



tice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kid Dis*, 2007, 49 (2 suppl 2): S1-S182.

[2] 张晓英, 牟善初. 现代老年肾病学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2002: 418-421.

[3] 陈启华. 糖尿病患者多脏器功能的损害 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2000, 9 (5): 47.

[4] 林兰. 中西医结合糖尿病学 [M]. 1 版. 北京: 中国中医药科技出版社, 1999: 394.

[5] 吴雅芳, 徐建萍. 糖尿病血糖波动病人饮食治疗知识及饮食现状调查 [J]. *护理研究*, 2001, 15 (4): 208-209.

[6] 尤黎明, 吴瑛. 内科护理学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 422~423.

[7] 于康. 临床营养治疗学. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 273.

[8] 孙莉静. 大豆蛋白与肾脏疾病. 国外医学泌尿系统分册. 2002, 22 (1): 16-19.

[9] 李燕, 蔡东联, 陈小莉等. 大豆异黄酮对实验性肾病综合征疗效观察. *中华肾脏病杂志*. 2002, 18 (6): 207-210.

[10] 贾强, 陈秉良, 孙延兵. 维持性血液透析患者心理治疗的临床研究 [J]. *实用医学杂志*, 2002, 18 (7): 697.

[11] 姜贵云. 康复护理学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 56.

[12] 廖二元, 超楚生. 内分泌学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1552.

[13] 孙丽荣, 王佳秋, 于德民, 等. 老年 2 型糖尿病患者糖尿病肾病危险因素分析 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2006, 14 (2): 114-115.

枸杞多糖对糖基化终产物致视网膜神经细胞损伤的影响

郭玮* 罗琼** 闫俊 周银柱 唐韦

(武汉大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 武汉 430071)

摘要 目的: 研究枸杞多糖对糖基化终产物条件下兔视网膜神经细胞的生长及其功能的影响。**方法:** 原代培养兔视网膜神经细胞, 以 20% 糖基化终产物构建兔视网膜神经细胞损伤模型, 用 200 mg/L、400 mg/L、800 mg/L 的枸杞多糖进行干预, 检测各组细胞生长情况、增殖抑制情况和血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-

* 郭玮 (1989-), 男, 武汉大学公共卫生学院营养与食品卫生学专业, 硕士研究生。师从罗琼教授, 研究方向为营养因素与慢性疾病控制。E-mail: weiguogzchn@foxmail.com。

罗琼 (1957-), 女, 博士, 教授, E-mail: drluoqiong@sina.com。武汉大学公共卫生学院营养与食品卫生学系主任; 中国环境诱变剂学会理事; 湖北省预防医学会食品学分会副主任委员; 武汉市预防医学会食品学分会副主任委员; 湖北省营养学会常务理事; 武汉市预防医学会常务理事; 国家食品药品监督管理局保健食品评审专家; 国家自然科学基金生命科学部预防医学、免疫学学科基金申请项目评议专家; 国家中小企业创新基金评审专家等。



2) 及胰岛素样生长因子 I (IGF-1) 的表达情况。结果: 糖基化终产物能抑制视网膜神经细胞生长, 促进 IGF-1 的分泌, 上调 VEGFR-2 的表达, 从而造成视网膜神经细胞损伤; 枸杞多糖能明显下调 VEGFR-2 的表达 ($P < 0.05$)、抑制 IGF-1 的分泌 ($P < 0.05$) 而拮抗 AGEs 的损伤作用, 200mg/L 枸杞多糖的保护作用最好, 400mg/L 枸杞多糖次之。结论: 枸杞多糖能够拮抗糖基化终产物的增殖毒性、降低视网膜细胞 VEGFR-2 的表达、减少 IGF-1 的分泌, 对糖基化终产物致神经细胞损伤有良好的保护作用。

