

褪黑素对大鼠糖尿病视网膜病变的影响

刁慧杰¹, 刘芳¹, 李金颖¹, 崔红²

引用:刁慧杰,刘芳,李金颖,等.褪黑素对大鼠糖尿病视网膜病变的影响.国际眼科杂志 2019;19(10):1663-1666

基金项目:黑龙江省卫生计生委科研课题(No.2018015)

作者单位:(157011)中国黑龙江省牡丹江市,牡丹江医学院附属红旗医院¹眼一科;²药学部

作者简介:刁慧杰,硕士研究生,主治医师,研究方向:糖尿病视网膜病变。

通讯作者:崔红,本科,副主任药师,研究方向:糖尿病视网膜病变.rrr4594@163.com

收稿日期:2019-01-22 修回日期:2019-08-28

摘要

目的:探讨褪黑素对大鼠糖尿病视网膜病变的影响及其机制。

方法:选用健康雄性SD大鼠40只,随机分为4组,正常对照组、糖尿病组、低剂量褪黑素组和高剂量褪黑素组,HE染色观察视网膜结构改变,电镜观察视网膜神经节细胞超微结构变化,黄嘌呤氧化酶法检测视网膜组织中超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平,Western Blot检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)及P53的蛋白表达水平。

结果:HE染色结果显示,正常对照组大鼠视网膜组织结构清晰,糖尿病组大鼠视网膜组织层次欠清晰,神经纤维层水肿,低剂量褪黑素组视网膜细胞分层基本分明,层间细胞排列较整齐,内外核层排列稍紊乱,高剂量褪黑素组大鼠视网膜组织结构较低剂量褪黑素组进一步改善;电镜观察结果显示,与糖尿病组比较,褪黑素组大鼠视网膜神经节细胞形态均不同程度改善;黄嘌呤氧化酶法检测结果显示,褪黑素组大鼠视网膜组织中SOD水平高于糖尿病组,MDA水平低于糖尿病组(均 $P<0.05$);Western Blot结果显示,低、高剂量褪黑素组与糖尿病组比较,Bcl-2蛋白表达逐渐升高,Bax、P53蛋白表达明显降低(均 $P<0.05$)。

结论:褪黑素可改善糖尿病大鼠视网膜形态变化,对糖尿病视网膜病变有一定抑制作用。

关键词:褪黑素;视网膜;氧化应激;凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.10.06

Effect of melatonin on diabetic retinopathy in rats

Hui-Jie Diao¹, Fang Liu¹, Jin-Ying Li¹, Hong Cui²

Foundation item: Heilongjiang Province Health and Family Planning Commission Scientific Research Subject (No.2018015)

¹First Ward of Ophthalmology Department; ²Department of

Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical School, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Hong Cui. Department of Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical School, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China. rrr4594@163.com

Received:2019-01-22 Accepted:2019-08-28

Abstract

• **AIM:** To discuss the effect and mechanism of melatonin on diabetic retinopathy in rats and its mechanism.

• **METHODS:** Totally 40 healthy male SD rats were choose and randomly divided into 4 groups, normal control group, diabetid group, low dose melatonin group and high dose melatonin group. The changes of retinal structure were observed by hematoxylin-eosin staining (HE staining), ultrastructure of retinal ganglion cells were observed by electron microscopy, superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) level in the retina tissue were detected by xanthine oxidase method, and protein expression levels of B cell lymphoma/lewkmia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and P53 were detected by Western Blot.

• **RESULTS:** HE staining results showed that the rat retina tissue structure of the normal control group was clear, the retinal tissue of diabetes group rats were not clear, the nerve fiber layer was edema, the retina cells of low dose melatonin group were probably distinct, the interlayer cells were arranged neatly, and the inner and outer nuclear layers were slightly disordered, rats retinal structure in high dose melatonin group were further improved than that in low dose melatonin group; Electron microscope results showed that compared with diabetes group, retinal ganglion cells form in melatonin group were improved in different extent; Xanthine oxidase method detected that SOD level in retinal tissue of melatonin group rats were higher than that in diabetic group, the MDA level were lower than that in diabetic group, compared with diabetes group the differences both have statistically significant ($P<0.05$); Western blot results showed that the protein expression of Bcl-2 in low dose and high dose melatonin group gradually decreased, Bax and P53 protein expressions increased significantly, compared with diabetic group the differences were statistically significant ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** Melatonin could improve the morphological changes of retina in diabetic rats and inhibit diabetic retinopathy to some extent.

