作用,但该研究同时也认为该药物对新生血管内皮细胞数降低没有明显作用<sup>[3]</sup>。曲尼司特(TNL)一般用于过敏性疾病的治疗,近年来随着研究的深入,人们发现它还具有抗纤维化、防治新生血管形成等作用<sup>[4]</sup>,已经用于 DM 肾病、肉芽肿性疾病、青光眼小梁网细胞增殖等的研究。TNL 可以在不影响正常细胞活性下抗成纤维细胞及平滑肌细胞等增殖,尚未见用于治疗 DR 的报道。本实验应用 NAC 联合 TNL,在去除活性氧的同时抑制细胞增殖,观察两种作用机制的药物对早期 DR 的治疗作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,鼠龄约 8wk,体质量 250~300g,裂隙灯眼底镜检查排除眼前后节病变,标准环境饲养,食水不限。动物与饲料均由辽宁医学院实验动物中心提供。主要试剂:N-乙酰半胱氨酸(NAC,武汉麦可欣科技有限公司),曲尼司特(TNL,江苏盐城麦迪科化学品制造有限公司),链脲佐菌素(STZ, Sigma),40mL/L 多聚甲醛溶液(辽宁医学院科学实验中心),兔抗鼠 NF- $\kappa$ B 与 TNF- $\alpha$  抗体,多聚赖氨酸溶液(北京博奥森生物技术有限公司),PAS 染液(南京建成生物工程研究所),谷胱甘肽过氧化物酶测试盒,总超氧化物酶测试盒。

**1.2 方法** 大鼠适应性喂养 1wk 后,随机抽取 48 只大鼠,尾静脉一次性注射枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液配制的 STZ 溶液 35mg/kg,正常组 12 只大鼠注射同剂量枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。72h 后取尾尖血测定血糖,将血糖 >16.7mmol/L,尿糖阳性的动物确定为造模成功,否则重新造模(本实验中,补充造模一次后所有 48 只动物均成功诱导 DM)。将 DM 大鼠随机分为 4 组,即 NAC, TNL, COM, DM 组,每组 12 只,每日分别以羧甲基纤维素钠(CMC)溶液配制的 NAC, TNL, NAC + TNL 和 CMC 溶液灌胃, NAC 与 TNL 剂量均为 400mg/(kg·d),对照组 12 只大鼠以等量生理盐水灌胃。常规喂养 12wk,定期监测血糖及体质量。

**1.2.1 SOD 和 GSH-Px 的测定** 各组喂养到期后,水合氯醛麻醉,心脏取血数毫升静置离心,吸取上清液保存, SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶法, GSH-Px 测定采用紫外比色法。

**1.2.2 HE 染色观察视网膜组织形态学变化** 各组大鼠使用生理盐水与 40mL/L 多聚甲醛(均预冷)各 50mL 行颈动脉灌流处死,眼球取出后剪破角膜,常规固定。左眼脱水、透明、包埋,5 $\mu$ m 连续切片,使用经多聚赖氨酸预处理的载玻片捞片,60 $^{\circ}$ C 烤片 2h 后,切片常规脱蜡至水,苏木素染色 10min,盐酸乙醇分化,伊红 2min,各步骤间以自来水冲洗,逐级脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

**1.2.3 免疫组织化学检测 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  表达** 左眼切片常规脱蜡至水,浸入 pH = 6.0 的沸腾的 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液,140 $^{\circ}$ C 高压修复抗原 2min,室温冷却;30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液处理 15min,以去除内源性过氧化物酶。加正常山羊血清(SP0023 A 液)封闭 30min,吸去血清,滴加一抗(NF- $\kappa$ B 或 TNF- $\alpha$ )过夜。加生物素标记的山羊抗兔 IgG (SP0023 B 液),37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(SP0023 C 液),37 $^{\circ}$ C 水浴 30min。各步骤

表 1 各组大鼠血糖及血清 SOD 与 GSH-Px 含量  $\bar{x} \pm s$

组别	血糖 (mmol/L)	SOD (NU/mL)	GSH-Px (mmol/L)
正常组	4.72 $\pm$ 1.04	148.70 $\pm$ 14.12	137.10 $\pm$ 12.12
DM 组	27.65 $\pm$ 4.24	122.43 $\pm$ 12.87 <sup>b</sup>	82.63 $\pm$ 6.10 <sup>b</sup>
TNL 组	22.10 $\pm$ 3.19	124.53 $\pm$ 15.12 <sup>b</sup>	87.36 $\pm$ 6.95 <sup>b</sup>
NAC 组	20.13 $\pm$ 2.26	139.19 $\pm$ 13.32 <sup>a</sup>	127.70 $\pm$ 9.79 <sup>d</sup>
COM 组	19.08 $\pm$ 2.28	140.12 $\pm$ 14.75 <sup>d</sup>	130.65 $\pm$ 9.85 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vsDM 组;<sup>b</sup>P < 0.01 vs正常组;<sup>d</sup>P < 0.01 vsDM 组。