关键词 枸杞多糖; 视网膜神经细胞; 细胞因子

随着人类生活方式的改变, 慢性非传染性疾病已成为人类面临的重大公共卫生问题^[1-2]。糖尿病是慢性非传染性疾病的代表疾病之一, 2 型糖尿病是在多基因遗传基础上加上环境因素的作用引起胰岛素分泌障碍和胰岛素生物学作用障碍, 导致以高血糖为特征的糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱的一组临床综合征。1995 年全世界成人糖尿病患病率为 4.0%, 预计 2030 年患病率高达 7.7%, 发展中国家的 2 型糖尿病所占比例高, 并且 80% 糖尿病患者主要集中在印度、中国。2 型糖尿病常见的慢性并发症主要是由于微血管、大血管及周围神经的病变, 导致心脑血管及周围血管系统、神经系统、消化系统、泌尿系统、视觉系统出现并发症。目前我国的糖尿病病人约为 3500 万, 并且每年以 125 万的人数递增, 糖尿病已成为社会和家庭经济的沉重负担。糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 作为主要的致盲因素, 其致盲率在逐年增加, 在美国成为青年致盲的第二位主要原因, 2 型糖尿病患者中约 25% 发生糖尿病视网膜病变^[3-4]。目前研究发现糖尿病眼病的发生与多种因素相关: 如多元醇通路、AGEs、PKC、血管内皮增殖因子、微循环障碍、血压异常、发病年龄、病程等, 其中糖尿病病程为一致肯定的相关因素。英国前瞻性糖尿病研究发现初诊糖尿病病人已有 37% 单眼微血管瘤或较严重的视网膜病变。美国威斯康星 DR 流行病学研究组发现, DR 的发生与糖尿病病程明显相关, 86% 的糖尿病年轻发病者因 DR 而失明, 老年发病者 1/3 由于 DR 而失明。我国研究发现, 初诊 2 型糖尿病病人中, DR 发生率为 16.6%~63.5%。患糖尿病 10 年后, 约 90%

以上的病人出现不同程度的微血管病变。

糖基化终产物 (AGEs) 作为糖尿病微血管病变的主要因素^[5], 在 DR 的发生和发展过程中起重要作用。糖尿病患者体内 AGEs 的大量堆积导致周细胞从微血管结构的分离、迁徙和丢失^[6-7], 血-视网膜屏障通透性增加, 血管内皮生长因子 (VEGF) 和胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factors, IGF-1) 等的分泌和表达增加、作用增强^[8-9], 从而导致视网膜的一系列损伤。

多糖是自然界含量最丰富的物质之一, 近三十多年来, 随着生物和化学科学的高速发展, 多糖的诸多功能得以揭示和认识。近来人们惊奇地发现: 多糖及其缀合物对多种危害人类健康的疾病, 如免疫紊乱、癌症、糖尿病、肝炎、血栓、肺炎等, 都具有显著的疗效。因此多糖的研究已成为现代研究的热门课题。枸杞多糖 (LBP) 的药理作用从 80 年代以来就有学者在此方面作了大量研究, 揭示枸杞及其多糖在以下几方面有明显作用: 对免疫功能的作用, 抗肿瘤作用, 抗疲劳作用, 降低老龄高血脂症, 延缓衰老, 保肝作用, 防治肾性高血压, 对造血系统的影响, 对生精细胞保护作用, 提高学习记忆力, 细胞营养保护作用, 无明显毒性。本课题通过 LBP 对 AGEs 条件下培养的兔视网膜神经细胞进行干预, 探讨 LBP 对视网膜神经细胞损伤的保护作用, 为糖尿病视网膜病变的预防和治疗提供基础研究依据, 并为枸杞资源的深加工及其特色食品或保健品的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

枸杞子产自宁夏中宁县, LBP 采用文

献^[10]方法进行制备;

AGEs 由本实验室制备;

DMEM 培养基: Hyclon; 胎牛血清: Boyetime; 胰蛋白酶: Boyetime; 多聚赖氨酸: Biosharp; 青霉素-链霉素: Boyetime; 兔抗人 VEGFR-2 单克隆抗体: 博士德; 兔抗人 IGF-1 单克隆抗体: 博士德; 羊抗兔二抗试剂盒: 博士德; AEC 显色试剂盒: 博士德; 超净工作台: 苏州净化; 倒置显微镜: 奥林巴斯; 低速离心机: 长沙湘仪; CO₂ 培养箱: 美国 Thermo; 除菌滤器: Nalgene; AG204 型精密分析天平: 上海梅特勒; 其余试剂均为国产分析纯生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 视网膜神经细胞的原代培养