• **KEYWORDS:** melatonin; retina; oxidative stress; apoptosis

Citation: Diao HJ, Liu F, Li JY, et al. Effect of melatonin on diabetic retinopathy in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(10):1663-1666

0 引言

目前,我国糖尿病确诊人数超过9000万,隐性患者近1.5亿人。随着我国人民寿命的提高和生活水平不断改善,糖尿病的发生呈快速上升趋势。糖尿病视网膜病变是糖尿病最严重的并发症之一,糖尿病病史10a患者中糖尿病视网膜病变的发病率为50%,糖尿病病史超过20a的患者中,糖尿病视网膜病变的患病率几乎为100%。糖尿病患者体内长期高血糖状态引起蛋白激酶C、糖基化血红蛋白及多元醇代谢产物增加,影响了视网膜的生理功能并启动了氧化应激损伤^[1-2]。无论是糖尿病大鼠模型还是高糖培养的视网膜色素上皮细胞,均显示视网膜脂质过氧化物水平显著升高,抗氧化酶水平减低。褪黑素(melatonin, MLT)因其对糖尿病患者的葡萄糖和脂质代谢的调节作用而被广泛认可。我们将褪黑素引入到糖尿病视网膜病变的治疗中,也是基于其有效降低脂质过氧化物水平、减轻氧化应激损伤的功效^[3]。褪黑素对糖尿病患者及糖尿病动物模型的调节糖脂代谢及抗氧化的作用已受到广泛重视,但是,关于褪黑素对糖尿病视网膜组织影响的相关报道较少。本研究建立了糖尿病大鼠模型,观察褪黑素对糖尿病大鼠视网膜的保护作用并探讨了其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 褪黑素(Sigma-Aldrich公司,用无水乙醇溶解);DMEM培养液(Hyclone公司);4%多聚甲醛及2.5%戊二醛(北京索莱宝科技有限公司);1%锇酸(上海哈灵生物科技有限公司);枸橼酸铅和2%醋酸双氧钼(上海容创生物技术有限公司);手术显微镜(德国Leica公司,型号:M525 F40);切片机(德国Leica公司,型号:EM UC7);倒置生物显微镜(上海光学仪器厂,型号:37XF);电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYCZ-40D);苏木素-伊红染色剂(武汉博士德生物工程有限公司);BCA蛋白测定试剂盒、裂解液、PVDF膜及化学发光试剂、B细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X Protein, Bax)及P53抗体(上海碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型制备及干预 清洁级雄性SD大鼠[牡丹江医学院医药研究中心实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SYXK(黑)2015-007]40只,体质量 160 ± 20 g,清洁级环境饲养,喂养期间提供标准动物饲料,自由饮水进食,符合卫生部颁布的《卫生部医学实验动物管理实施细则》和《实验动物管理条例》的规定。随机分为正常对照组、糖尿病组、低剂量褪黑素组和高剂量褪黑素组,每组10只,所有大鼠进行适应性喂养1wk。糖尿病组、低剂量褪黑素组和高剂量褪黑素组大鼠禁食12h后按照腹腔内注射60mg/kg链脲佐菌素建立糖尿病模型,正常对照组注射等量的生理盐水。72h后自动血糖分析仪检测尾静脉血糖,浓度 >16.7 mmol/L视为糖尿病模型制备成功,造模未成功的大鼠继续补充注射链脲佐菌素72h,最终30只大鼠均造模成功。造模成功后的大鼠均在第2d注射褪黑素,其中,低剂量褪黑素组大鼠每天左下腹腔注

射褪黑素10mg/kg,高剂量褪黑素组大鼠每天左下腹腔注射褪黑素20mg/kg^[4-6],正常对照组和糖尿病组大鼠不做任何治疗,每日1次,连续喂养12wk。

1.2.2 取材及视网膜病理改变的观察 大鼠过量麻醉处死,在解剖显微镜下无菌操作取右眼眼球,分离视网膜组织,分成2份。其中,1份视网膜用于HE染色,另1份视网膜浸于DMEM培养液中,4℃保存以备用。HE染色具体方法:4%多聚甲醛固定24h,制备石蜡切片并染色苏木素5~10min,蒸馏水冲洗后伊红染液5~10min,再次用蒸馏水洗去玻片浮色,梯度乙醇溶液脱水后观察视网膜病理改变。大鼠左侧眼球置于戊二醛(2.5%)固定液内,4℃冰箱固定72h以上,留作制备电镜标本。

