

枸杞提取物对小鼠视网膜色素上皮细胞下沉积物形成的抑制作用

黄冰林¹, 杭丽¹, 郑仕中², 李伟², 朱长乐¹, 魏源华¹, 徐新荣^{1*}

(1.南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029; 2.南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 研究枸杞提取物对高脂饮食及氢醌诱发的小鼠视网膜色素上皮(RPE)细胞下沉积物形成的抑制作用。方法 8 个月龄的雌性 C57BL/6 小鼠 40 只。8 只予正常饮食, 作为年龄对照组; 32 只高脂肪饮食喂养 6 个月后, 饮水中加入氢醌(0.8%)继续饲养 3 个月, 随机分为模型对照组(8 只)、治疗组(分高剂量、中剂量、低剂量组, 每组 8 只), 治疗组以枸杞浸膏灌胃, 高剂量 3.75 g/(kg·d)、中剂量 2.50 g/(kg·d)、低剂量 1.25 g/(kg·d), 每日 1 次, 持续 3 个月。观察期满处死动物, 摘取眼球。电镜观察 RPE 细胞下沉积物及 Bruch 膜; real time-PCR、western blot 检测半胱氨酸组织蛋白酶 B(Cat B)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cys C)mRNA 转录及蛋白表达。结果 造模后 RPE 细胞损害、RPE 细胞下沉积物形成均较年龄对照组明显增加, 模型对照组 Bruch 膜较年龄对照组明显增厚, 枸杞提取物能减轻 RPE 细胞损害、减少沉积物的形成、抑制 Bruch 膜的增厚。Cat B、Cys C mRNA 及蛋白表达模型对照组较年龄对照组增强, 枸杞提取物能下调模型小鼠视网膜 Cat B、Cys C 的表达, 随剂量的增加而作用加强, 具剂量依赖关系, 以 Cys C 表达下调更显著。结论 枸杞提取物能减轻高脂饮食和氢醌引起的模型小鼠 RPE 细胞损害, 抑制 RPE 细胞下沉积物形成及 Bruch 膜增厚, 机制可能是减少活性氧介质的产生, 下调 Cat B、Cys C 的表达, 并使这 2 种酶的综合作用向 Cat B 作用倾斜有关。

关键词:视网膜色素上皮细胞下沉积物; Bruch 膜; Cathepsin B; Cystatin C; 枸杞提取物

中图分类号: R285.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2013)01-0029-06

Inhibiting Effect of Lycium Barbarum Extracts on Sub-RPE Deposit Formation in High-fat Diet and Oral Hydroquinone Model Mice

HUANG Bing-lin¹, HANG Li¹, ZHENG Shi-zhong², LI Wei², ZHU Chang-le¹, WEI Yuan-hua¹, XU Xin-rong^{1*}

(1. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhabiting effect of lycium barbarum extracts on sub-RPE deposit formation in high-fat diet and oral hydroquinone (HQ) model mice. **METHODS** 40 eight-month-old C57BL/6 female mice, 8 were fed normal diet as aging control group; 32 were fed a high-fat diet for 6 months followed by HQ (0.8%) in the drinking water for 3 months. Model mice were randomly divided into model control group (8 mice) and 3 treatment groups (8 mice each group). Lycium barbarum extracts were given through different dose lavage one time every day (high: 3.75g/kg/d, middle: 2.50g/kg/d, low: 1.25g/kg/d) for 3 months. At the end of the experimental period, the mice were killed and the eyes were immediately removed. Transmission electron microscopy was used to observe sub-RPE deposit formation and Bruch membrane (BrM) thickness, semiquantitative grading of deposit severity was performed; The mRNA and protein expression of cathepsin B (Cat B) and cystatin C (Cys C) were detected by real-time PCR and western blot respectively. **RESULTS** Mice fed a high-fat diet and HQ showed RPE damage was severe, formation of sub-RPE deposits was increasing, in addition, BrM was typically thickened, the severity in model control group was statistically greater than in the aging control group. Lycium barbarum extracts could reduce RPE damage, inhibit sub-RPE deposit formation and thickening of BrM. Compared with the aging control group, the mRNA and protein expression of Cat B and Cys C were significantly higher in the model control group. Expression of Cat B and Cys C were down regulated by the lycium barbarum extracts, and the effect was enhanced as the dosage was increased in