体重 1.5-2.0kg 的新西兰大白兔麻醉后, 耳缘静脉推入空气处死, 立即取出眼球。用含青霉素和链霉素的 PBS 液冲洗数遍, 置入含双抗无血清 DMEM 培养基中, 转入超净工作台。PBS 冲洗两遍后沿角膜缘剪开眼球, 弃除晶状体和玻璃体。用 PBS 轻轻冲洗视网膜色素上皮层, 小心剥离神经上皮层。用显微眼科剪将神经上皮层剪成 1mm² 大小的碎块, 置入 0.125% 的胰蛋白酶中, 37℃ 消化 30min, 期间每隔 10min 摇动一次。消化完毕后用含 10% 血清的培养基终止消化, 转入离心管中, 800rpm 离心 5min, 弃去上清, 加入培养基, 用吸管反复吹打重悬细胞。用培养基调节细胞密度为每毫升 (3~5) × 10⁶ 个, 接种于多聚赖氨酸包被的 6 孔板。48h 后换液, 弃除未贴壁的细胞。前后每三天换液, 培养 7 天后开始实验。

1.2.2 实验分组

本实验共设如下 5 个组: (1) 空白对照组: 仅含培养基; (2) AGEs 组: AGEs (20%, v/v) + 培养基; (3) 枸杞多糖 1 组 (LBP1): 含 200mg/L 枸杞多糖 + AGEs + 培养基; (4) 枸杞多糖 2 组 (LBP2): 含 400mg/L 枸杞多糖 + AGEs + 培养基; (5) 枸杞多糖 3 组 (LBP3): 含 800mg/L 枸杞多糖 + AGEs + 培养基

1.2.3 细胞抑制实验

消化贴壁的视网膜神经细胞, 用 10% 胎牛血清的培养基进行重悬后接种于 96 孔板, 根据分组每孔加入不同的处理因素, 每孔总体积 200ul, 设 6 个复孔。培养 48h 后, 每孔加入 5mg/ml 的 MTT 20μl, 孵育 4h 后弃去培养基, 每孔加入 DMSO 100μl, 充分振荡混匀 10min 后, 酶标仪 490nm 处测定 OD 值。计算平均 OD 值和抑制率。

抑制率 = (1 - 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值) × 100%

1.2.4 VEGFR-2 和 IGF-1 蛋白表达的检测

细胞爬片后, PBS 液冲洗两次, 干燥后冷丙酮固定 10min。室温下用 3% H₂O₂ 灭活内源性酶。滴加山羊血清封闭液, 室温作用 20min。滴加适当稀释的一抗, 室温静置 1h, PBS 洗后滴加二抗, 37℃ 放置 1h, PBS 洗后 AEC 显色, 封片观察。胞浆中有红色颗粒者为阳性细胞, 随机计数 200 个细胞。

计算阳性率 = (阳性细胞 / 200) × 100%

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理和分析。

计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并且采用 SPSS 17.0 软件进行重复测量资料的方差分析, 组间进一步比较用 Dunnett's *t* 检验。

同时需要对 LBP 各组实际吸光度值和荧光值分别按如下公式进行校正 (枸杞多糖存在背景吸光度值和荧光值):

$$A_{LBP} = A_{LBP测} - (A_{LBP测0} - A_{AGEs0})$$

$$FI_{LBP} = FI_{LBP测} - (FI_{LBP测0} - FI_{AGEs0})$$

$A_{LBP测}$ 代表 LBP 的实际测定值, $A_{LBP测0}$ 和 A_{AGEs0} 分别代表 0h 时 LBP 组与 AGEs 组的测定值。

2 结果

2.1 LBP 对 AGEs 条件下培养的兔视网膜神经细胞增殖抑制的影响

结果显示, 实验各组 OD 值均低于空白对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),

表明 AGEs 对视网膜神经细胞的增殖有明显的抑制作用。与 AGEs 组相比, 200 mg/L 的 LBP 组抑制率低, 表明 LBP 能改善 AGEs 对视网膜神经细胞的损伤, 结果如表 1 所示。

