

# 生长激素释放多肽对高糖诱导视网膜色素上皮细胞的保护作用

侯丽丽, 陈婷, 刘礼婷, 张丽娟

作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 侯丽丽, 本科, 护师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 张丽娟, 本科, 副主任护师, 研究方向: 白内障。

qipeng242@163.com

收稿日期: 2018-02-18 修回日期: 2018-06-06

## Protective effect of Ghrelin against oxidative stress induced by high glucose in human retinal pigment epithelium cells

Li-Li Hou, Ting Chen, Li-Ting Liu, Li-Juan Zhang

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Li-Juan Zhang. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. qipeng242@163.com

Received: 2018-02-18 Accepted: 2018-06-06

### Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of Ghrelin on oxidative stress induced by high glucose in human retinal pigment epithelium (RPE) cells.

• **METHODS:** RPE cells were cultured and divided into the negative control group, high sugar group, Ghrelin low dose group ( $10^{-9}$  mol/L) and high dose group ( $10^{-6}$  mol/L). Cells survival rate were detected by CCK-8 colorimetry, cells oxidative damage were observed by oxygen sensitive fluorescence probe  $H_2$  DCFDA staining, changes of intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by  $H_2$  DCFDA staining, super oxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were detected by spectrophotometer colorimetry.

• **RESULTS:** CCK-8 results showed that RPE cells survival rate increased to  $54.79\% \pm 3.43\%$  and  $79.16\% \pm 3.29\%$  after treated with  $10^{-9}$  mol/L,  $10^{-6}$  mol/L Ghrelin, the difference was statistically significant compared with high glucose group ( $41.65\% \pm 3.42\%$ ) ( $P < 0.05$ ).  $H_2$  DCFDA fluorescent probe dying showed that Ghrelin reduced ROS generation in RPE cells and decreased oxidative damage cells. Spectrophotometer colorimetric method showed that according to the high sugar group, SOD activity increased and MDA content decreased in Ghrelin group.

• **CONCLUSION:** Ghrelin could inhibit high glucose -

induced oxidative damage in human RPE cells, which has protective effect on the process of the occurrence and development of diabetic retinopathy.

• **KEYWORDS:** Ghrelin; high glucose; human retinal pigment epithelium cells; oxidative stress

**Citation:** Hou LL, Chen T, Liu LT, et al. Protective effect of Ghrelin against oxidative stress induced by high glucose in human retinal pigment epithelium cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(7):1184-1187

### 摘要

**目的:** 探讨生长激素释放多肽 (Ghrelin) 对高糖环境下人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞氧化应激的影响。

**方法:** 将体外培养的 RPE 细胞分为阴性对照组、高糖组、Ghrelin 低浓度组、Ghrelin 高浓度组。通过 CCK-8 法检测细胞存活率, 氧敏感荧光探针  $H_2$  DCFDA 染色法观察细胞氧化损伤程度, 流式细胞技术检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的变化, 分光光度计比色法检测细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量。

**结果:** CCK-8 结果显示, 分别用  $10^{-9}$  mol/L、 $10^{-6}$  mol/L Ghrelin 预处理后, RPE 细胞存活率分别为  $54.79\% \pm 3.43\%$  和  $79.16\% \pm 3.29\%$ , 与高糖组 ( $41.65\% \pm 3.42\%$ ) 比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。  $H_2$  DCFDA 荧光探针染色结果显示, Ghrelin 预处理后 RPE 细胞内 ROS 生成量下降, 氧化损伤细胞减少。分光光度计比色法结果显示, 与高糖组相比, Ghrelin 组细胞 SOD 活力增加, MDA 含量下降。

