

丹酚酸 B 对糖尿病大鼠角膜的保护作用及其机制

吴升辉,王燕凤,张晓琴,黄真真,林毅,黄焱,郑卫东

基金项目:福建省自然科学基金(No. 2016J01155);福建医科大学省级大学生创新实验项目(No. 20141039207)

作者单位:(350000)中国福建省福州市,福建医科大学医学技术与工程学院视光学系

作者简介:吴升辉,本科,研究方向:眼科学基础。

通讯作者:黄焱,博士,教授,研究方向:眼科学基础。13960888823@139.com

收稿日期:2016-03-07 修回日期:2016-08-08

Protective effects and its mechanism of Salvianolic acid B on the cornea of diabetic rats

Sheng-Hui Wu, Yan-Feng Wang, Xiao-Qin Zhang, Zhen-Zhen Huang, Yi Lin, Yan Huang, Wei-Dong Zheng

Foundation items: Provincial Natural Science Foundation of Fujian (No. 2016J01155); College Students' Innovative Experiment of Fujian Medical University (No. 20141039207)

Department of Optometry, Medical Technology and Engineering Institute, Fujian Medical University, Fuzhou 350000, Fujian Province, China

Correspondence to: Yan Huang. Department of Optometry, Medical Technology and Engineering Institute, Fujian Medical University, Fuzhou 350000, Fujian Province, China. 13960888823@139.com

Received:2016-03-07 Accepted:2016-08-08

Abstract

• AIM: To explore the protective effects of Salvianolic acid B resistance to oxidative stress on cornea in diabetic rats.

• METHODS: Twenty-five Sprague-Dawley male rats were taken as experimental subjects. Random 5 of them were used as control group. The remaining 20 were induced to be diabetic mellitus by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) and divided into 4 groups randomly: diabetes control group, 0.01% Salvianolic acid B treated group, 0.05% Salvianolic acid B treated group and 0.1% Salvianolic acid B treated group. In the Salvianolic acid B treated groups, the corresponding concentration of Salvianolic acid B eye drops were used 3 times a day until the animal was sacrificed, and then detected rats blood glucose and body weight, observed sensation and transparency of the cornea once a week. After the building completion, all rats in each group were sacrificed in 12nd wk, and then observed the corneal tissue structure change, and in rat serum and tissue of malondialdehyde (MDA) content and activity of superoxide dismutase (SOD).

• RESULTS: The blood glucose of all rats was in high

level (>16.7mmol/L), early rise and later fall in weight. In the diabetic control group, the corneal sensation and transparency of the cornea were decreased. The content of MDA in the corneal tissue was significantly increased. The activity of SOD in the corneal tissue was significantly decreased ($P<0.05$). Through the course of disease, the above change was obvious day by day. Compared with the diabetic control group, the sensation and transparency of the cornea were improved significantly. The content of MDA in the corneal tissue was significantly decreased. The activity of SOD in the corneal tissue was significantly increased ($P<0.01$).

• CONCLUSION: Salvianolic acid B can reduce the corneal lesions of diabetic rats, the mechanism may be related to Salvianolic acid B, remove superoxide anion, protect cells from damage of resisting oxidative stress.

• KEYWORDS: Salvianolic acid B; diabetes mellitus; cornea; oxidative stress; superoxide dismutase; malondialdehyde

Citation: Wu SH, Wang YF, Zhang XQ, *et al.* Protective effects and mechanism of Salvianolic acid B on the cornea of diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(9):1629-1631

摘要

目的:探究丹酚酸 B 抗氧化应激对糖尿病大鼠角膜的保护作用。

方法:健康雄性 SD 大鼠 25 只,随机选取 5 只作为正常对照组;其余 20 只采用一次性腹腔注射链脲佐菌素 (STZ, 60mg/kg) 诱导糖尿病大鼠模型,建模成功(血糖 > 16.7mmol/L)后应用随机数字表法分为糖尿病对照组、0.01% 丹酚酸 B 凝胶治疗组、0.05% 丹酚酸 B 凝胶治疗组、0.1% 丹酚酸 B 凝胶治疗组,丹酚酸 B 治疗组和糖尿病对照组每天分别给予自制相应浓度的丹酚酸 B 凝胶及空白凝胶点眼,每次 1 滴,每日 3 次;检测大鼠的血糖和体质量,观察角膜知觉和透明度,每周 1 次;造模成功后的第 12wk 取材,观察角膜组织结构改变,以及大鼠眼组织中丙二醛 (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性情况。

