

# 葡萄籽原花青素对Ⅱ型糖尿病大鼠视网膜病变的影响

李宇杰, 张召锋, 戴小倩, 丁 叶, 马小陶, 姜燕飞, 鲍 雷, 李 勇\*

(北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100191)

**摘 要:** 目的: 观察葡萄籽原花青素(GSPE)对Ⅱ型糖尿病大鼠视网膜病变的影响。方法: 雄性SD大鼠高脂饲料喂养4周后, 腹腔注射链脲佐菌素(STZ)造成糖尿病模型, 成模后随机分为糖尿病模型组和原花青素低、中、高剂量组; 以基础饲料喂养为正常对照组。原花青素低、中、高剂量组分别为125、250、500mg/(kg·d)(以体质量计), 通过每天灌胃水溶液的方式进行干预, 糖尿病模型组和正常对照组每天以蒸馏水灌胃。连续饲养16周后, 测定其体质量、空腹血糖、血清糖基化终末产物(AGEs)、细胞间黏附分子(ICAM-1)、血管间黏附分子(VCAM-1), 镜下观察视网膜的变化, 免疫组化法测定视网膜中糖基化终末产物受体(RAGE)的表达。结果: GSPE干预组血糖较糖尿病模型组有一定下降, 但无显著性差异( $P>0.05$ ); GSPE高剂量组可以有效降低血清中AGEs水平( $P<0.05$ ); GSPE各干预组可以有效降低血清中ICAM-1水平( $P<0.05$ ); GSPE低剂量和高剂量组可以有效降低血清中VCAM-1水平( $P<0.05$ ); 从组织学上, GSPE可以减轻视网膜损伤, 保持视网膜各层完整; GSPE能降低RAGE在视网膜中的表达。结论: 葡萄籽原花青素可以有效改善Ⅱ型糖尿病大鼠视网膜病变。

**关键词:** 葡萄籽原花青素; 糖尿病视网膜病变; 糖基化终末产物; 炎症因子

## Effect of Grape Seed Proanthocyanidin Extract (GSPE) on Type II Diabetic Retinopathy in Rats

LI Yu-jie, ZHANG Zhao-feng, DAI Xiao-qian, DING Ye, MA Xiao-tao, JIANG Yan-fei, BAO Lei, LI Yong\*

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China)

**Abstract:** Objective: To investigate the effect of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) on type II diabetic retinopathy in rats. Methods: To establish type II diabetic rat models, male SD rats fed high fat diet for 4 weeks were injected with streptozotocin (STZ, 0.01 mol/L, 30 mg/(kg·d)). The diabetic rats were randomly divided into diabetes-vehicle group (DM control group), three GSPE-treated groups. Normal rats were enrolled as normal control group. The low, medium and high-dose GSPE-treated groups were administrated at 125, 250 mg/(kg·d) and 500 mg/(kg·d), respectively. DM control group and normal control group were given equal volume of distilled water. After 16 weeks, body weight, fasting plasma glucose (FPG), advanced glycation endproducts (AGEs), ICAM-1 and VCAM-1 were measured. HE stain retina paraffin section was examined under a microscope. Receptor for RAGEs was detected by SP immunohistochemical method. Results: There was no difference ( $P > 0.05$ ) between DM control group and GSPE-treated groups. Compared with DM control group, AGEs in GSPE high dose group were decreased ( $P < 0.05$ ), ICAM-1 (all GSPE-treated groups) and VCAM-1 (GSPE low and high dose groups) were decreased ( $P < 0.05$ ). The retina of GSPE-treated groups had fewer damaged areas and lower RAGE expression in histology. Conclusion: GSPE has a positive effect on type II diabetic retinopathy in rats.

