维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0840 - 03

锌离子对糖尿病大鼠视网膜保护作用的研究

张美珍,张学东,郑天生

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察糖尿病大鼠视网膜还原型谷胱甘肽和脂质过氧化产物丙二醛含量的变化以及锌离子对糖尿病大鼠视网膜的保护作用。方法:建立链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ)诱导的糖尿病模型,随机分为正常对照组、糖尿病模型组以及氯化锌干预组,每组 24 只,观察 72h。在处理后 24h、48h、72h 取血和组织,应用分光光度法检测胰腺和视网膜还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH);视网膜丙二醛(Maleic Dialdehyde MDA)的测定采用 TBA 法;血清胰岛素水平的检测用放射免疫法。结果:正常组各指标含量无差别;模型组血糖值、视网膜 MDA 含量增高,24h 点胰岛素水平升高,48h 和 72h 则降低,胰腺和视网膜 GSH 含量降低,;干预组各时期测量指标介于二者之间。结论:锌离子可以提高糖尿病大鼠视网膜 GSH 含量并降低 MDA 水平,增强其应激能力,有可能成为防治糖尿病视网膜病变的一种有效的药物。

【关键词】锌离子;糖尿病视网膜病;氧化应激

【中国图书分类法分类号】R587.26 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 03 - 31

Role of Zinc in protecting the retina of diabetic rats

Zhang Meizhen , et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To evaluate the changes of glutathione in the retina of rats at early stage of diabetes and the effect of zinc on glutathione and MDA in the retina. Methods: 72 Wistar rats weighing 200 +/ - 50 g were made diabetic by injection with a single ip dose of streptozotocin(60 mg/kg). Another group of rats was simultaneously treated with streptozotocin (60 mg/kg) and a single ip dose of zinc chloride (ZnCl2) (10 mg/kg). Control group was treated with buffer. Blood and tissue samples were collected at 24, 48, and 72 h after - treatment in three groups. Results: Serum insulin was significantly increased 24h after treatment in both streptozotocin and steptozotocin plus $ZnCl_2$ - treated groups, and then decreased markedly 48 and 72 h after treatment in both groups. Streptozotocin treatment depleted both retinal and pancreatic GSH contents. The decrease in retinal and pancreas GSH in streptozotocin - treated rats was accompanied with a sustained increase in their MDA content. The combined administration of streptozotocin and zinc reversed the depleting effect on retinal and pancreatic GSH in streptozotocin - treated rats and reduced the elevations in MDA content of both retina and pancreas. Conclusion: The current results clearly indicate the beneficial effects of Zinc in both controlling hyperglycemia and protecting of the retina against oxidative stress in diabeteswhich may help set a new direction toward the development of effective treatments of DR.

【Key words】Zinc; Diabetic rats; Oxidative stress

糖尿病视网膜病变是糖尿病微血管主要并发症之一,是糖尿病患者视力下降、失明的主要原因。关于糖尿病视网膜病变的发生机理尚未完全明了,研究表明氧化应激在其发生发展中起重要作用[1,2]。实验研究证实锌离子对急性高眼压大鼠视神经[3]有保护作用,也可以提高人体的氧化应激能力[4]。本实验旨在观察锌离子对糖尿病大鼠视网膜 GSH 和 MDA 的影响,探讨其作用机理,为临床应用锌离子制剂治疗糖尿病视网膜病变提供实验依据。

作者介绍:张美珍(1977 -),女,硕士研究生,主要研究方向:玻璃体视网膜疾病。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

实验动物:Wistar 大鼠(雌雄不限,体重 200 ± 50 g)72 只,由重庆医科大学实验动物中心提供。实验用药及主要试剂:氯化锌、冰醋酸(国产分析纯);链脲佐菌素(streptozotocin,STZ Sigma 公司);罗氏血糖诊断试纸(桐君阁大药房);胰岛素放免试剂盒(北京北方生物技术研究所);GSH、MDA 测试盒、考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所)。实验用主要仪器:玻璃匀浆器、低温离心机、血糖仪、精密电子天平、722 型光栅分光光度计、解剖显微镜、γ - 计数器、0 ~ 40C 冰箱、- 700C 冰箱