1.2.3 电镜观察视网膜神经节细胞层细胞改变 取出戊二醛固定液中眼球,分离视网膜组织,室温下1%锇酸固定2h,丙酮脱水,常规电镜包埋,制作超薄切片,枸橼酸铅和2%醋酸双氧钼染色,透射电镜观察。

1.2.4 视网膜组织中SOD及MDA水平检测 各组取50μg视网膜组织,研磨制成组织匀浆后低速离心(2000r/min),取上清液,按照检测试剂盒说明将样品加样、混匀,采用黄嘌呤氧化酶法检测SOD及MDA水平。

1.2.5 Western Blot检测Bcl-2、Bax及P53的蛋白表达水平 取50μg视网膜组织,冰上加入400μL含有蛋白酶抑制剂的裂解液研磨30min以提取总蛋白,10000r/min离心10min后取上清,行10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后5%的脱脂奶粉4℃封闭2h,加一抗(稀释浓度1:1000)过夜,室温下孵育二抗(稀释浓度1:2000)1h,ECL化学发光法自显影并采集图像,利用样本目的蛋白的光密度比内参条带的光密度,比较不同样本的相对表达率。

统计学分析:采用SPSS18.0统计学软件分析数据。

计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性者两两比较采用LSD-*t*检验,方差不齐者进行Dunnett's T3检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE染色观察大鼠视网膜结构 正常对照组大鼠视网膜组织结构清晰,内、外核层细胞排列规整;糖尿病组大鼠视网膜组织层次欠清晰,神经纤维层水肿,内丛状层及内、外核层排列疏松;低剂量褪黑素组视网膜细胞分层基本分明,层间细胞排列较整齐,内外核层排列稍紊乱;高剂量褪黑素组大鼠视网膜组织结构较低剂量褪黑素组进一步改善,见图1。

2.2 电镜观察大鼠视网膜神经节细胞超微结构改变 正常对照组大鼠视网膜神经节细胞胞浆丰富,细胞核结构清晰,核内染色质均匀;糖尿病组大鼠视网膜神经节细胞胞浆显著减少,细胞核肿胀,染色质稀疏,线粒体肿胀并呈空泡样改变;褪黑素组大鼠视网膜神经节细胞形态不同程度改善,其中,低剂量褪黑素组细胞内仍可见线粒体空泡样改变,细胞核形态略规整;高剂量褪黑素组胞浆丰富,细胞核形态规则,核仁结构清晰,见图2。

2.3 各组大鼠视网膜组织中SOD及MDA水平 如表1所示,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠视网膜组织中SOD水平明显降低,MDA水平明显升高,差异均有统计学