收稿日期: 2012-11-02; 修稿日期: 2012-12-23

基金项目: 江苏省基础研究计划(自然科学基金)资助项目(BK2008494); 江苏省中医药领军人才资助项目(LJ200911); 江苏省中医药局科技项目(LZ11041)

作者简介: 黄冰林(1981—), 女, 江西南昌人, 南京中医药大学 2009 级博士研究生。* 通信作者: xinrong_xu@yahoo.com.cn

a dose dependent manner, there was an especially significant reduction of Cys C expression. **CONCLUSION** Lycium barbarum extracts could reduce RPE damage, and inhibit sub-RPE deposit formation and thickening of BrM in high-fat diet and oral HQ mice model. The mechanism may be to reduce generation of ROS, down regulate the expression of Cat B and Cys C, and comprehensive actions of Cat B and Cys C shift to the function of Cat B.

KEY WORDS: sub-RPE deposit; Bruch membrane; cathepsin B; cystatin C; lycium barbarum extracts

年龄相关性黄斑变性(Age-related macular degeneration, AMD)是目前老年人主要不可逆致盲眼病之一。近年,湿性 AMD 的治疗取得了较大进展,但防治干性 AMD 的药物研究进展不大。研究表明,氧化损伤是干性 AMD 发生、发展的关键因素之一^[1]。半胱氨酸组织蛋白酶 B(Cathepsin B, Cat B)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cystatin C, Cys C)是视细胞外节顶端脱落膜盘消化的重要调控酶之一^[2],与干性 AMD 的发病密切相关。

枸杞具有抗氧化、抗衰老、增强免疫功能以及抗肿瘤等多种生物活性。其活性成分单体如枸杞多糖、 β -胡萝卜素类物质均具有抗氧化作用,其中 β -胡萝卜素类物质是重要的视色素^[3]。基于此,我们研究了枸杞提取物对高脂饮食结合氧化损伤小鼠 RPE 细胞下沉积物形成及对 Cat B、Cys C 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料及试剂

1.1.1 Real Time-PCR 主要试剂

Trizol Reagent (Invitrogen 公司, Cat. No. 15596-026 Lot. No. 51941204); DEPC (Amresco 公司, Lot. No. 2010/11); OligodT₍₁₅₎, MgCl₂, 5 × First Starand buffer, dNTP Mix, MMLV Rev Transcriptase, RNase inhibitor, Taq DNA Polymerase, 10 × buffer for Taq DNA Pol (上海申能博彩生物科技有限公司); 2 × iQ Tm SYBR Green supermix (Takara 公司, Lot No. BKA1505); 引物 (小鼠来源, 100 ng, 金思特科技有限公司)。

1.1.2 Western blot 主要试剂

苯甲基磺酰氟化物 (AMRESCO 公司, 批号: 0954)、Triton - X100 (AMRESCO 公司, 批号: DZ0994)、三羟甲基氨基甲烷 (AMRESCO 公司, 批号: 0679)、丙烯酰胺 (AMRESCO 公司, 批号: DZ0017)、甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝 (AMRESCO 公司, 批号: 2438A42); 十二烷基硫酸钠 (Merck 公司, 批号: DZ0026), 哺乳动物细胞蛋白质抽提试剂 MC-CellLytics (上海申能博彩生物科技有限公司,

Cat No: LY006); BCA protein assay reagent kit、化学发光试剂盒 (PIERCE 公司, Lot: EF60968); PVDF 膜 (Roche 公司, Cat No: 3010040), 蛋白 Marker (FERMENTAS 公司, Cat No: 00021726), β -actin monoclonal antibody (Bioworld 公司, Cat No: MB2237; 1 : 5000), Cathepsin B、Cystatin C 一抗 (R&D Systems 公司, Cat No: JJY02; 1 : 500)、鼠二抗 (R&D Systems 公司, Cat No: XGO03; 1 : 1000)。

1.1.3 枸杞浸膏制备及给药方法

取枸杞药材 (宁夏产, 本院药剂科采购), 加 5 倍量 60% 乙醇浸泡过夜, 回流 1 h, 过滤, 残渣加 3 倍量 60% 乙醇回流提取 1 h, 过滤, 合并滤液, 浓缩, 得黏稠状浸膏, 浓度为生药量 1.563 g/g。

1.2 动物模型建立、分组及给药方法

造模: 8 个月龄的雌性 C57BL/6 小鼠 (北京维通利华公司, 实验动物生产许可证: SCXK (京) 2006-009, 实验动物设施使用许可证号: SYXK (京) 2005-0022, 在本院实验动物中心高脂肪饮食喂养 6 个月后, 饮水中加入氢醌 (Alfa Aesar 公司), 浓度为 0.8%, 继续饲养 3 个月。