**结论:** Ghrelin 可以抑制高糖诱导的人 RPE 细胞氧化损伤, 其在糖尿病视网膜病变的发生发展过程中可能具有一定的细胞保护作用。

**关键词:** 生长激素释放多肽; 高糖; 人视网膜色素上皮细胞; 氧化损伤

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.7.04

**引用:** 侯丽丽, 陈婷, 刘礼婷, 等. 生长激素释放多肽对高糖诱导视网膜色素上皮细胞的保护作用. 国际眼科杂志 2018;18(7):1184-1187

### 0 引言

糖尿病视网膜病变与视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的氧化损伤及代谢异常有关, 是引起

糖尿病患者视功能障碍的主要原因<sup>[1]</sup>。生长激素释放多肽(Ghrelin)最初是从大鼠胃组织中发现的,也存在于垂体、丘脑弓状核、胰腺、肾脏、肠道、胎盘及睾丸中<sup>[2]</sup>,其生理作用包括促进摄食与肥胖、调节代谢、刺激生长激素(growth hormone, GH)分泌、改善心血管功能、抑制细胞凋亡及氧化损伤、免疫抗炎等<sup>[3-4]</sup>,其表达异常与多种疾病相关。本研究通过体外实验初步研究 Ghrelin 对 RPE 细胞氧化损伤的影响及作用机制,为糖尿病视网膜疾病的预防和治疗提供新的实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人 RPE 细胞(ATCC 公司);Ghrelin(哈尔滨医科大学药理学教研室惠赠,纯度>99%);胎牛血清、DMEM 培养基干粉(美国 GIBCO 公司);CCK-8 试剂盒(德国 Roche 公司);H<sub>2</sub>DCFDA 试剂盒(碧云天公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);CO<sub>2</sub>培养箱(美国 Thermo Forma 公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);分光光度计(上海司乐仪器有限公司);荧光显微镜(宁波永新光学股份有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组** 使用含 10% 胎牛血清、100μg/mL 链霉素、100U/mL 青霉素的 DMEM 培养基于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养 RPE 细胞,每 2d 换液 1 次,待细胞生长至近 80% 融合时,换用无血清 DMEM 培养液后分 4 组:(1)阴性对照组:以正常培养液培养,葡萄糖浓度 5.5mmol/L;(2)高糖组:30mmol/L 葡萄糖溶液作用 12h;(3)Ghrelin 低浓度组:10<sup>-9</sup> mol/L Ghrelin 作用 24h 后,30mmol/L 葡萄糖溶液作用 12h;(4)Ghrelin 高浓度组:10<sup>-6</sup> mol/L Ghrelin 作用 24h 后,30mmol/L 葡萄糖溶液作用 12h。

**1.2.2 细胞存活率的检测** 细胞接种于 96 孔板,每孔 120μL,细胞密度 1×10<sup>4</sup> 个/mL,弃培养液,根据各组条件处理细胞后,PBS 缓冲液洗涤细胞,加入含 10μL CCK-8 溶液的无血清培养基 100μL,孵育 2h,酶标仪测定 450nm 处的光密度(OD)值,每组设 3 个复孔,重复 3 次实验,取平均值。细胞存活率=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

**1.2.3 细胞内 ROS 水平的检测** 利用氧敏感荧光探针 H<sub>2</sub>DCFDA 检测细胞内 ROS 水平。RPE 细胞接种于 96 孔板内,根据各组处理条件处理细胞后,加入 10μmol/L H<sub>2</sub>DCFDA 探针,37℃ 细胞培养箱内避光环境下继续孵育 20min,荧光显微镜下检测细胞内 ROS 变化并拍照,1h 内用流式细胞仪在避光环境下检测每组细胞的相对荧光强度,激发光为 488nm,发射光为 525nm。

**1.2.4 细胞内 SOD 活力和 MDA 含量的测定** 根据各组处理条件处理细胞后,用 1% 胰蛋白酶消化并收集细胞,1 200r/min 离心 10min, PBS 缓冲液洗涤 2 次,每份样品加 30μL 细胞裂解液,冰上孵育 20min,10 000r/min 离心 10min。SOD 活力的测定采用黄嘌呤氧化酶法,MDA 含量的测定采用硫代巴比妥酸法,根据试剂盒说明书进行操作,使用分光光度计进行检测。