间均以 PBS 冲洗 3 次(A 液处理后除外)。DAB 显色,苏木素复染,逐级脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。使用 Image J 图像处理和分析软件系统观察免疫组织化学结果,对每张切片随机 4 个高倍视野进行分析,取平均值。

**1.2.4 视网膜血管铺片计数内皮细胞与周细胞** 取出右眼,固定 48h 后,沿角巩缘剪开,去除角膜与晶状体,小心分离视网膜,去离子水冲洗,平均剪成 4 份,置于 Tris-HCl 缓冲液配制的 30g/L 胰酶溶液,37 $^{\circ}$ C 振荡消化 4h,轻轻敲去多余视网膜组织,200 倍显微镜观察至仅残留一层透明血管网,多聚赖氨酸涂片捞片,自然晾干后,行 PAS 染色。过碘酸处理铺片 20min, Schiff 溶液 10min,苏木素 5min,分化液 20s,各步骤后均以自来水冲洗 5min。逐级脱水,中性树脂封片。对每张血管消化铺片上随机 5 个高倍视野取平均值进行内皮细胞与周细胞计数。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料使用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异具有统计学意义, P < 0.01 为差异具有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠 SOD 和 GSH-Px 的含量** DM 组大鼠血清 SOD 与 GSH-Px 含量较正常组低,DM 与 TNL 组降低最明显(P < 0.01)。NAC 与 COM 两组 SOD 和 GSH-Px 含量仍较正常组低,但差异不显著(P > 0.05);NAC 组与 COM 组 SOD 和 GSH-Px 的含量均高于 DM 组(P < 0.05)。而 TNL 与 DM 组、NAC 与 COM 组间无差异(表 1)。

**2.2 视网膜组织形态学变化** 切片见正常组大鼠视网膜组织结构完整,各分层清晰,细胞形态完好;DM 组视网膜组织结构较完整,视网膜分层稍紊乱,细胞形态可见异常,节细胞层与内核层可见细胞水肿及少量坏死;各治疗组视网膜组织结构基本完整,视网膜分层尚可,可见少量细胞水肿及排列紊乱。

**2.3 各组大鼠 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  表达** 各模型组大鼠视网膜 NF- $\kappa$ B 与 TNF- $\alpha$  表达均较正常组明显升高(P < 0.01)。与 DM 组相比, TNL, NAC 与 COM 组 TNF- $\alpha$  表达降低明显(P < 0.01),各组 NF- $\kappa$ B 含量与 DM 组比较, NAC 与 COM 组降低显著(P < 0.01,表 2)。正常大鼠视网膜组织中有微量 NF- $\kappa$ B 表达,限于视网膜 GCL 层胞质。DM 组见神经节细胞层(GCL)、内核层(INL)和外核层(ONL)细胞的胞浆均有表达,主要表达在胞核,且表达较正常组显著升高(P < 0.01)。各组的 GCL 和 INL 及血管内皮细胞均有不同程度 TNF- $\alpha$  阳性表达,正常组与 DM 组表达差异明显。NF- $\kappa$ B 与 TNF- $\alpha$  的表达对两种药物的治疗均敏感。

**2.4 内皮细胞和周细胞计数** 与正常组相比, DM 组与 NAC 组内皮细胞明显增多(P < 0.01),而周细胞减少(P < 0.01), TNL 组内皮细胞与正常组仍存在一定差异(P <

表2 各组大鼠 TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 表达及内皮细胞和周细胞计数  $\bar{x} \pm s$

组别	TNF- $\alpha$	NF- $\kappa$ B	内皮细胞(个)	周细胞计数(个)
正常组	9.33 $\pm$ 2.23	3.92 $\pm$ 1.68	22.33 $\pm$ 2.42	7.25 $\pm$ 0.87
DM 组	26.44 $\pm$ 2.30 <sup>b</sup>	25.67 $\pm$ 1.94 <sup>b</sup>	26.89 $\pm$ 2.57 <sup>b</sup>	4.77 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>
TNL 组	18.88 $\pm$ 2.42 <sup>a,d</sup>	23.38 $\pm$ 2.13 <sup>a,c</sup>	24.00 $\pm$ 2.56 <sup>c</sup>	6.12 $\pm$ 1.46 <sup>a,c</sup>
NAC 组	18.40 $\pm$ 2.27 <sup>b,d</sup>	7.60 $\pm$ 1.65 <sup>b,d</sup>	25.50 $\pm$ 2.64 <sup>b</sup>	5.80 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup>
COM 组	14.69 $\pm$ 2.10 <sup>b,d</sup>	10.23 $\pm$ 2.01 <sup>b,d</sup>	23.61 $\pm$ 2.22 <sup>d</sup>	6.61 $\pm$ 1.12 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs DM 组。

0.05), 其余均无统计意义。与 DM 组相比, 应用 TNL 两组内皮细胞与周细胞异常减轻, NAC 组无明显差别 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