动物分组: 年龄对照组 8 只 (正常饮食)。模型动物随机分为: 模型对照组 8 只 (高脂饮食 + 氢醌); 治疗组 (高脂饮食 + 氢醌 3 个月后给枸杞提取物): 高剂量、中剂量、低剂量各 8 只; 另取 2 只 3 个月龄雌性 C57BL/6 青年小鼠用于电镜观察。

给药方法: 枸杞浸膏用灌胃法给药, 高剂量 3.75 g/(kg · d)、中剂量 2.50 g/(kg · d)、低剂量 1.25 g/(kg · d), 每日 1 次, 持续 3 个月。

1.3 电镜观察

观察期满处死动物, 摘取眼球 (2 只动物), 2.5% 戊二醛 + 2.5% 多聚甲醛混合固定液固定 24 h, 去除角膜、晶体及玻璃体, 在视乳头两侧切取 2 mm × 4 mm 球壁, 常规戊二醛、锇酸固定, 环氧树脂包埋, LEICA ULTRACUTR 型超薄切片机切片, 醋酸双氧钨及柠檬酸铅双重染色, JEM1010EX 型透射电镜观察、摄片。RPE 下沉积物半定量评定采

用 Diego G 等人的记分方法^[4],沉积物宽度:0 级:无;1 级:局灶性斑点状;2 级:范围 <2 个 RPE 细胞;3 级:范围 ≥ 2 个 RPE 细胞;沉积物厚度:0 级:无;1 级:扁平状;2 级:厚度 $<1/4$ RPE 细胞高度;3 级: $\geq 1/4$ RPE 细胞。评分由 2 名研究人员在单盲下进行,每只眼球观察 5 张切片,每张切片选 3 个视野进行沉积物宽度、厚度评分,综合评分计算:宽度分+厚度分/2。Bruch 膜厚度在电镜照片上测量(放大 25 000 倍,以照片标尺为依据),每只眼球观察 5 张切片,每张切片选取 3 个视野测量。

1.4 Real time-PCR 实验

各组取眼球 6 只,提取视网膜、脉络膜总 RNA(按 Trizol 说明书进行),测定 RNA 纯度和含量,2%琼脂糖凝胶电泳检测所提 mRNA 完整性,配制反应体系后用 M-MLV 逆转录酶反转录获得 cDNA,PCR 扩增以 cDNA 为模板,以 β -actin 为内参基因。引物序列为: β -actin:5'-ccacagctgagaggaaatc-3'(sense),5'-tctccaggagggaagaggat-3'(antisense);Cathepsin B:5'-ggagatactcccaggtgcaa-3'(sense),5'-ctgccatgatctccttcaca-3'(antisense);Cystatin C:5'-caacaagggcagcaacgatg-3'(sense),5'-gggaaggagcacaagtaaggaac-3'(antisense)。

配制反应体系后进行实时定量 PCR。反应程序:预变性,95℃,30 s,PCR 反应,95℃,5 s,60℃,30 s,72℃,40 s 共 40 个循环,每个循环结束后采集荧光信号,最后绘制熔解曲线。结果计算采用 ddCT 法。

1.5 Western blot 实验

各组取眼球 6 只,每 100 mg 组织中加入 1 mL PBS,匀浆器研磨均匀提取总蛋白;取 50 μ g 蛋白行 SDS-PAGE 分离蛋白,将蛋白质转移至甲醇激活的

PVDF 膜,10%脱脂奶室温封闭 2 h,一抗 4℃反应过夜,TBST 漂洗 3 次,10 min/次;加入相应的二抗,室温下反应 2 h 后,用 TBST 漂洗 3 次,10 min/次;进行化学发光反应、显影、定影。以等量的 β -actin 蛋白质作对照,将胶片进行扫描,每个样本重复 3 次。用 ImageJ 图像分析软件测定所采集图像目的条带的光密度值。蛋白表达定量水平用目的条带的光密度值/ β -actin 条带的光密度值表示。