统计学分析:用 SPSS 16.0 对实验数据进行分析。计量资料采用均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式表示,多组间比较

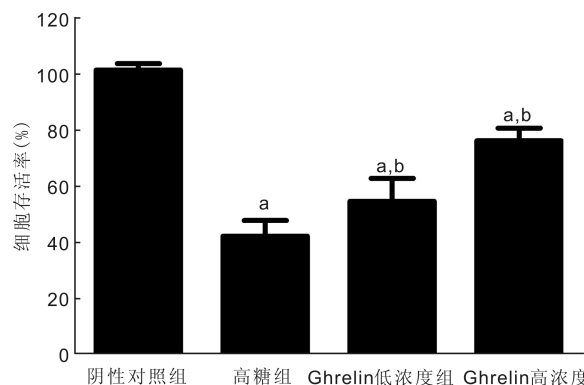


图1 CCK-8 法检测 Ghrelin 对高糖诱导的 RPE 细胞存活率的影响 <sup>a</sup>P<0.05 vs 阴性对照组,<sup>c</sup>P<0.05 vs 高糖组。

表1 Ghrelin 对 RPE 细胞内 SOD 活力及 MDA 含量的影响

组别	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)
阴性对照组	30.50±2.98	4.55±0.69
高糖组	18.45±3.04 <sup>a</sup>	10.32±0.75 <sup>a</sup>
Ghrelin 低剂量组	20.75±3.51 <sup>a</sup>	7.17±0.64 <sup>a,c</sup>
Ghrelin 高剂量组	24.37±2.12 <sup>a,c</sup>	6.63±0.69 <sup>a,c</sup>
F	38.619	155.328
P	<0.001	<0.001

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 阴性对照组;<sup>c</sup>P<0.05 vs 高糖组。

采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Ghrelin 对高糖致 RPE 细胞氧化损伤的影响** 阴性对照组、高糖组、Ghrelin 低浓度组、Ghrelin 高浓度组细胞存活率分别为 101.64%±3.62%、41.65%±3.42%、54.79%±3.43%、79.16%±3.29%,差异有统计学意义(F=250.010, P<0.001);与阴性对照组相比,经 30mmol/L 葡萄糖溶液处理后,细胞存活率明显下降(P<0.001),而分别用 10<sup>-9</sup> mol/L、10<sup>-6</sup> mol/L Ghrelin 预处理后,RPE 细胞存活率均较高糖组显著提高(P<0.001),见图 1。

**2.2 H<sub>2</sub>DCFDA 荧光染色观察细胞内 ROS 生成量** H<sub>2</sub>DCFDA 荧光探针标记法是一种测定细胞内 ROS 生成量的形态学检查方法。未发生氧化损伤的细胞呈暗绿色低荧光(图 2A),当细胞发生氧化损伤时,细胞内 ROS 水平升高,可见明显增多的亮绿色高荧光(图 2B)。Ghrelin 预处理后氧化损伤细胞减少(图 2C、D),提示 Ghrelin 能够抑制 RPE 细胞发生氧化损伤。流式细胞仪检测结果显示,与阴性对照组相比,高糖组 DCF 荧光信号明显增强,ROS 主峰右移;不同浓度 Ghrelin 干预后,荧光信号强度逐渐减弱,ROS 主峰逐渐左移(图 3)。

**2.3 Ghrelin 对 RPE 细胞内 SOD 活力及 MDA 含量的影响** RPE 细胞经 30mmol/L 葡萄糖溶液处理后,SOD 活力显著降低,MDA 含量显著升高,而经 Ghrelin 预处理后,SOD 活力逐渐升高,MDA 含量有下降的趋势。与高糖组比较,Ghrelin 高剂量组细胞内 SOD 水平显著升高,Ghrelin 低、高剂量组细胞内 MDA 含量显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05),见表 1。