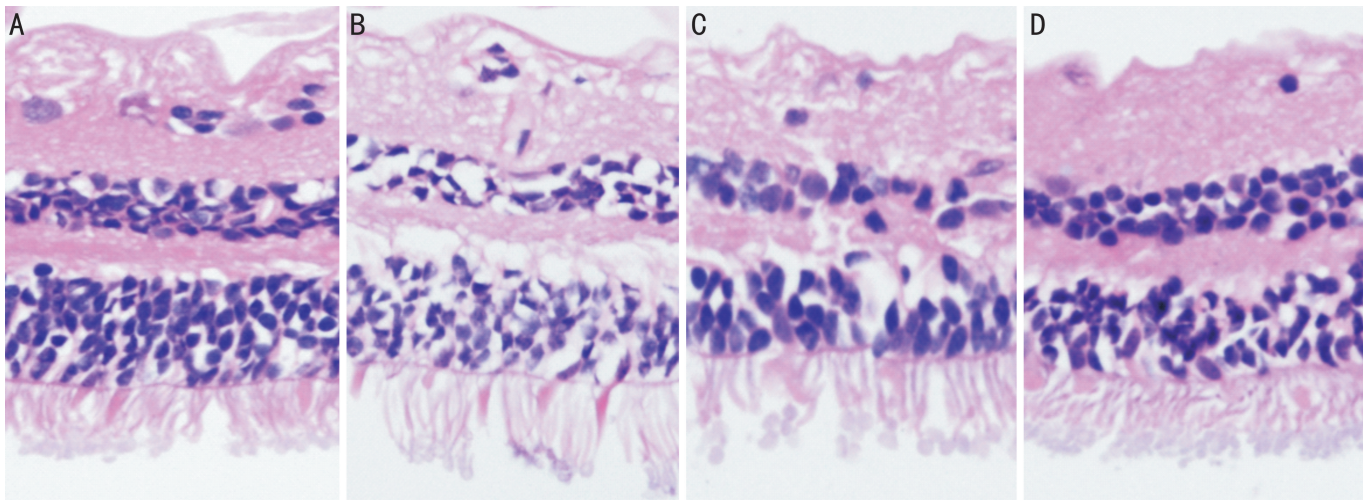


图1 光学显微镜下各组大鼠视网膜结构(HE染色×400) A:正常对照组;B:糖尿病组;C:低剂量褪黑素组;D:高剂量褪黑素组。

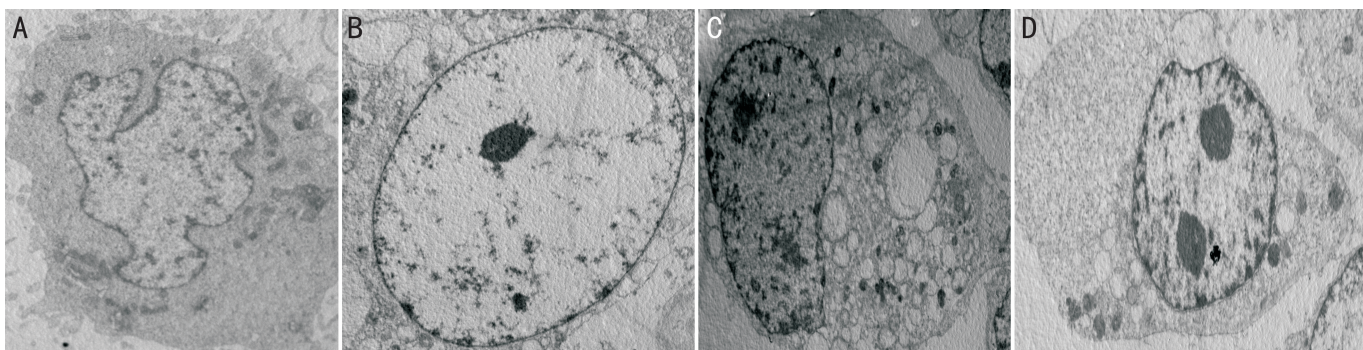


图2 电镜观察大鼠视网膜神经节细胞超微结构改变(×5000) A:正常对照组;B:糖尿病组;C:低剂量褪黑素组;D:高剂量褪黑素组。

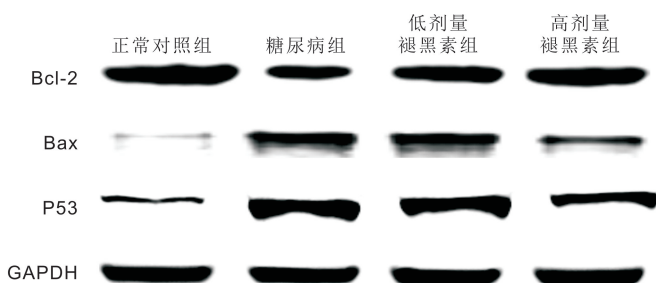


图3 Western blot 检测各组视网膜组织中 Bcl-2、Bax 及 P53 蛋白表达。

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)
正常对照组	564.33±42.67	7.08±1.44
糖尿病组	342.46±20.89 ^a	23.36±2.53 ^a
低剂量褪黑素组	453.94±24.94 ^{a,c}	16.55±1.39 ^{a,c}
高剂量褪黑素组	494.28±39.05 ^{a,c}	14.27±1.20 ^{a,c}
<i>F</i>	78.309	151.851
<i>P</i>	<0.05	<0.05

注:^a*P*<0.05 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05 vs 糖尿病组。

意义(*P*<0.05)。与糖尿病组相比,低剂量褪黑色素组和高剂量褪黑色素组 SOD 水平明显升高,MDA 水平明显降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