**Key words:** grape seed proanthocyanidin extract (GSPE); diabetic retinopathy (DR); advanced glycation endproducts (AGEs); inflammatory factor

中图分类号: 151.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0245-05

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种常见的糖尿病慢性微血管并发症, 也是糖尿病患者致盲的重要原因。大约一半的糖尿病患者在患病5~10年后会

发生眼底病变, 15年后则高达75%~80%, 其中有严重危害性的DR占25%<sup>[1]</sup>。DR的病理基础是视网膜血管微血栓和血管异常增生, 糖基化终末产物(advanced glycation

收稿日期: 2012-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(81072293)

作者简介: 李宇杰(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为营养与疾病。E-mail: liyujie@bjmu.edu.cn

\*通信作者: 李勇(1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向为营养与疾病。E-mail: liyong@bjmu.edu.cn

endproducts, AGEs)在糖尿病视网膜病变中起到关键作用。AGEs与糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation endproducts, RAGE)结合后引起氧化应激,激活并调控以NF- $\kappa$ B为核心的炎症因子网络,其中细胞间黏附分子(ICAM-1)和血管间黏附分子(VCAM-1)黏附分子的表达,对DR的发生发展有着重要的影响。

葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidins extracts, GSPE)是一种有特殊分子结构的生物类黄酮物质,其含有大量的活性酚羟基,是目前国际上公认的清除自由基最有效的天然抗氧化剂<sup>[2]</sup>。近年来大量研究发现,GSPE具有抗氧化、抗炎、抑制AGEs形成的生物活性<sup>[3]</sup>。Pinent等<sup>[4]</sup>在对STZ诱导糖尿病大鼠的研究中发现,GSPE可以延缓葡萄糖在肠道内的吸收起到降血糖的作用,马亚兵等<sup>[5]</sup>通过测定糖尿病大鼠的血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)发现,GSPE具有降低糖尿病大鼠体内氧化应激水平的作用。有实验证实GSPE能降低糖尿病大鼠尿蛋白,改善肾小球高滤状态,对糖尿病肾病具有明确的治疗作用<sup>[6]</sup>。DR与糖尿病、肾病都是以微血管病变为病理基础,但是GSPE对DR影响相关的文献报道较少。本实验以高脂饲料喂养+链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导造成II型糖尿病大鼠模型,从AGEs-RAGE及其激活的炎症因子角度研究GSPE对II型糖尿病大鼠视网膜病变的影响,并探讨其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

80只清洁级雄性SD大鼠,6周龄,体质量200~250g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。饲养地点为北京大学医学部实验动物科学部,饲养环境为屏障级,室温恒定21~25℃,相对湿度40%~50%,节律光照,动物每两只1笼饲养,自由饮水和摄食。

### 1.2 材料与试剂

高脂饲料的配方:66%基础饲料、15%猪油、10%蔗糖、6%酪蛋白、3%蛋黄,购自北京科奥协力饲料有限公司;葡萄籽原花青素(纯度95%,HPLC级,其中二聚体56%、三聚体12%、四聚体6.6%、单体和其他大分子质量寡聚体20.4%),购自天津市尖峰天然产物研究开发有限公司。

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 美国Sigma公司;大鼠血清AGEs、ICAM-1、VCAM-1酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒、免疫组化试剂盒 北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗大鼠RAGE、VEGF抗体 美国Santa Cruz公司。

### 1.3 仪器与设备

AU400全自动生化分析仪 日本Olympus公司;

DFM-96型放射免疫 $\gamma$ 计数器 合肥众成机电技术开发有限公司;快速血糖仪及试纸 美国强生公司;电子精密天平(110g/1mg和110g/0.1mg) 美国Ohaus公司;Adventurer™通用型分析天平 美国Adventurer公司;高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司;普通台式离心机 上海安亭科学仪器厂;数显电热恒温水箱 上海跃进医疗器械厂;生物显微镜 日本尼康公司;Bio-Rad550型酶联免疫检测仪 美国Bio-Rad公司;冰箱 海尔集团;-80℃低温冰箱 日本Sanyo公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 II型糖尿病大鼠模型的建立

大鼠饲以适应性喂养1周,随机分为正常对照组(12只)和糖尿病(DM)造模组(68只)。造模组经高脂饲料喂养4周后,腹腔注射STZ(0.01mol/L pH4.5柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液配制,30mg/kg(以体质量计)),每周1次,共注射2次。每周用微量血糖仪监测空腹血糖,4周后空腹血糖达到11.1mmol/L以上者确定为糖尿病,并稳定7d。另12只大鼠饲以基础饲料喂养。

#### 1.4.2 动物分组及给药

将造模成功的糖尿病大鼠随机分为4组:DM模型组及GSPE低、中、高剂量组,每组各12只。正常对照组为12只。GSPE低、中、高剂量组通过每天灌胃水溶液的方式进行干预,灌胃剂量分别为125、250、500mg/(kg·d)(以体质量计);DM模型组和正常对照组每日灌胃蒸馏水。将开始给药记为第0周,连续饲养16周。