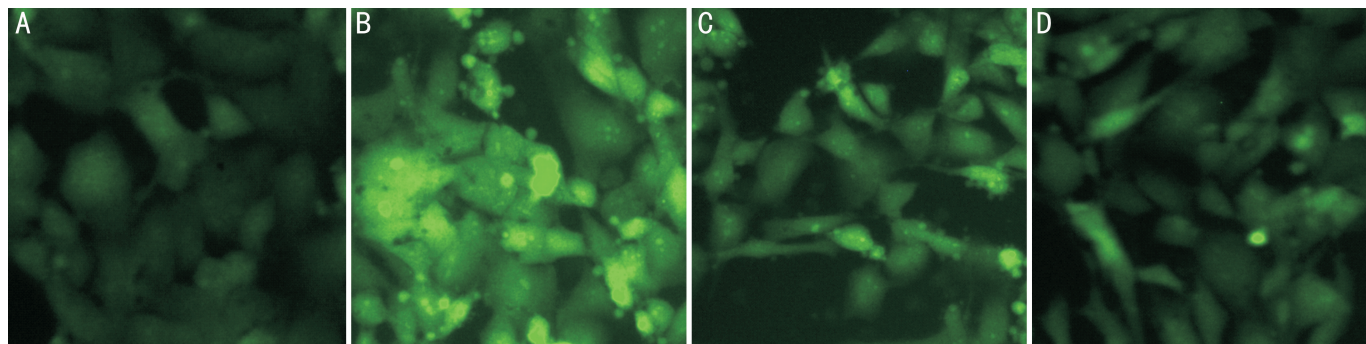


图2 荧光显微镜观察细胞内 ROS 变化 ( $\times 300$ ) A: 阴性对照组; B: 高糖组; C: Ghrelin 低浓度组; D: Ghrelin 高浓度组。

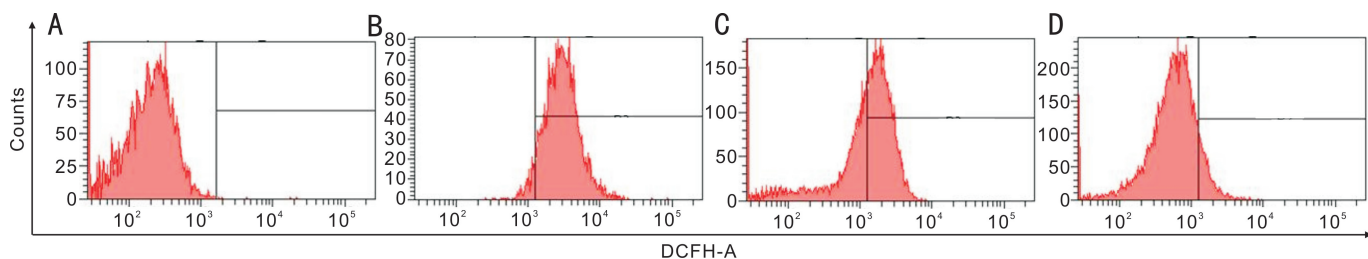


图3 Ghrelin 对 RPE 细胞内 ROS 含量的影响 A: 阴性对照组; B: 高糖组; C: Ghrelin 低浓度组; D: Ghrelin 高浓度组。