2.4 各组大鼠视网膜组织凋亡蛋白表达水平比较 如图3和表2所示,与正常对照组相比,糖尿病组大鼠视网膜组

组别	Bcl-2	Bax	P53
正常对照组	1.77±0.22	0.08±0.04	0.14±0.03
糖尿病组	0.43±0.12 ^a	0.97±0.11 ^a	1.03±0.15 ^a
低剂量褪黑素组	1.01±0.14 ^{a,c}	0.93±0.10 ^a	0.78±0.07 ^{a,c}
高剂量褪黑素组	1.36±0.20 ^{a,c}	0.75±0.08 ^{a,c}	0.55±0.12 ^{a,c}
<i>F</i>	171.772	222.468	63.580
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

注:^a*P*<0.05 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05 vs 糖尿病组。

织 Bcl-2 蛋白表达明显降低,Bax 和 P53 蛋白表达明显升高,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。与糖尿病组比较,低、高剂量褪黑色素组 Bcl-2 蛋白表达明显升高,高剂量褪黑色素组 Bax 及 P53 蛋白表达明显降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

3 讨论

褪黑素可直接淬灭活性氧自由基,有良好的抗氧化应激、抗炎、抗凋亡活性^[7-9]。李晓艳等^[10]研究表明,褪黑素对糖尿病大鼠具有神经保护作用,其作用机制与抑制视网膜神经细胞凋亡有关。褪黑素具有脂溶性和水溶性,细胞膜及线粒体膜均由脂质构成,这种双重溶解性的特点允许药物可以有效通过血-眼屏障及血-房水屏障,在眼部发挥足够的药效^[11]。本研究也是利用了褪黑素双重溶解的特点,以无水乙醇溶解褪黑素,保证药物充分溶解又能达到有效作用浓度。此外,褪黑素由松果体分泌,具有无毒

特性,应用于眼部相对安全,这些特性为褪黑素用于视网膜疾病的临床实验研究奠定了基础^[12]。在本实验中我们采用腹腔注射的方式给药,是考虑到视网膜组织供血来自颈外动脉,大鼠每天左下腹腔注射褪黑素后,可通过体循环-左心室-主动脉-颈外动脉-眼动脉方式到达视网膜组织,保证了视网膜整体组织药物的有效性。现阶段我们通过体内实验证实了该药物对视网膜组织的保护作用,后续将继续通过局部用药方式(眼内注射或滴眼剂),进一步证实该药物有效性。

视网膜由视网膜神经上皮层及RPE层构成,RPE层由单层排列的RPE细胞构成,任何原因引起的RPE损伤都会对视功能造成不可逆影响^[13]。视网膜对氧化应激高度敏感,糖尿病患者视网膜组织氧化应激水平升高,影响了视网膜神经上皮层及RPE层的正常生理功能^[14]。本研究使用60mg/kg链脲佐菌素大鼠腹腔内注射建立糖尿病大鼠模型,观察褪黑素对视网膜组织的保护作用。

观察结果显示,褪黑素干预的糖尿病大鼠,其视网膜形态结构要优于糖尿病组大鼠。糖尿病组大鼠视网膜组织层次欠清晰,神经纤维层水肿,内丛状层及内、外层排列疏松;褪黑素干预后,视网膜各层细胞排列较整齐;电镜对视网膜神经节细胞超微结构观察显示,低、高剂量褪黑素组细胞形态及细胞内线粒体空泡样改变均较糖尿病组减轻,表明褪黑素干预可保护正常视网膜结构。

SOD及MDA是机体内主要的抗氧化酶,其中,SOD与自由基清除能力正相关,MDA含量高低可反映自由基水平^[15]。本实验证实,褪黑素干预糖尿病大鼠能够提高SOD水平,降低MDA含量,从而减轻病理状态下的组织氧化损伤。

Bcl-2在氧化应激介导的细胞凋亡反应中起重要作用,是调节线粒体凋亡途径的重要分子,具有潜在的抗凋亡作用^[16]。Bax及P53表达水平的高低直接反应细胞凋亡程度^[17]。糖尿病组大鼠视网膜组织内Bcl-2表达降低,Bax及P53表达升高,表明链脲佐菌素可诱导组织凋亡;褪黑素干预后Bcl-2表达增加,Bax及P53表达降低,进一步证实褪黑素可抑制高糖诱导的视网膜组织凋亡。