### 1.5 标本采集

实验期间,每周观察各组大鼠的一般情况,包括毛色、精神状态、摄食、饮水、尿量、体质量及日常活动等。于第16周经股动脉采血后处死全部大鼠,提取血清-20℃贮存待测。处死大鼠后迅速取下双侧眼球,4%多聚甲醛固定48h,固定2h后眼前节开窗注入固定液。将固定完成后的眼球去除角膜、晶状体和玻璃体,仅留视杯。石蜡包埋,沿眼球矢状面垂直固定,4 $\mu$ m连续做视网膜纵切片。

### 1.6 指标测定

#### 1.6.1 血清炎症指标测定

AGEs、ICAM-1、VCAM-1参照试剂盒说明书用酶联免疫吸附法(ELISA)测定。

#### 1.6.2 视网膜切片苏木精和伊红(HE)染色

视网膜石蜡切片脱蜡后,常规苏木精和伊红染色,脱水并用二甲苯透明,中性树胶封片。镜下观察视网膜组织学形态,并拍照。

#### 1.6.3 视网膜RAGE免疫组织化学染色

免疫组织化学染色采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(S-P法),操作步骤如下:切片常规脱蜡,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每次3min。将切片浸泡

于枸橼酸钠缓冲液中,置于高压锅中121kPa高压3min,自然冷却至室温,以达到修复抗原的目的。取出切片,滴加3%  $H_2O_2$  去离子水,阻断内源性过氧化物酶,常温孵育30min, PBS冲洗后滴加山羊血清封闭,室温孵育30min。弃去山羊血清后滴加一抗于切片上,4℃过夜孵育,取出时复温。PBS冲洗后再滴加生物素标记的二抗,37℃孵育30min。PBS冲洗后滴加链霉素亲和素-过氧化物酶,37℃孵育30min, PBS冲洗。滴加DAB显色液,镜下观察染色充分后,用自来水将切片冲洗干净。最后用Mayer苏木精复染,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在镜下观察阳性染色,并拍照。

### 1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0统计软件,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠一般情况

实验期间正常对照组大鼠行动活跃,饮食正常,毛色光滑,无多饮、多食、多尿现象,体质量增长明显。DM模型组大鼠行动较缓慢,多饮、多食、多尿现象明显,体型消瘦,出现典型的“三多一少”症状,毛色枯黄。GSPE干预组症状较DM模型组有所缓解。

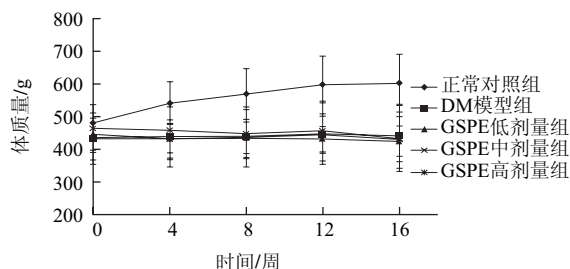


图1 体质量随时间的变化

Fig.1 Change in body weight of rats

从干预第0周至第16周各组的体质量变化如图1所示。干预第0周各组体质量均无显著性差异;实验期间直至第16周正常对照组大鼠体质量稳定增长,DM模型组和GSPE各干预组体质量增长缓慢甚至下降,较正常对照组大鼠明显偏瘦,并有显著性差异( $P < 0.05$ ),GSPE干预组与DM模型组体质量无显著性差异。

如表1所示,第0周DM模型组与GSPE各干预组血糖无显著性差异,与正常对照组有显著性差异( $P < 0.05$ ),造模成功。第16周DM模型组、GSPE干预组血糖均高于正常对照组,且有显著性差异( $P < 0.05$ );GSPE各干预组与DM模型组相比血糖均有所下降,但无显著性差异。

表1 第0周、16周空腹血糖值( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

Table 1 FPG of rats at 0 and 16 weeks after GSPE administration ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

组别	血糖含量/(mmol/L)	
	0周	16周
正常对照组	5.81 ± 1.13	6.80 ± 1.66
DM模型组	15.98 ± 2.41*	22.20 ± 5.35*
GSPE低剂量组	15.90 ± 2.94*	18.73 ± 5.36*
GSPE中剂量组	15.97 ± 2.23*	18.20 ± 4.26*
GSPE高剂量组	15.23 ± 2.15*	20.93 ± 6.59*