### 3 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病引起的最严重的眼部并发症,为深入研究糖尿病视网膜病变的发生机制并探索新的治疗药物和治疗方法,国内外学者尝试采用多种方式模仿糖尿病视网膜病变的发病原理诱导 RPE 细胞凋亡,如高糖环境、化学药物等<sup>[5]</sup>。高糖环境引起视网膜功能损伤主要与以下几个方面有关:(1)高糖环境导致视网膜血管内皮细胞损伤,诱导 RPE 细胞异常分泌血管内皮生长因子(VEGF),部分毛细血管闭塞,从而促进视网膜的缺血和新生血管的形成;(2)高糖可抑制 RPE 细胞的自噬功能,细胞中衰老或损伤的大分子(如蛋白质)和细胞器(如线粒体、高尔基体、内质网)不能被及时清除,大量堆积于细胞内,对组织造成严重损害;(3)RPE 细胞构成视网膜外屏障,其特殊位置使其易于受到高浓度血糖的影响,嗜中性粒细胞在 RPE 细胞上粘附、活化,引起细胞代谢异常,进而破坏视网膜外屏障;(4)高糖环境可激活细胞内应激敏感的信号通路,产生大量自由基及 ROS,细胞内氧化代谢产物堆积导致细胞毒性损伤,过多的自由基将直接通过损伤线粒体造成 RPE 细胞凋亡<sup>[6-8]</sup>。

Ghrelin 主要由胃底细胞分泌,经外周循环作用于下丘脑及垂体,此外,其在心脏、胰腺、胃肠、肾脏、睾丸、卵巢、胎盘等组织中均有表达<sup>[9]</sup>。眼部组织也有 Ghrelin 表达,如虹膜、睫状体、脉络膜、小梁网、Müller 细胞、视网膜内皮细胞等<sup>[10-11]</sup>。血浆中的 Ghrelin 容易穿过血-脑屏障,也能通过血-眼屏障进入眼部组织<sup>[12]</sup>。Ghrelin 与眼部疾病的相关性也有报道,Can 等<sup>[13]</sup>通过制备大鼠急性高血压模型发现,给予外源性 Ghrelin 治疗后,可以明显降低大鼠眼内压;而 Ghanem 等<sup>[14]</sup>发现青光眼患者房水中 Ghrelin 表达水平明显低于正常人。

目前,关于 Ghrelin 对 RPE 细胞的影响的报道并不多,基于 Ghrelin 安全、无毒特性及较强的抑制细胞凋亡和

氧化损伤作用,本研究模拟体内环境中 RPE 细胞的氧化应激状态,利用 30mmol/L 葡萄糖建立细胞高糖模型,观察 Ghrelin 对该细胞的保护作用,以期能为糖尿病视网膜病变治疗提供新的药物选择。细胞活力检测结果显示 30mmol/L 葡萄糖处理的 RPE 细胞存活率明显降低,而 Ghrelin 能够抑制高糖诱导的细胞损伤,其保护作用呈剂量依赖性。H<sub>2</sub>DCFDA 荧光探针染色结果显示,高糖作用下 RPE 细胞内 ROS 表达增高,表明高糖造成了一定程度的氧化应激损伤,Ghrelin 能有效抑制高糖诱导的氧化应激反应的发生。此外,本研究观察到 RPE 细胞内抗氧化酶 SOD 随着 Ghrelin 浓度增加,活力逐渐升高,MDA 含量则呈降低趋势,表明 Ghrelin 可能是通过改变 RPE 细胞内 SOD 和 MDA 的表达发挥细胞保护作用。

综上所述,本研究通过探讨 Ghrelin 对高糖诱导的 RPE 细胞的氧化应激损伤的保护作用及机制,证实 Ghrelin 能够抑制高糖诱导的 RPE 细胞发生氧化应激损伤,为临床治疗提供了重要的理论依据。但 Ghrelin 能否成为糖尿病视网膜病变治疗中的一种新的靶点药物,实现从基础研究到临床应用的转化,仍需进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Kruk J, Kubasik-Kladna K, Aboul-Enein HY. The role oxidative stress in the pathogenesis of eye diseases: current status and a dual role of physical activity. *Mini Rev Med Chem* 2015;16(3):241-257
- 2 Zaniolo K, Sapieha P, Shao Z, et al. Ghrelin modulates physiologic and pathologic retinal angiogenesis through GHSR-1a. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(8):5376-5386
- 3 Golchoobian R, Nabavizadeh F, Roghani M, et al. Ghrelin alleviates MDMA-induced disturbance of serum glucose and lipids levels in the rat. *Acta Med Iran* 2017;55(12):736-743
- 4 Rozza-de-Menezes RE, Gaglianone NC, Andrade-Losso RM, et al. Receptor of ghrelin is expressed in cutaneous neurofibromas of individuals with neurofibromatosis. *Orphanet J Rare Dis* 2017;12(1):186