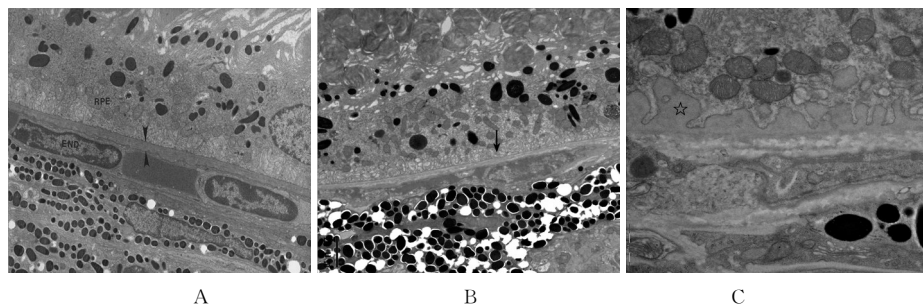
1.6 统计学方法

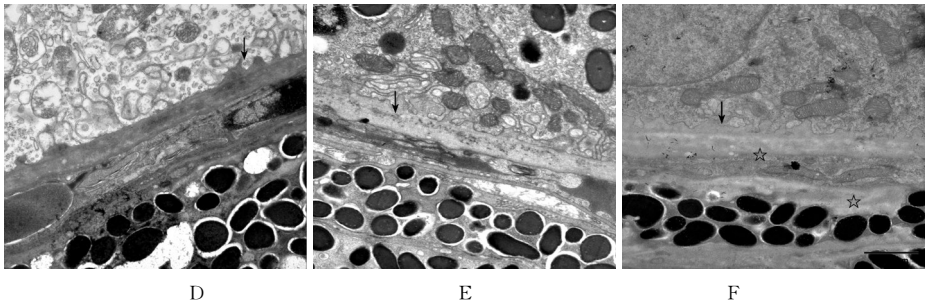
采用 SPSS 13.0 统计软件,数据用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电镜观察

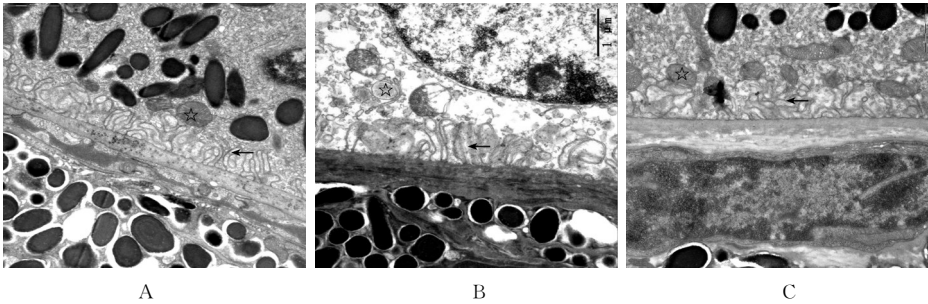
青年鼠 RPE 细胞结构正常,Bruch 膜均匀一致,未见沉积物(图 1A);年龄对照组小鼠 RPE 细胞结构正常,Bruch 膜稍增厚、不均匀,有点状低电子密度改变,见少量斑点样沉积物(图 1B,2A);模型对照组小鼠 RPE 细胞线粒体空泡化,基底部内褶膨大、减少(图 2B),Bruch 膜显著增厚、不均匀,见连成条带状的低电子密度改变,脉络膜毛细血管内皮细胞周围亦见到同样改变,有大量连续板层状沉积物(图 1C);治疗组:大剂量组 RPE 细胞线粒体结构基本完整,基底部内皱少数膨大(图 2C),Bruch 膜均匀性较好,见少量颗粒状沉积物(图 1D),中剂量组 Bruch 膜不均匀,有明显斑点样低电子密度改变,较多斑片状沉积物(图 1E),小剂量组 Bruch 膜密度明显不均匀,见连成条状的低电子密度改变,脉络膜毛细血管内皮细胞周围亦见到同样改变,有连续板层状沉积物(图 1F)。各组 RPE 下沉积物程度评分及 Bruch 膜厚度比较见表 1。





注:A 青年鼠 Bruch 膜厚度一致、密度均匀;B 年龄对照组 Bruch 膜稍增厚、不均匀,点状低电子密度改变(箭头),少量斑点样沉积物;C 模型对照组 Bruch 膜显著增厚、不均匀,有连成条带状的低电子密度改变,脉络膜毛细血管内皮细胞周围亦见到同样改变,有大量连续板层状沉积物(星);D 大剂量组 Bruch 膜均匀性较好,少量颗粒状沉积物(箭头);E 中剂量组 Bruch 膜不均匀,见明显斑点样低电子密度改变(箭头),有较多斑片状沉积物;F 小剂量组 Bruch 膜密度明显不均匀,见连成条状的低电子密度改变,脉络膜毛细血管内皮细胞周围亦见到同样改变(星),有连续板层状沉积物(箭头)。