1.2 方法

动物分组:72 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组,糖尿病模型组,氯化锌干预组,每组 24 只。

动物模型制作:大鼠适应性喂养 1 周,禁食 12h,以 60mg/kg STZ(临用前用 0.1mmol/L、pH4.2 的柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液配成 2% 的溶液)快速一次性左下腹腔注射建立糖尿病模型,干预组 24 只同时右下腹腔注射氯化锌 10mg/kg。于处死前测量血糖水平以确定糖尿病模型成功与否。正常组仅予以等量柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液腹腔注射,处死前测量的血糖值为正常血糖。

取材:大鼠用 10% 水合氯醛麻醉心脏采血大约 2ml,室温(20℃ ~ 25℃)静置 2h 后离心取血清 0.5 ml 在 - 700C 冰箱保存;剖腹剪一块胰腺组织,摘取眼球,去除眼前节,显微镜下分离视网膜,胰腺和视网膜用冷生理盐水洗净,精密天平称重。

血糖、胰岛素水平的测定:断尾采血用血糖仪测血糖,用放射免疫法检测血清胰岛素水平。

视网膜和胰腺 GSH 测定(整个实验过程在低温环境下进行):按重量体积比加生理盐水制成 10% 组织匀浆,3000r/min 离心 10min,然后取组织匀浆上清按照试剂盒说明操作测 GSH。

视网膜 MDA 的测定(整个实验过程在低温环境下进行):10% 组织匀浆用生理盐水按 1∶4 体积比制备成 2% 组织匀浆,并且视网膜组织匀浆不离心,按照试剂盒说明操作测 MDA。

视网膜和胰腺蛋白定量:将 10% 的组织匀浆上清再用生理盐水按 1∶4 体积比稀释按照考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒说明操作进行组织蛋白定量。(用来计算 GSH 和 MDA 的量)

1.3 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,t 检验分析。$P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结 果

2.1 链尿佐菌素和锌离子对大鼠血糖和胰岛素水平的影响

与正常组相比,血糖值在模型组和干预组相应时间点均显著升高,但是干预组相应时间点血糖水平低于模型组;血清胰岛素水平在模型组和干预组处理后 24h 明显升高,48h、72h 低于正常组,但是干预组相应时间点胰岛素水平高于模型组。见表 1。

表 1 各实验组各时间点血糖(mmol/l)和胰岛素水平(μIU/ml)(均数 + 标准差)

Group		Time(h)		
		24	48	72
control	BG	7.13 ± 0.19	7.15 ± 0.29	7.20 ± 0.32
	Insulin	12.48 ± 1.26	12.50 ± 0.98	13.71 ± 1.68
model	BG	23.37 ± 1.94 -	25.55 ± 3.73 -	24.73 ± 2.07 -
	Insulin	19.32 ± 1.08 -	10.50 ± 1.16 -	8.24 ± 0.70 -
$ZnCl_2$	BG	21.33 ± 1.16 - -	22.05 ± 2.70 - -	21.27 ± 1.66 - -
	Insulin	21.31 ± 2.50 - -	12.94 ± 1.85 - -	10.20 ± 1.72 - -

- $P < 0.05$ vs control, - - $P < 0.05$ vs model

表 2 各实验组各时间点视网膜、胰腺 GSH(mg/g prot.)水平的变化(均数 + 标准差)

Group		Time(h)		
		24	48	72
control	Retina	6.12 ± 0.81	5.96 ± 1.03	6.04 ± 0.84
	Pancreas	15.05 ± 1.51	15.66 ± 1.27	14.85 ± 1.74
model	Retina	4.50 ± 0.46 +	4.01 ± 0.73 +	3.46 ± 0.51 +
	Pancreas	11.38 ± 0.59 +	8.59 ± 0.73 +	7.94 ± 0.69 +
$ZnCl_2$	Retina	5.32 ± 0.57 + +	4.69 ± 0.51 + +	4.39 ± 0.48 + +
	Pancreas	13.20 ± 1.16 + +	10.46 ± 0.65 + +	9.09 ± 0.56 + +