5 张静琳,易魁先,陈韵,等. 棚皮素对高糖诱导的 RPE 细胞凋亡的保护作用及机制. 中国医药指南 2014;12(12):65-67

6 毕文娇,李睿姝,侯定善,等. 高糖对人视网膜色素上皮细胞神经钙黏连蛋白和纤维连接蛋白表达的影响. 国际眼科杂志 2014;14(9):1578-1580

7 冯丽丽,栾洁,傅敏,等. 高糖体外对视网膜色素上皮增生以及活性氧表达的影响. 国际眼科杂志 2010;10(3):453-456

8 郑海燕. 高糖状态下人视网膜色素上皮细胞氧化应激损伤情况以及上皮-间质转化情况评估. 海南医学院学报 2017;23(4):566-569

9 Zhu K, Zhang ML, Liu ST, *et al.* Ghrelin attenuates retinal neuronal autophagy and apoptosis in an experimental rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(14):6113-6122

10 Rocha - Sousa A, Pereira - Silva P, Tavares - Silva M, *et al.* Identification of the ghrelin - GHSR 1 system and its influence in the

modulation of induced ocular hypertension in rabbit and rat eyes. *Peptides* 2014;57:59-66

11 Turgut B, Gül FC, Dağlı F, *et al.* Impact of ghrelin on vitreous cytokine levels in an experimental uveitis model. *Drug Des Devel Ther* 2013;7:19-24

12 Yi CX, Heppner KM, Kirchner H, *et al.* The GOAT-ghrelin system is not essential for hypoglycemia prevention during prolonged calorie restriction. *PLoS One* 2012;7(2):e32100

13 Can N, Catak O, Turgut B, *et al.* Neuroprotective and antioxidant effects of ghrelin in an experimental glaucoma model. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:2819-2829

14 Ghanem AA, Mady SE, Attia TN, *et al.* Ghrelin Levels in Patients With Primary Open - Angle Glaucoma. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2014;3(2):126-129

## 2016 中国眼科期刊 CiteScore 世界排名 (全球共收录 101 种)

近期,学术出版巨头爱思唯尔(Elsevier)依据 Scopus 数据库发布了 2016 年度期刊引用指数榜 CiteScore。CiteScore,这是一个全新的衡量期刊影响因子的指标。计算方法是:期刊连续 3 年论文在第 4 年度的篇均引用次数,且不剔除任何类型的文章。以下是 2016 CiteScore 中国眼科期刊在全球 101 种眼科期刊的排名:

刊名	出版地	语言	CiteScore	排名
International Journal of Ophthalmology (国际眼科杂志英文版)	中国大陆	英文	1.31	44/101
Asia-Pacific Journal of Ophthalmology (亚太眼科杂志)	中国香港	英文	0.35	74/101
Chinese Journal of Ophthalmology (中华眼科杂志)	中国大陆	中文	0.26	79/101
Chinese Journal of Experimental Ophthalmology (中华实验眼科杂志)	中国大陆	中文	0.14	82/101
Taiwan Journal of Ophthalmology (台湾眼科杂志)	中国台湾	英文	0.11	84/101
International Eye Science (国际眼科杂志中文版)	中国大陆	中文	0.03	93/101
Ophthalmology in China (眼科)	中国大陆	中文	0.03	93/101

源自:<https://journalmetrics.scopus.com>