图 1 电镜观察结果(×25 000)



注:A.年龄对照组小鼠线粒体结构完整(白星),基底部内皱排列整齐(箭头);B.模型对照组小鼠线粒体空泡化(白星),基底部内皱多数膨大、数量明显减少(箭头);C.大剂量治疗组小鼠线粒体结构基本完整(白星),基底部内皱少数膨大、数量少于年龄对照组(箭头)。

图 2 电镜观察结果(×25 000)

表 1 枸杞提取物对 C57BL/6 小鼠 RPE 下沉积物形成、Bruch 膜厚度的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)		
组别	沉积物程度评分	BrM 膜厚度/ μm
年龄对照组	2.33 ± 1.05	0.39 ± 0.06
模型对照组	$7.52 \pm 2.13^{**}$	$0.68 \pm 0.09^{**}$
大剂量组(3.75 g/kg)	$3.27 \pm 1.15^{\# \#}$	$0.40 \pm 0.07^{\# \#}$
中剂量组(2.50 g/kg)	$4.84 \pm 1.69^{\#}$	$0.44 \pm 0.06^{\# \#}$
小剂量组(1.25 g/kg)	$5.39 \pm 2.33^{\#}$	$0.49 \pm 0.09^{\# \#}$

注:年龄对照组与模型对照组相比, $**P<0.01$;治疗组与模型对照组相比, $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$ 。

2.2 Real time PCR 检测 Cathepsin B、Cystatin C mRNA 的表达

Cathepsin B、Cystatin C mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果见图 3~4。结果显示:模型对照组 Cat B、Cys C mRNA 表达显著高于年龄对照组,治疗组中各剂量组 Cat B、Cys C mRNA 表达比模型对照组明显降低,浓度越高降低越明显,呈剂量依赖关系。

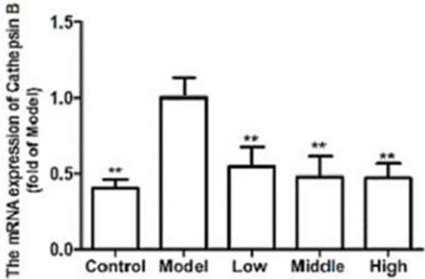


图 3 Cathepsin B mRNA 表达 Real time PCR 检测结果

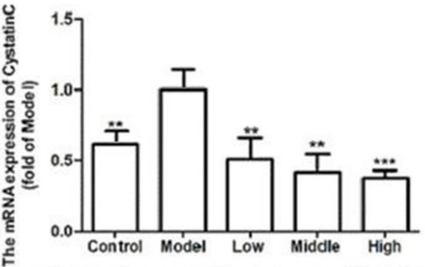


图 4 Cystatin C mRNA 表达 Real time PCR 检测结果

2.3 Western blot 检测 Cathepsin B、Cystatin C 蛋白的表达

Cathepsin B、Cystatin C 蛋白表达的 western

blot 检测结果见图 5, 图像分析结果见图 6。结果显示: 模型对照组 Cat B、Cys C 高于年龄对照组, 给药各组均能降低 Cat B、Cys C 蛋白表达, 随剂量的增加而作用加强, 具有剂量依赖关系。各组 Cat B 与 Cys C 蛋白表达比值结果见图 7, 提示 2 种酶的综合作用向 Cat B 作用方向倾斜。