+ $P < 0.05$ vs control, + + $P < 0.05$ vs model

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 链尿佐菌素和锌离子对大鼠视网膜和胰腺 GSH 的影响

处理 24h、48h 和 72h 后,模型组视网膜和胰腺 GSH 含量比正常组相应时间显著降低,干预组视网膜和胰腺 GSH 含量低于正常组相应时间($P < 0.05$),而模型组和干预组视网膜和胰腺 GSH 含量差别具有统计学意义。见表 2。

2.3 链尿佐菌素和锌离子对大鼠视网膜 MDA 的影响

模型组和干预组视网膜 MDA 含量比正常组相应时间段增高($P < 0.05$),但是模型组和干预组视网膜 MDA 的含量差别具有统计学意义。见表 3。

表 3 各实验组各时间点视网膜 MDA 水平(nmol/mg prot.)的变化(均数 + 标准差)

Group		Time(h)		
		24	48	72
control	Retina	2.53 ± 0.39	2.47 ± 0.42	2.79 ± 0.44
model	Retina	3.48 ± 0.41*	4.87 ± 0.60*	5.56 ± 0.21*
$ZnCl_2$	Retina	2.93 ± 0.42#	4.14 ± 0.44#	4.69 ± 0.58#

* $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs model

3 讨 论

糖尿病视网膜病变的发生比较复杂,研究认为糖尿病视网膜病变的发生发展与高血糖引起的一系列生化改变及细胞增殖调控失常有关,许多研究表明氧化应激在糖尿病视网膜病变的发生发展中起重要作用[1,2]。高血糖作为应激原产生的活性氧,可以损伤组织引起细胞凋亡,造成视网膜破坏致不可逆性损伤,最后可产生一系列病理生理改变及临床表现[5]。

加强血糖控制可以降低和延缓糖尿病视网膜病变的发生发展,但是有许多患者并不能达到此目的。因此,通过抗氧化维持视网膜结构和功能的完整性阻止视网膜病变的发生发展可能更重要。本实验数据表明糖尿病大鼠视网膜 GSH 含量下降而脂质过氧化产物 MDA 含量增高,与以往的报道一致。许多研究表明抗氧化治疗在糖尿病视网膜病变发生发展中具有重要作用[6,7],然而,有的抗氧化剂不能起到降低血糖的作用[6],有的则不能降低脂质过氧化产物的含量[7]。本实验结果证实锌离子既能够降低糖尿病大鼠血糖和视网膜 MDA 水平,又能够提高视网膜 GSH 的含量,可能对阻止和延缓糖尿病视网膜病变的发生发展具有重要作用。实验说明 MDA 水平和血糖变化一致(表 1,3)。脂质是细胞膜重要组成部分,对维持细胞膜结构完整和功能正常起重要作用,氧化应激产生的自由基引起组织脂质过氧化产物增加使细胞结构和功能受损。模型组 STZ 对胰腺的直接破坏使其降血糖功能减低,因此可以使大鼠发生高血糖。氯化锌干预组视网膜 MDA 和血糖水平均比模型组低,锌离子可能是通过稳定细胞膜对抗脂质过氧化作用[8],另外锌离子有诱导金属硫蛋白合成的能力,金属硫蛋白可以有效清除氧自由基[9],减轻氧自由基对糖尿病大鼠视网膜的损伤,可以维持其结构的完整性和功能的正常性。

维持蛋白质还原状态是细胞发挥正常功能的前提,而蛋白质结构改变是糖尿病并发症发生的分子机理之一[10]。还原型谷胱甘肽是细胞内一种重要的非酶性抗氧化剂,它不仅可以稳定细胞膜,维持细胞的完整性、对抗活性氧对组织的损伤,而且还是谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽转硫酶等酶性抗氧化剂的底物。因此,细胞中 GSH 水平的高低可以反映组织受损程度或其抗氧化能力的大小。与正常组相比,模型组大鼠视网膜 GSH 水平明显降低,高血糖产生的氧自由基能够消耗视网膜 GSH 而使视网膜正常功能受损,容易发生视网膜病变。而干预组视网膜 GSH 水平比模型组高,其下降幅度也较低,锌离子主要通过稳定细胞膜和增加金属硫蛋白合成的能力从而减少视网膜 GSH 的消耗,增强其抗氧化能力。同样,STZ 对胰腺组织的直接损伤使胰腺 GSH 水平在模型组显著降低;血清胰岛素水平在处理后 48h 和 72h 降低,这是由于胰岛或胰腺细胞胰岛素合成功能受损;而在处理后 24h 高于正常组,可能是胰腺储存胰岛素释放的结果。干预组胰腺 GSH 和血清胰岛素水平均高于模型组,说明锌离子有保护胰腺的作用。