注:\*.与正常对照组相比,有显著性差异( $P < 0.05$ )。下同。

### 2.2 血清中AGEs、ICAM-1、VCAM-1水平

表2 血清中AGEs、ICAM-1、VCAM-1含量( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

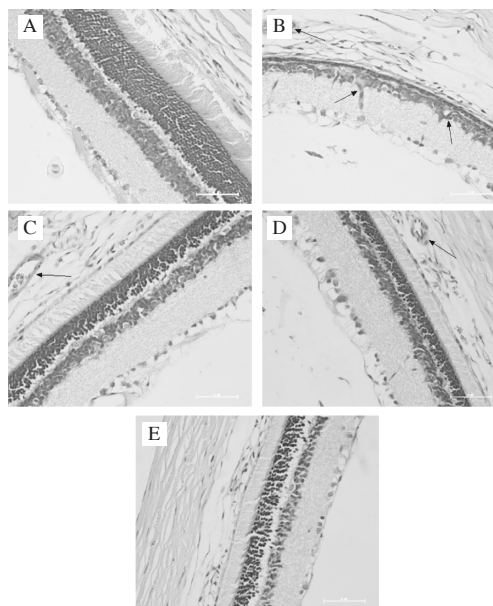
Table 2 AGEs, ICAM-1 and VCAM-1 in the serum of rats( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

组别	AGEs含量/(ng/L)	ICAM-1含量/(ng/L)	VCAM-1含量/(μg/L)
正常对照组	1094.02 ± 54.05	472.61 ± 36.19	235.80 ± 37.93
DM模型组	1361.53 ± 325.55*	589.26 ± 52.27*	314.28 ± 39.47*
GSPE低剂量组	1310.77 ± 71.85	477.49 ± 34.03 <sup>#</sup>	260.23 ± 21.85 <sup>#</sup>
GSPE中剂量组	1250.87 ± 55.76	507.03 ± 52.23 <sup>#</sup>	295.29 ± 29.22
GSPE高剂量组	1138.18 ± 103.44 <sup>#</sup>	474.56 ± 27.82 <sup>#</sup>	236.15 ± 28.01 <sup>#</sup>

注:\*.与DM模型组相比,有显著性差异( $P < 0.05$ )。

如表2所示,DM模型组血清中AGEs比正常对照组明显升高( $P < 0.05$ ),GSPE各剂量组比DM模型组有所降低,高剂量组显著降低( $P < 0.05$ );正常对照组ICAM-1与DM模型组有显著性差异( $P < 0.05$ ),GSPE各剂量组比DM模型组低,且均具有显著性差异( $P < 0.05$ );正常对照组VCAM-1与DM模型组有显著性差异( $P < 0.05$ ),GSPE低剂量组和高剂量组与DM模型组相比,显著降低( $P < 0.05$ )。

### 2.3 视网膜组织学改变



A. 正常对照组; B. DM模型组; C. GSPE低剂量组; D. GSPE中剂量组; E. GSPE高剂量组。图3同。

图2 HE染色视网膜切片(×400)

Fig.2 HE stain of retina paraffin section(×400)



HE染色切片在光学显微镜下观察,正常对照组大鼠视网膜各层细胞层次分明,细胞结构紧密,排列整齐(图2A)。DM组大鼠视网膜细胞排列紊乱、结构疏松,厚度明显变薄,尤其是外核层明显薄于正常对照组,细胞出现空泡、水肿等病理改变,在脉络膜层可见到增厚肥大的动脉壁(图2B)。GSPE干预组病变较DM组轻,外核层细胞厚度比DM组明显增厚,但仍薄于正常组。在低、中剂量组可见个别空泡细胞(图2C、D),动脉壁较DM组薄。高剂量组(图2E)视网膜各层结构完整,未见增厚的动脉壁。