结果:所有大鼠血糖处在高水平 (>16.7mmol/L),体质量早期上升后期有明显下降。在糖尿病对照组,角膜的知觉和透明度降低,各丹酚酸 B 凝胶治疗组与糖尿病对照组相比较,角膜知觉明显改善,各丹酚酸 B 治疗组角膜保持透明度与正常组无明显差异,角膜组织中的 MDA 含量明显减少,角膜组织中 SOD 的活性明显增加 ($P<0.05$)。

结论:丹酚酸 B 可以减缓糖尿病大鼠角膜病变,其机制可能与丹酚酸 B 能清除超氧阴离子的抗氧化应激作用有关。

关键词:丹酚酸 B;糖尿病;角膜;氧化应激;超氧化物歧化酶;丙二醛

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.9.07

引用:吴升辉,王燕凤,张晓琴,等.丹酚酸B对糖尿病大鼠角膜的保护作用及其机制.国际眼科杂志2016;16(9):1629-1631

0 引言

糖尿病是一种全身性疾病,糖尿病在眼部并发症的研究主要集中于糖尿病视网膜病变和糖尿病白内障方面,对糖尿病角膜病变的研究偏少^[1]。据报道,47%~64%糖尿病患者可能会出现原发性角膜病变,其临床特征主要表现为角膜敏感性下降、上皮愈合延迟、神经营养性角膜溃疡等症状。病理主要表现在上皮基底膜、上皮修复速度、角膜内皮和神经方面的异常,但其发病机制目前尚不很明确。丹酚酸B为丹参的主要有效成分,能清除氧自由基、抑制脂质过氧化反应,其作用强于维生素C、维生素E、甘露醇,是目前已知的抗氧化作用最强的天然产物之一。本实验通过丹酚酸B凝胶作用于糖尿病模型眼,旨在探究丹酚酸B对糖尿病大鼠角膜的保护作用,研究其在糖尿病角膜组织病变发病机制中抗氧化应激的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康无眼疾的6周龄雄性大鼠25只,体质量200~250g,福建医科大学动物实验中心提供。数码裂隙灯显微镜,721光栅分光光度计(福建医科大学实验室提供)。血糖仪(美国罗氏公司);STZ(链脲佐菌素,美国Sigma公司);丹酚酸B(南京泽朗公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京鼎国昌盛公司);丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 所有大鼠眼部裂隙灯和检眼镜检查屈光间质清晰,眼底无病变。适应性喂养7d后,随机选取5只大鼠为正常对照组,剩余20只大鼠用于构建糖尿病模型,造模成功后随机分为4组:糖尿病对照组(DM1)、0.01%丹酚酸B治疗组(DM2)、0.05%丹酚酸B治疗组(DM3)、0.1%丹酚酸B治疗组(DM4),每组各5只。丹酚酸B治疗组和糖尿病对照组每天分别给予自制相应浓度的丹酚酸B凝胶及空白凝胶点眼,每日3次,每次1滴,每天同一时间给药。

1.2.2 丹酚酸B眼用凝胶的配制^[2] 眼用凝胶可促进药物的吸收,延长药物作用时间。配置柠檬酸钠缓冲液使凝胶pH值与泪膜相似,取丹酚酸B和透明质酸钠粉末分别配置:空白凝胶、0.01%丹酚酸B凝胶、0.05%丹酚酸B凝胶、0.1%丹酚酸B凝胶各10mL,每3d配一次防止缓冲系统变质,遮光、分装、密闭、4℃冰箱中保存备用。

1.2.3 SD大鼠糖尿病模型的制作^[3] SD大鼠普通饲养2wk后,再将大鼠禁食,自由饮水24h后,以0.1mmol/L, pH=4.4的枸橼酸缓冲液配制成20g/L STZ(美国Sigma公司)溶液,以55mg/kg的剂量腹腔注射链脲佐菌素(STZ)。72h后采尾静脉血测血糖,若血糖>16.7mmol/L,多饮、多食、多尿为成功模型,可纳入实验。