表 1 AGEs 和 LBP 对兔视网膜细胞生长抑制率的影响

组别	OD 值	抑制率
空白组	0.497±0.065	
AGEs 组	0.353±0.054**	29.0%
LBP 200 mg/L 组	0.389±0.066**	21.7%
LBP 400 mg/L 组	0.268±0.085**	46.1%
LBP 800 mg/L 组	0.183±0.077**	73.2%

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比

2.2 LBP 对 AGEs 条件下培养的兔视网膜神经细胞 VEGFR-2 和 IGF-1 表达的影响

如图 1 和图 2 所示, VEGFR-2、IGF-1 阳性细胞可见紫红色的细胞轮廓及胞浆。与空白对照组比较, AGEs 组 IGF-1 和 VEGFR-2 的表达较高, 表现为阳性细胞数目多, 细胞染色较深。LBP 组除 800 mg/L 外, 200 mg/L、400 mg/L 组的 IGF-1 和 VEGFR-2 蛋白的表达均低于 AGEs 组, 表明 LBP 能够降低视网膜组织中 IGF-1 的分泌和 VEGFR-2 的表达。

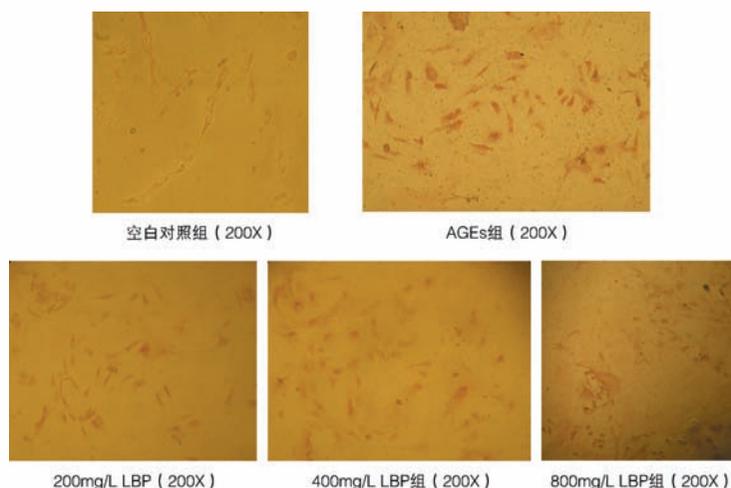


图 1 AGEs 和 LBP 对兔视网膜细胞 IGF-1 分泌的影响

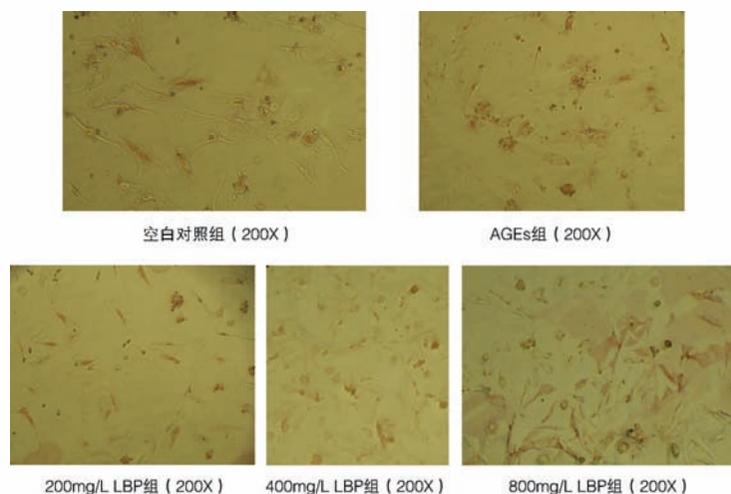


图 2 AGEs 和 LBP 对兔视网膜细胞 VEGFR2 表达的影响

由表 2 可知, AGEs 组和 LBP 各组 VEGFR-2 和 IGF-1 阳性细胞率均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。但 LBP 各组与 AGEs 相比, VEGFR-2 和 IGF-1 阳性细胞率均低于 AGEs 组, 200mg/L LBP 组阳性细胞率与 AGEs 组的差异有显著性 ($P < 0.05$)