#### 2.4 视网膜RAGE表达

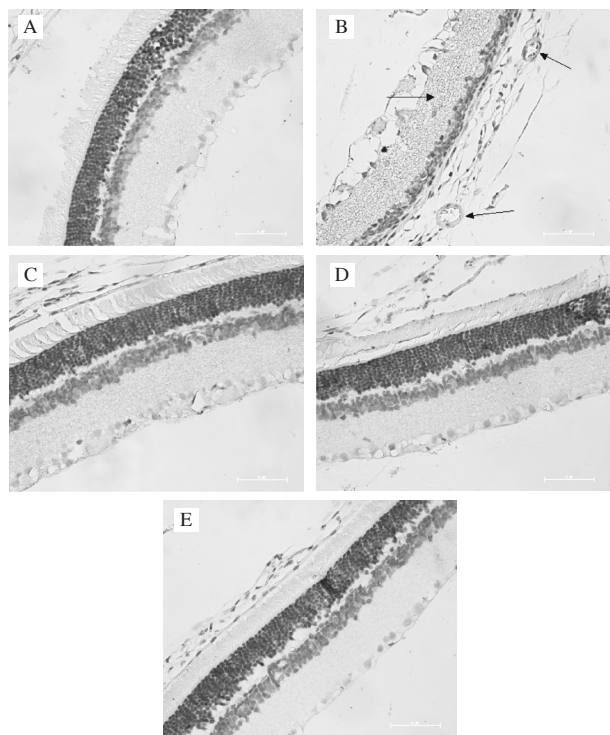


图3 视网膜切片RAGE免疫组化染色和苏木精染核(×400)

Fig.3 Immunohistochemical staining of RAGE in the retina of rats and hematoxylin staining of cell nuclei(×400)

由图3可见,光学显微镜下观察(400倍),在正常对照组的外网层、内网层和节细胞层仅有微量RAGE表达;DM模型组可以见到大量阳性表达,在微动脉壁也可以看到阳性表达。GSPE干预组的阳性表达部位与DM模型组相同,但阳性反应较弱,其中GSPE高剂量组的RAGE阳性表达最弱,与正常对照组相近。

### 3 讨论

DR的病理改变是一个渐进的、有序的过程,早期是以血管通透性增高为特征的轻微增殖异常。血清中的炎症因子可以透过损伤的血-视网膜屏障从而发挥病理作用,导致DR发展到以血管闭塞为特征的中度和严重非增

生性糖尿病视网膜病变,最终出现视网膜和玻璃体内新生血管形成和广泛纤维增殖为特征的增生性糖尿病视网膜病变。近年的研究发现许多炎症因子与DR的发生、发展密切相关<sup>[7]</sup>,提出DR是一种慢性炎症疾病。

糖尿病的长期高血糖状态可促使体内蛋白质的非酶糖基化,使AGEs大量生成,并促进其受体RAGE的高表达,最终AGEs-RAGE激活以NF- $\kappa$ B为核心的炎症因子网络。AGEs在微血管内皮细胞、周细胞沉积,一方面促进氧化应激,产生诱生性NO及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),损伤细胞,破坏血-视网膜屏障;另一方面AGEs在基底膜局部沉积使基底膜变厚,毛细血管腔变窄,引起血管硬化闭塞。本实验发现GSPE干预组具有一定的降血糖作用趋势,但没有统计学差异,这与周雁等<sup>[8]</sup>的研究结果相同;GSPE干预组可以降低血清中AGEs,其中高剂量组(500mg/(kg·d))能够显著降低糖尿病大鼠血清中的AGEs。由于GSPE对血糖影响较小,所以它可能是通过其他方式抑制AGEs形成。有研究表明,自由基与AGEs形成密切相关,抑制自由基能减少AGEs的生成<sup>[9]</sup>。GSPE由于其强大的抗氧化作用可以抑制体内自由基的生成,从而抑制高糖介导的非酶促糖基化反应,推测这是GSPE能够减少AGEs生成的机理。