1.2.4 各组大鼠血糖及体质量测定、角膜功能学检查 利用罗氏血糖仪检测大鼠的血糖,普通电子秤测量体质量,肉眼观察角膜透明度。检查角膜知觉^[4]:将一块消毒棉球搓成尖形条,用其尖端从眼的侧面或下方轻触角膜表面(所有大鼠均刺激相同部位),如立即发生反射性瞬目运动,则为知觉正常;如反射迟钝,即为知觉减退;如无任何反应,则为知觉反应消失。以上各项指标,每周测量1次。用裂隙灯检查(每4wk)对照组和实验组大鼠角膜的病变情况。

1.2.5 各组大鼠角膜组织形态学检查^[5] 造模成功后的第12wk利用脊髓脱臼法处死所有大鼠,随机取一只眼球将其石蜡包埋、切片。将切片组织行苏木精-伊红染色,普通显微镜观察。

1.2.6 各组大鼠角膜MDA和SOD活性检测^[5] 将另一只眼球角膜用预冷的生理盐水洗去角膜表面的血迹,滤纸拭干,用电子分析天平称重后,迅速用眼科小剪将角膜组织剪碎,放入1.5mL的离心管内,加入19倍体积的匀浆介质(0.01mol/L Tris,0.001mol/L EDTA-Na₂,0.01mol/L蔗糖,8g/L NaCl,pH7.4),离心管放在冰盒内,用玻璃匀浆器转动研磨数十次制备5%角膜组织匀浆,以3000r/min($r=15\text{cm}$)离心10min,取上清液,分别采用MDA和SOD检测试剂盒测定MDA含量及SOD活性,用比色法测定各指标含量,蛋白质含量测定参照考马斯亮蓝法。

统计学分析:采用SPSS统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖及体质量结果 注射STZ前大鼠血糖水平均正常,糖尿病对照组和丹酚酸B各治疗组在注射STZ后1wk至处死前血糖明显升高(均>16.7mmol/L),并保持相对稳定;各丹酚酸B治疗组与糖尿病对照组相比,血糖无统计学差异($P<0.05$)。正常对照组大鼠体质量随饲养时间增长而增长。与正常对照组相比,糖尿病大鼠体质量增长速度较缓慢,在12wk时体质量明显低于正常组($P<0.05$),各丹酚酸B治疗组与糖尿病对照组相比,体质量无统计学差异($P>0.05$)。糖尿病和各治疗组大鼠体质量在1~7wk时也呈增长趋势,在7wk时达最高峰($P<0.05$),第9wk时体质量开始减低($P<0.05$),在12wk时达最低($P<0.05$,表1)。

2.2 各组大鼠角膜知觉和透明度检查 糖尿病对照组大鼠自造模6wk起出现角膜知觉的减退,第10wk到12wk时角膜知觉减退明显;丹酚酸B治疗组第6wk时轻微的知觉减退,第12wk时角膜知觉减退情况较糖尿病对照组改善明显,0.05%丹酚酸B组角膜知觉更敏感。裂隙灯检查正常大鼠角膜始终保持透明,糖尿病对照组大鼠角膜早期透明,7wk后开始出现透明度下降,12wk轻度混浊,各丹酚酸B治疗组角膜保持透明度与正常无明显差异。

2.3 各组大鼠角膜组织形态学检查 正常对照组大鼠角膜(图1A)上皮细胞层、基质层和内皮细胞等各层结构层次清楚,细胞排列整齐,未见新生血管等异常,丹酚酸B治疗各组与正常对照组相比无显著差异,糖尿病对照组(图1B)大鼠角膜上皮欠光滑,细胞排列紧密,基质层皱褶增加,结构不均匀,与内皮连接不整齐,后弹力层有少部分破坏。