总之,研究表明锌离子对糖尿病大鼠视网膜有保护作用,锌离子不仅可以对抗氧自由基对视网膜的损伤,而且还通过对胰腺的保护作用间接降低血糖。

(下转第 851 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究确定,在报告基因 mRNA 转录体中,SARS - CoV 的 5 - 'UTR 第 56 位核苷酸是转录起始位点。该位点正好处于 SARS - CoV 5' - UTR RNA 的第二个茎环,所紧邻的下游序列"TAAAC-GAA",为文献[4,5]报道的、在冠状病毒中高度保守的"转录调控序列"(TRS)。

本研究证实,SARS - CoV 5' - UTR 在 SARS - CoV 复制调控中,应该起着很重要的作用。这为进一步研究 SARS - CoV 复制调控机理,提供了一定的理论基础。

参 考 文 献

[1] Frolov I, Hardy R, Rice CM. Cis - acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus - and plus - strand RNA synthesis [J]. RNA, 2001;7(11):1638 - 51

[2] Qi ZT, Kalkeri G, Hanible J, et al. Stem - loop structures II - IV of the 5' untranslated sequences are required for the expression of the full - length hepatitis C virus genome [J]. Arch Virol, 2003;148(3):449 - 467.

[3] Dumas E, Staedel C, Colombat M, et al. A promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5' UTR [J]. Nucleic Acids Res, 2003;31(4):1275 - 1281.

[4] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. N Engl J Med, 2003; 348(20):1953 - 1966.

[5] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The Genome sequence of the SARS - associated coronavirus [J]. Science, 2003;300(5624):1399 - 1404.

(上接第 842 页)

参 考 文 献

[1] Antonio C, Giuseppe P. Oxidative Stress and Diabetic Vascular Complications[J]. Diabetes care, 1996;19(3):257 - 267.

[2] Tatsuya K, Keiji I, George LK. Oxidative Stress: The Lead or Supporting Actor in the Pathogenesis of Diabetic Complications[J]. J Am Soc Nephrol, 2003; 14(8) Supplement 3: S216 - S220.

[3] Guoping Qing, Xuanchu Duan, Youqin Jiang. Induction of Heat Shock Protein 72 in RGCs of Rat Acute Glaucoma Model after Heat stress or zinc Administration[J]. Eye Sci, 2004;20(1):30 - 33,51.

[4] Prasad AS, Bao B, Beck FW, et al. Antioxdant effect of zinc in humans [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2004;37(8):1182 - 1190.

[5] Bonnefont - Rousselot. Dominique Glucose and reactive oxygen species[J]. Curr Opin Clin Nutrition & Metab Care, 2002;5(5):561 - 568.

[6] Kowlurn RA, Kennedy A. Therapeutic potential of anti - oxidants and diabetic retinopathy[J]. Opin Imostig Drugs, 2001; 10(9):1665 - 1676.

[7] Woollard AC, Baseal ZA, Armstrong GR. Abnormal redox status without increased lipid peroxidation in sugar cataract [J]. Diabetes, 1990; 39(11):1347 - 1352.

[8] Thomas JP, Bachowski GJ, Girotti AW. Inhibition of cell membrane lipidperoxidation by cadminium and zinc metallothionine[J]. Biochem Biophys Acta, 1986;884(3):448 - 461.

[9] Suntres ZE, Lui EMK. Biochemical mechanism of metallothionein - carbon tetrachloride interaction in vitro[J]. Biochem Pharmacol, 1990; 39(5): 833 - 840.

[10] Altomare E, Grattagliano I, Vendemaile G, et al. Oxidative protein damage in human diabetic eye. Evidenc of a retinal participation[J]. Eur JClin. Invest, 1997; 27(2):141 - 147.