表 2 LBP 对兔视网膜神经细胞 VEGFR-2 和 IGF-1 表达的影响

组别	VEGFR-2 阳性细胞率 (%)	IGF-1 阳性细胞率 (%)
正常对照组	21.5	15.5
AGEs 组	39.5**	46.5**
LBP 200mg/L 组	29 [#]	26*** ^{##}
LBP 400mg/L 组	31.5**	33.5*** ^{##}
LBP 800mg/L 组	43**	45.5**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 AGEs 组相比

3 讨论

糖尿病常见的微血管病变会引起视网膜病变, 研究表明, 长期慢性高血糖是其始动因素, 其病理机制是机体多种蛋白质非酶糖基化形成的 AGEs 的堆积。

VEGF 是维持血管正常生理功能的重要生长因子, 在人体正常组织内广泛分布。在眼部, VEGF 主要由内皮细胞、RPE 和胶质细胞等分泌, 生理条件下 VEGF 量较低, 但长期高血糖会导致 VEGF 的分泌增加。Kakehashi 等^[11]发现糖尿病患者房水、虹膜、玻璃体、新生管膜等处, VEGF 和 AGEs 含量均高于非糖尿病病人。VEGF 对 DR 发生和发展的影响均通过 VEGF-VEGF 受体系统实现, VEGF 的受体广泛分布于视网膜内皮细胞、节细胞和 Muller 细胞等神经细胞^[12], 其中 VEGFR-2 是其主要功能受体。本研究结果显示, AGEs 能显著增强视网膜神经细胞 VEGFR-2 的表达, 而 LBP 能够明显拮抗 AGEs 上调 VEGFR-2 表达的作用, 发挥保护视网膜神经细胞的效应。

IGF-1 是一种具有胰岛素样作用的多肽

类因子, 通过与其受体结合而参与新生血管形成。研究发现, IGF-1 与 VEGF 具有协同作用, 可上调视网膜色素上皮细胞内 VEGF mRNA 的表达。研究结果显示, AGEs 能够明显增加视网膜神经细胞 IGF-1 的表达, 而 LBP 通过下调 IGF-1 的表达发挥保护视网膜神经细胞的作用。

4 结论

枸杞多糖能够拮抗糖基化终产物的增殖毒性、降低视网膜细胞 VEGFR-2 的表达、减少 IGF-1 的分泌, 对糖基化终产物致视网膜神经细胞损伤有良好的保护作用。但其具体机制还需进一步的研究。

参考文献

- [1] Yaeh D, Hawkes C, Gould CL, et al. *The global burden of chronic diseases overcoming impediments to prevention and control* [J]. JAMA, 2004, 291: 2616-2622.
- [2] World Health Organization. *Preventing Chronic Diseases: A Vital Investment: WHO Global Report*. Geneva: WHO, 2005, ISBN 9241563001.
- [3] 卢伟. 上海市糖尿病患病与死亡风险分析 [D]. 上海: 复旦大学, 2006.
- [4] American Diabetes Association. *Positionstatement: diabeticnephropathy* [J]. Diabetes Care, 1998, 21: 550.
- [5] Moore TC, Moore JE, Kaji Y, et al. *The role of advancedglycation end products in retinal microvascular leukostasis* [J]. Invest Ophthalmol VisSci, 2003, 44 (10): 4 457-4 464.
- [6] Rand LI, Krolewski AS, Aiello LM, et al. *Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy* [J]. N Engl JMed, 1985, 313 (23): 1433-1438.
- [7] 刘卫, 张勇进. 糖尿病性视网膜病



变 [J] . 国外医学眼科学分册, 2005, 29 (5): 352-357.

[8] Moore TC, Moore JE, Kaji Y, et al. *The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis* [J] . Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (10): 4457-4464.

[9] Awata T, Inoue K, Kurihara S. et al. *A common polymorphism in the untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes* [J] . Diabetes, 2002, 51 (5): 1635-1639.

[10] 谭克为, 罗琼. 枸杞多糖对受照大鼠生殖系统的保护作用 [J] . 中华放射医学与防护杂志, 2008, 28: 258-259.

[11] Diabetes Control and Complications Trial 1 /Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications Research Group. *Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy* [J] . N Engl J Med, 2000, 342 (6): 381-389.

[12] 王文华, 周琼. 糖尿病视网膜病变的治疗进展 [J] . 江西医药, 2009, 44 (9): 931-933.