关于褪黑素对糖尿病大鼠视网膜组织保护作用的研究并不多见。国内学者通过制备2型糖尿病大鼠模型,研究褪黑素对视网膜组织的保护作用,结果显示,褪黑素能有效减轻糖尿病大鼠视网膜局部氧化应激反应,抑制视网膜神经细胞凋亡^[18]。本研究通过观察视网膜组织结构,检测视网膜组织中SOD、MDA、Bcl-2、Bax、及P53表达水平进一步验证了褪黑素对高糖诱导的视网膜组织损伤的保护作用,为预防和治疗糖尿病视网膜病变提供了新的干预措施。

参考文献

- 1 Liu Y, Ye J, Cao Y, *et al.* Silibinin ameliorates diabetic nephropathy via improving diabetic condition in the mice. *Eur J Pharmacol* 2018; 845: 24-31
- 2 Calderon GD, Juarez OH, Hernandez GE, *et al.* Oxidative stress and diabetic retinopathy: development and treatment. *Eye (Lond)* 2017; 31(8):1122-1130
- 3 Habetmaria S, Daglia M, Sureda A, *et al.* Melatonin and Respiratory Diseases: A Review. *Curr Top Med Chem* 2017; 17(4): 467-488
- 4 李晓艳,张卯年.褪黑素对早期糖尿病大鼠视网膜锰超氧化物歧化酶和铜锌超氧化物歧化酶表达的影响. *眼科研究* 2010; 28(12): 1110-1114
- 5 杨笑天,张建华,杨笑宇,等.褪黑素对糖尿病大鼠视网膜中糖基化终产物及其受体表达的影响. *中国老年学杂志* 2016; 36(7): 1580-1583
- 6 刘昌明,邓良超,孙玉锦.褪黑素对糖尿病肾病大鼠肾脏的影响. *西南军医* 2018; 20(3):360-363
- 7 Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* 2015; 61(2-3):77-84
- 8 Ostjen CA, Rosa CGS, Hartmann RM, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effect of melatonin on recovery from muscular trauma induced in rats. *Exp Mol Pathol* 2018; 106: 52-59
- 9 Sun ZY, Zhang P, Wang JJ, *et al.* Melatonin alleviates meiotic defects in fetal mouse oocytes induced by Di (2-ethylhexyl) phthalate *in vitro*. *Aging (Albany NY)* 2018; 10(12): 4175-4187
- 10 李晓艳,张卯年.褪黑素对糖尿病大鼠早期视网膜神经细胞凋亡的影响. *眼科新进展* 2012; 32(6): 528-531
- 11 Hu C, Li L. Melatonin plays critical role in mesenchymal stem cell-based regenerative medicine *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 13-19
- 12 Meng X, Li Y, Li S, *et al.* Dietary Sources and Bioactivities of Melatonin. *Nutrients* 2017; 9(4): 9040367
- 13 Danilova I, Medvedeva S, Shmakova S, *et al.* Pathological changes in the cellular structures of retina and choroidea in the early stages of alloxan-induced diabetes. *World J Diabetes* 2018; 9(12): 239-251
- 14 陆骏,秦瑜,肖文玮,等.FOXO4对高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响. *国际眼科杂志* 2018; 18(12): 2146-2148
- 15 Wei LF, Zhang HM, Wang SS, *et al.* Changes of MDA and SOD in Brain Tissue after Secondary Brain Injury with Seawater Immersion in Rats. *Turk Neurosurg* 2016; 26(3): 384-388
- 16 Wang Y, Shao Y, Gao Y, *et al.* Catalpol prevents denervated muscular atrophy related to the inhibition of autophagy and reduces BAX/BCL2 ratio via mTOR pathway. *Drug Des Devel Ther* 2018; 13:243-253
- 17 Ye C, Liu L, Ma X, *et al.* Obesity Aggravates Acute Pancreatitis via Damaging Intestinal Mucosal Barrier and Changing Microbiota Composition in Rats. *Sci Rep* 2019; 9(1): 69-76
- 18 贾秀月,孟德欣,李怀荆,等.褪黑素对糖尿病大鼠视网膜保护作用的研究. *黑龙江医药科学* 2011; 34(2):37-39