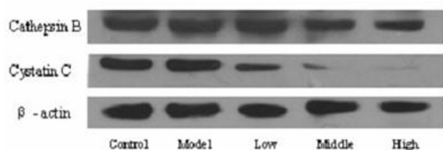


图 5 Cathepsin B、Cystatin C 蛋白表达 western blot 检测结果

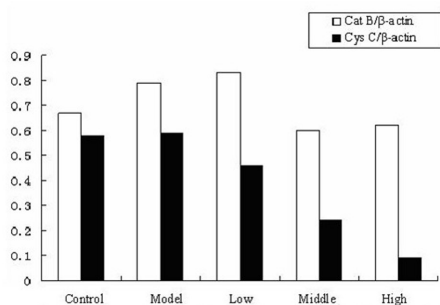


图 6 Cathepsin B、Cystatin C 蛋白表达 western blot 图像分析结果

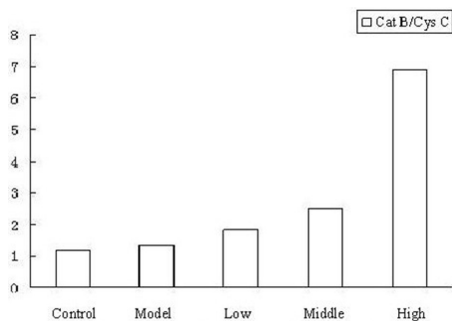


图 7 Cathepsin B、Cystatin C 蛋白表达比值

3 讨论

我们在研究中观察到高脂饮食结合氢醌喂养的小鼠有 RPE 改变、RPE 下沉积物形成及 Bruch 膜增厚, 这些改变与人早期 AMD 视网膜变化有类似性, 这虽然不能代表 AMD 的自发病程, 但能反映 AMD 早期的一些形态特征, 说明这是一种有效的干性 AMD 制模方法。

氢醌是吸烟时产生的主要有害物, 也是汽车尾气、工业污染、塑料制品的重要化学污染物。氢醌可经血循环在细胞间弥散, 与线粒体氧化酶的正常底物竞争, 和酶结合后产生大量的过氧化物, 损伤线粒体膜, 过氧化物进入胞浆后被转变成氢氧根离子, 引起蛋白质及脂质氧化^[5]。

有研究报道, 反复暴露于氢醌的 RPE 细胞基底面出现较多沉积物, 小鼠结膜下注射氢醌后, RPE 下见到大量沉积物^[6]。我们在研究中观察到, 模型小鼠 RPE 细胞线粒体空泡化明显, 基底部内皱膨大、减少, RPE 下沉积物形成及 Bruch 膜增厚, 进一步证实了氢醌对 RPE 细胞的损害。氢醌的氧化损伤使 RPE 细胞功能受损, 消化清除视细胞脱落膜盘能力下降, 导致 RPE 细胞下沉积物大量堆积, 这又反过来影响 Bruch 膜弥散性, 使氧、营养物质及废物的转运功能受损, 进而促进沉积物增加。流行病学研究证实, 高血脂是 AMD 发病的危险因素。我们在研究中也观察到, 模型小鼠除了 RPE 细胞下方沉积物积聚外, 在脉络膜毛细血管内皮细胞周围也见到沉积物堆积, 这可能是氢醌损伤了毛细血管内皮细胞, 在高血脂环境下, 导致脂质渗出至毛细血管内皮细胞外而形成。上述研究结果也支持高血脂及吸烟是 AMD 的高危因素。

Cat B 是一种广谱的蛋白水解酶, 在降解蛋白质途径中发挥着必不可少的作用, 损伤或炎症反应可调控其表达, Cys C 则是 Cat B 的最强抑制剂, 2 种酶使蛋白质的合成与降解保持精确的平衡^[7]。这 2 种酶也是视细胞外节顶端脱落膜盘消化的重要调控酶。我们的研究观察到, Cat B 和 Cys C 在正常小鼠眼组织有表达, 但在模型小鼠表达显著上调, 表明氢醌能增加 Cat B 和 Cys C mRNA 转录及蛋白合成, 机制可能因氢醌的氧化损伤导致细胞内产生大量活性氧介质, 引起细胞损伤而触发。

枸杞活性成分如枸杞多糖、β-胡萝卜素类物质均具有抗氧化作用。黄斑区类胡萝卜素可以削弱蓝光, 降低蓝光强度, 从而有效减少视网膜的氧化压力。叶黄素和玉米黄素有减轻不饱和脂肪酸氧化, 稳定光感受器外节膜, 减少光感受器凋亡的作用。2001 年 Mares Perlman 等进行的美国国家健康和营养检测调查发现, 年龄在 40~59 岁的早期 AMD 及年龄在 60~79 岁的晚期 AMD 患者发病危险性与饮食中摄入叶黄素和玉米黄素的水平直接相关, 认为饮食摄入大量的叶黄素和玉米黄素可以阻止或延缓早期或晚期 AMD 的发生^[8]。

本研究采用枸杞醇提物进行实验, 是因为枸杞醇提物抗氧化作用强于水提物, 而全提取物含有多活性成分, 抗氧化作用可能强于单体^[9]。研究结果显示, 枸杞提取物能下调模型动物 Cat B、Cys C 的表达, 但 Cys C 表达下调更显著, 且以高剂量作用