2.4 糖尿病大鼠角膜MDA含量和SOD活性 糖尿病对照组角膜组织中MDA含量较正常对照组增高($P<0.05$);丹酚酸B治疗组MDA含量较正常对照组仍有增高,但较糖尿病对照组降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);糖尿病对照组角膜组织中SOD活性较正常对照组降低($P<0.05$);丹酚酸B治疗组SOD活性较正常对照组亦有降低,但较糖尿病对照组升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);随着病程的延长,糖尿病对照组与丹酚酸B治疗组SOD活性均逐渐降低($P<0.01$),但丹酚酸B治疗组较糖尿病对照组降低程度轻,0.05%丹酚酸B治疗组明显升高(表2)。

表1 各组大鼠体质量变化情况

时间	$(\bar{x} \pm s, g)$				
	正常对照组	糖尿病对照组	0.01% 丹酚酸 B	0.05% 丹酚酸 B	0.1% 丹酚酸 B
1wk	211.2±9.65	211.2±10.18	215.0±12.21	210.0±4.53	211.0±4.95
3wk	254.6±26.79	251.0±38.94	258.8±16.18	250.8±43.42	259.8±29.69
7wk	274.0±39.9	284.6±70.48	283.2±23.95	306.8±52.03	297.6±39.65
9wk	285.8±44.96	270.4±43.80	243.6±13.85	255.2±25.20	247.4±10.38
12wk	313.6±17.39	210.4±11.15	229.8±18.19	229.6±11.87	212.0±8.86

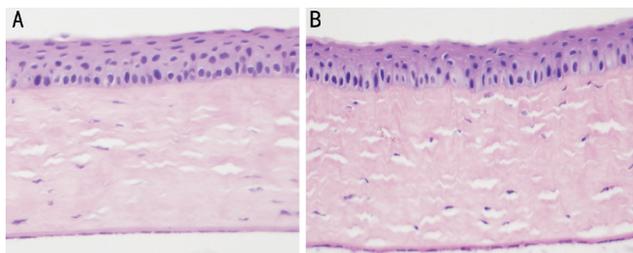


图1 糖尿病和0.05%丹酚酸B组造模后12wk大鼠角膜组织病理变化(HE×200) A:糖尿病组;B:0.05%丹酚酸B组。

表2 各组大鼠SOD活性和MDA含量 $(\bar{x} \pm s, nmol/mL)$

组别	眼数	SOD	MDA
正常对照组	5	46.7±4.3	0.151±0.02
糖尿病对照组	5	43.9±2.1 ^a	0.178±0.05 ^a
0.01% 丹酚酸 B 组	5	43.1±3.2 ^a	0.175±0.02 ^a
0.05% 丹酚酸 B 组	5	53.8±2.3 ^{a,b}	0.108±0.04 ^{a,b}
0.10% 丹酚酸 B 组	5	52.7±1.6 ^{a,b}	0.123±0.02 ^{a,b}

注:^a $P < 0.05$ vs 正常对照组;^b $P < 0.01$ vs 糖尿病对照组。

3 讨论

糖尿病的慢性并发症可累及多个器官和组织,是患者致残、致死的主要原因。其中糖尿病导致的角膜上皮病变日益受到关注,可引起许多患者视力下降甚至丧失,是一种潜在的致盲性病变。目前糖尿病角膜病变发生机制尚未明确,氧自由基生成及清除抑制蛋白质糖基化反应^[6]过程中氧自由基产生增加,引起的过氧化反应在糖尿病并发症形成上发挥重大作用。丹酚酸B主要经过肝脏代谢,在血清中的浓度极低^[7],故到达眼组织的量极低,局部用药相对于全身用药更有利,眼用凝胶能促进其局部吸收。丹酚酸B是丹参的有效水溶性成分,在丹参的功效中有重要地位,能清除氧自由基,抑制脂质过氧化反应,故用于眼部用药,经国内外文献检索丹酚酸B多用于肝、肾、心血管疾病等的治疗^[8],丹酚酸B能显著降低糖尿病大鼠血脂、血糖和糖化血红蛋白的水平,改善肾功能,提高胰岛素敏感指数,改善胰岛素耐受性及糖耐量^[2],也有学者进行丹酚酸B眼用凝胶改善大鼠糖尿病性白内障的研究,并取得良好的效果^[3],但未发现用于糖尿病性角膜病变治疗的报道。