DM 组大鼠视网膜血管排列紊乱, 管腔直径不均, 可见闭塞血管, 内皮细胞明显增多而周细胞减少, 这些属于典型的 DR 特点。TNL 与 NAC 组管腔直径较 DM 组无明显改善, TNL 组周细胞和内皮细胞的改变较 NAC 与 DM 组略减轻。COM 组与 DM 组相比血管形态改善, 内皮细胞与周细胞的改变明显降低, 但与正常组仍有一定差异。

### 3 讨论

DR 发病机制至今仍未完全阐明。长期高血糖诱发多种代谢与生化异常, 如血流改变、氧化应激增强、晚期糖基化终产物积聚等。这些因素之间错综复杂的相互作用可以损害血管, 从而引起一系列视网膜功能结构改变, 最终导致失明。DR 目前比较经典的 4 条通路为: 多元醇通路、晚期糖基化终产物堆积、氨基己糖途径和 PKC 途径。Lee 认为这 4 条通路均与高血糖诱导的超氧化物形成有关。近年来, 抗氧化剂如维生素 C 和 E<sup>[5]</sup>、姜黄素<sup>[6]</sup>、 $\alpha$ -硫辛酸<sup>[7]</sup>、曲克芦丁<sup>[8]</sup>等用于 DR 的病例常见报道, 这些药物可以通过清除自由基从而降低氧化应激损伤, 并控制部分炎症反应。炎症反应是 DM 视网膜损害的发病机制之一, 因而 DR 又称作视网膜膜炎。

TNF- $\alpha$  被认为是 PDR 中最强的致病因子, 与新生血管关系密切。NF- $\kappa$ B 可活化多个有害基因, 与 DR、高血压等多种疾病中器官损害密切相关。本实验结果提示, NAC 抵消部分氧化应激, 可间接作用于 NF- $\kappa$ B 与 TNF- $\alpha$  等细胞因子表达, 但 NF- $\kappa$ B 与 TNF- $\alpha$  并未完全恢复到正常水平。

Rizzo 等<sup>[9]</sup>证实肥大细胞参与了机体新生血管反应, 肥大细胞脱颗粒被认为与血管源性生长因子及肝素的释放有关<sup>[10]</sup>, TNL 对肥大细胞脱颗粒时的能量消耗和钙内流有抑制作用<sup>[11]</sup>。能量消耗和钙内流在趋化与多种细胞增殖中也起关键作用, 所以 TNL 可以通过对血管内皮细胞这些进程的抑制作用拮抗新生血管生成。此外, 抗增殖药物作用于细胞周期 S 或 M 期, 可导致细胞死亡, TNL 将细胞周期停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期<sup>[12]</sup>, 具有选择性抑制作用, 这是 TNL 毒副作用较小的原因之一。

目前的实验证实, TNL 没有明显改善氧化应激的作用, 但对 TNF- $\alpha$  的表达异常有一定改善, 对血管内皮细胞

与周细胞损害也有治疗效果。佐以抗氧化药物, 同时降低多种细胞源性因子的表达, 可使内皮细胞增生与周细胞丢失得以更好控制。日后需在增殖期 DR 中观察 TNL 的作用, 进一步研究明确其对 DR 新生血管形成的影响与具体机制。

### 参考文献

- 1 Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes* 2005;54(6):1615-1625
- 2 Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, et al. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005;111(11):1448-1454
- 3 Tsai GY, Cui JZ, Syed H, et al. Effect of N-acetylcysteine on the early expression of inflammatory markers in the retina and plasma of diabetic rats. *Clin Experiment Ophthalmol* 2009;37(2):223-231
- 4 Isaji M, Miyata H, Ajisawa Y, et al. Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1997;122(6):1061-1066
- 5 Yulek F, Or M, Ozogul C, et al. Effects of stobadine and vitamin E in diabetes-induced retinal abnormalities: involvement of oxidative stress. *Arch Med Res* 2007;38(5):503-511
- 6 Kowluru RA, Kanwar M. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutr Metab (Lond)* 2007;4:8
- 7 Lin J, Bierhaus A, Bugert P, et al. Effect of R-(+)-alpha-lipoic acid on experimental diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2006;49(5):1089-1096
- 8 Chung HK, Choi SM, Ahn BO, et al. Efficacy of troxerutin on streptozotocin-induced rat model in the early stage of diabetic retinopathy. *Arzneimittelforschung* 2005;55(10):573-580
- 9 Rizzo V, DeFouw DO. Mast cell activation accelerates the normal rate of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Microvasc Res* 1996;52(3):245-257
- 10 Qu Z, Liebler JM, Powers MR, et al. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol* 1995;147(3):564-573
- 11 Koda A, Kurashina Y, Nakazawa M. The inhibition mechanism of histamine release by N-(3,4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;77(1-2):244-245
- 12 Isaji M, Aruga N, Naito J, et al. Inhibition by tranilast of collagen accumulation in hypersensitive granulomatous inflammation *in vivo* and of morphological changes and functions of fibroblasts *in vitro*. *Life Sci* 1994;55(15):PL287-292