黏附分子是AGE与RAGE结合激活并上调的重要炎症因子,近年来大量研究发现DR患者视网膜内白细胞黏附增多,白细胞对于视网膜血管内皮的黏附导致血-视网膜屏障的破坏,内皮损伤,毛细血管无灌注,新生血管形成等。Mohr<sup>[10]</sup>观察到糖尿病人外周血中ICAM-1、VCAM-1、CD11、CD18较非糖尿病人明显升高,并且有研究报道ICAM-1的基因多态性与II型糖尿病患者DR相关<sup>[11]</sup>。Miyamoto等<sup>[12]</sup>研究发现STZ诱导的糖尿病大鼠模型视网膜内白细胞的渗出、浸润与ICAM-1的增加有关,ICAM-1阻滞剂可减少糖尿病大鼠视网膜内白细胞黏附及血管渗透。本实验发现GSPE可以显著降低ICAM-1和VCAM-1的水平,与Ma等<sup>[13]</sup>研究结果相同,提示GSPE可以有效减轻白细胞的黏附,减缓视网膜病变。本实验进一步的病理组织学检查发现GSPE干预组可以增加视网膜外核层的厚度,改善细胞损伤,保持视网膜各层细胞的完整性,其中高剂量组(500mg/(kg·d))最为完整。通过免疫组化发现GSPE可以减少RAGE在视网膜的表达,其中高剂量组RAGE阳性表达最少,几乎达到正常对照组的水平。视网膜中RAGE的减少,可以减轻机体高AGEs的危害,相应减轻AGEs和RAGE结合后产生的氧化应激和细胞损伤。

GSPE由于含有大量酚羟基,对超氧阴离子自由基、羟自由基及过氧化自由基具有显著的清除能力,其抗氧化能力是VC的20倍、VE的50倍<sup>[2]</sup>。本实验证实了GSPE可以有效降低II型糖尿病大鼠血清AGEs、ICAM-1、

VCAM-1, 减轻视网膜损伤, 可以有效缓解糖尿病视网膜病变, 以高剂量组(500mg/(kg·d))最为有效。糖尿病视网膜病变是Ⅱ型糖尿病最严重的一种慢性并发症, 患者长期服药所带来的肝肾功能损伤和不良反应不容忽视, GSPE作为一种植物化学物, 具有食物来源广泛、高效、低毒、生物利用率高的特点<sup>[14]</sup>, 其在Ⅱ型糖尿病视网膜病变的防治上有着广阔的发展前景。

#### 参考文献:

- [1] BHADURI G, BANDYOPADHYAY M. Challenges to confront diabetic retinopathy and retinopathy of prematurity[J]. Journal of the Indian Medical Association, 2005, 103(7): 363-366.
- [2] BAGCHI D, BAGCHI M, STOHS S J, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention[J]. Toxicology, 2000, 148(2/3): 187-197.
- [3] ELALFY A T, AHMED A A, FATAN I A J, et al. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats[J]. Pharmacol Res, 2005, 52(3): 264-270.
- [4] PINENT M, BLAY M, BLADE M, et al. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines[J]. Endocrinology, 2004, 145(11): 4985-4990.
- [5] 马亚兵, 高海青, 周雁, 等. 葡萄籽原花青素降低糖尿病大鼠氧化应激的作用[J]. 营养学报, 2005, 27(2): 173-174.
- [6] LI X H, XU L, GAO H Q, et al. Effects of grape seed proanthocyanidins extracts on AGEs and expression of bone morphogenetic protein-7 in diabetic rats[J]. J Nephrol, 2008, 21(5): 722-733.
- [7] van HECKE M, DEKKER J, NIJPELS G, et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the hoorn study[J]. Diabetologia, 2005, 48(7): 1300-1306.
- [8] 周雁, 马亚兵, 高海青, 等. 葡萄籽多酚抗糖尿病大鼠非酶糖基化实验研究[J]. 中华老年医学杂志, 2005, 24(1): 49-52.
- [9] SAJITHLAL G, CHITHRA P, CHANDRAKASAN G. The role of metal-catalyzed oxidation in the formation of advanced glycation end products: an *in vitro* study on collagen[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1998, 25(3): 265-269.
- [10] MOHR S. Potential new strategies to prevent the development of diabetic retinopathy[J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2004, 13(3): 189-198.
- [11] BEN-MAHMUD B M, MANN G E, DATTI A, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in diabetic plasma increases the activity of core 2 GlcNAc-T and adherence of human leukocytes to retinal endothelial cells[J]. Diabetes, 2004, 53(11): 2968-2976.
- [12] MIYAMOTO K, KHOSROF S, BURSELL S E, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(19): 10836-10841.
- [13] MA L, GAO H, LI B, et al. Grape seed proanthocyanidin extracts inhibit vascular cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products through activation of peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2007, 49(5): 293-298.
- [14] PRIOR R L, GU L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet[J]. Phytochemistry, 2005, 66(18): 2264-2280.