我们的研究旨在探究丹酚酸B抗氧化应激对糖尿病大鼠角膜的保护作用,并使用眼用凝胶增强药物的吸收。研究结果显示:(1)HE染色在普通光学显微镜未见明显异常;(2)MDA和SOD检测显示丹酚酸B能够抑制角膜组织中氧化应激的作用。

实验通过角膜检查、角膜组织结构改变,发现其无明显的变化,根据角膜在糖尿病病变过程中进程缓慢,在普通光学显微镜活体观察和HE组织染色无法发现明显变化,其原因可能由于其变化细微,需要用更高级的检测技

术才能发现,有相关报道提示糖尿病大鼠早期12wk在扫描电镜下可观察到角膜上皮细胞表面不平整,形态不规则,细胞间出现裂缝,表面微绒毛疏松^[9]。因此,电镜检查 and 免疫组化检查亦是本实验可以改进的地方,普通光学显微镜未见病变,但在电子显微镜及其免疫组化等均有可能发现其病变。这与王春霞等^[10]报道的一致,他们的研究提出未施加干预因素的情况下观察角膜:糖尿病大鼠实验最初3mo各组的角膜损伤未见明显的进展。

虽然在病理形态学未检测到异常,但在生化方面有着明显的变化,并进一步证实大鼠糖尿病病变及其丹酚酸B的抗氧化应激作用。SOD能清除糖尿病蛋白质糖基化反应^[6]产生的氧自由基,糖尿病引起SOD的活性下降,其值随之下降。通过与对照组的比较,实验组的值明显上升。蛋白糖基化反应的产物(氧自由基)攻击生物膜中的不饱和脂肪酸,可引发脂质过氧化反应,形成脂质过氧化物,MDA为其中之一,糖尿病大鼠由于高血糖引起大量氧自由基堆积,产生大量MDA,其值亦相应上升;实验中观察到丹酚酸B组的值下降。比较各组数据结果显示,丹酚酸B凝胶组角膜知觉反射明显优于糖尿病对照组和正常对照组,丹酚酸B组SOD活性高于糖尿病对照组和正常对照组,丹酚酸B凝胶组MDA含量低于糖尿病对照组和正常对照组,0.05%丹酚酸B凝胶组疗效更明显,精确的最有效浓度可进一步探索。

本实验中,MDA和SOD的变化提示糖尿病角膜组织病变存在氧化应激反应,进一步阐明了发病机制。此外,丹酚酸B对糖尿病大鼠角膜有保护作用,对防治糖尿病性角膜病变具有临床指导意义。

参考文献

- 王晔,周庆军,谢立信.糖尿病角膜病变发病机制的研究进展.中华眼科杂志 2014;50(1):69-72
- 冷非,刘平,高维奇,等.丹酚酸B眼用凝胶对大鼠糖尿病性白内障作用的研究.眼科新进展 2009;29(9):674-676
- 周才杰,黄鸣清,陈长青,等.丹酚酸B改善2型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的实验研究.中国实验方剂学杂志 2012;18(13):233-237
- 赵凤琼,李立.依达拉奉对糖尿病角膜神经病变大鼠角膜神经的保护作用.中华实验眼科杂志 2012;30(2):101-105
- 孙光华.小鼠糖尿病性角膜病变模型的建立及上皮病变的初步研究.青岛大学硕士论文 2012
- 李鹏,马效工,安晓.糖尿病性角膜上皮病变机制研究现状.国际眼科杂志 2005;5(2):150-154
- 张文静,曹琦琛,曹珂,等.丹酚酸B的药理学研究进展.中国新药杂志 2011;20(7):608-612
- 尹音,王峰,徐向阳,等.丹酚酸B研究进展.中国药师 2007;10(10):1034-1037
- 陈剑,黄建艳,唐福星,等.糖尿病早期角膜组织的超微变化.中国病理生理杂志 2003;19(7):942-945
- 王春霞,赵宇,于紫燕,等.硫辛酸对大鼠糖尿病角膜病变的保护作用.解剖科学进展 2012;18(3):272-277