

辣椒辣素对糖尿病大鼠模型视网膜血管通透性的影响

刘扣¹,高翔¹,陈可洋²,蒋正轩¹

摘要 目的 探讨辣椒辣素对糖尿病大鼠(DM)视网膜血管通透性及新生血管的影响。方法 选取8周龄雄性SD大鼠24只,随机分为4组($n=6$):正常对照组(NC)、糖尿病组(DM)、糖尿病3 mg/kg 辣椒辣素处理组(CAP3)、糖尿病6 mg/kg 辣椒辣素处理组(CAP6)。3组糖尿病组大鼠均采用高脂饲料(HFD)+小剂量链脲佐菌素(STZ)联合诱导,建立2型糖尿病大鼠(T2DM)模型。监测4组大鼠体质量和空腹血糖。检测血清中总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)浓度;伊文思蓝造影观察视网膜血管通透性改变;免疫荧光检测视网膜辣椒辣素受体1(TRPV1)分布;Western blot检测视网膜TRPV1、血管内皮生长因子(VEGF)、闭锁蛋白(occludin)水平。结果 与DM组相比,生化指标提示CAP3、CAP6组大鼠血清中TC、TG、LDL浓度降低($P<0.01$);造影结果提示DM组大鼠视网膜血管通透性增高,存在多处强荧光渗漏区域,CAP3、CAP6处理组渗漏减轻;免疫荧光显示,CAP3、CAP6组视网膜神经节细胞层、内核层及外核层TRPV1激活;蛋白检测提示视网膜TRPV1升高,VEGF表达下降,occludin表达上升($P<0.01$)。结论 辣椒辣素具有改善糖尿病视网膜病变作用,其机制可能是通过激活视网膜TRPV1受体,降低VEGF、升高occludin的表达。

关键词 糖尿病视网膜病变;黄斑水肿;辣椒辣素;闭锁蛋白
中图分类号 R 774.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0855-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.003

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的微血管并发症之一。长期高血糖会引起视网膜血管系统的病理和功能改变,严重危害劳动年龄人的视力^[1]。其中,糖尿病黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)的发生率随着DR的进展逐渐增加,IV期时可达70%^[2]。DME的发生与糖尿病视网膜血管的通透性异常增高息息相关。研

究^[3]表明,辣椒辣素可以有效抑制血管通透性增加以及新生血管。张廷等^[4]提出辣椒辣素能通过增强视网膜内源性降钙素基因相关肽的表达,在一定程度上抑制糖尿病大鼠视网膜细胞的凋亡。但辣椒辣素抑制血管通透性增高的特性是否能在视网膜中发挥作用尚不清楚。

该研究采用辣椒辣素干预DR模型大鼠,采集大鼠血清相关因子、视网膜血管造影、免疫荧光等数据,并检测视网膜中辣椒辣素受体蛋白(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、闭锁蛋白(occludin)浓度进一步探讨其作用的潜在机制,为明确辣椒辣素的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 辣椒辣素(上海Aladdin公司);血糖仪、血糖试纸(美国罗氏公司);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司);兔Anti-TRPV1抗体(英国abcam公司)、兔Anti-VEGF抗体(成都正能生物有限公司)、兔Anti-occludin(美国Novus公司);伊文思蓝染料(北京索莱宝生物科技有限公司);凝胶扫描成像系统Fine-do X6显影仪(上海天能科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)检测试剂盒(南京建城生物工程研究所);其余常见试剂和耗材均来自安徽医科大学卫生检验与检疫学系教研室。

1.2 实验动物造模及干预 选取8周龄雄性SD大鼠^[5]24只,体质量均为200 g左右(购自安徽医科大学实验动物中心)。适应性喂养1周,动物饲养间环境为12 h/12 h的昼夜节律,相对温度为(23 ± 2)℃,相对湿度为(50 ± 5)%。随机选取6只大鼠作为正常对照组(NC组),实验期间给予普通饲料喂养;其余18只大鼠作为糖尿病组先给予HFD喂养4周后,给予禁食16 h处理。将禁食后大鼠按35 mg/kg的剂量腹腔注射配置好的STZ溶液

2022-03-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82070986)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院眼科,合肥 230601

²安徽医科大学卫生检验与检疫教研室,合肥 230032

作者简介:刘扣,女,硕士研究生;

蒋正轩,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:jiang-zhengxuan@ahmu.edu.cn

(STZ 粉剂溶于 1% 的枸橼酸溶液配成浓度为 0.1 mol/L 缓冲液)。注射 72 h 后测空腹血糖值 ≥ 11.1 mmol/L 的大鼠确定为糖尿病模型。糖尿病模型大鼠随机分为糖尿病对照组(DM)6 只、糖尿病 3 mg/kg 辣椒辣素处理组(CAP3)6 只、糖尿病 6 mg/kg 辣椒辣素处理组(CAP6)6 只。DM 组大鼠和 CAP3、CAP6 组大鼠分别采用 DMSO 和 2 种浓度辣椒辣素灌胃干预。每周 1 次检测大鼠体质量、空腹血糖(禁食 8 h)。大鼠饲养笼每天更换 2 次垫料,保证环境干燥。整个实验周期共 8 周。

1.3 实验动物干预后取材 辣椒辣素灌胃处理 8 周后取材。实验大鼠安乐死,留取腹主动脉血,生理盐水反复灌洗脏器清除残余全血后摘取双眼眼球, -80°C 或经组织固定液 4°C 固定保存。大鼠眼球摘取后立即使用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净,在解剖显微镜下经角巩膜缘间平行于赤道方向剪开,仔细去除眼前节和玻璃体,冰上钝性分离视网膜,储存在 1.5 ml EP 管中,液氮速冻 10 min,于 -80°C 保存。该研究经安徽医科大学动物伦理委员会批准,按照安徽医科大学动物实验规范进行。

1.4 血清 TC、TG、HDL、LDL 浓度检测 收集的全血静置分层后,经 3 000 r/min、 4°C 离心 15 min,取上层血清 -20°C 保存。按 TC、TG、HDL、LDL 生化检测试剂盒标准检测浓度。

1.5 视网膜伊文思蓝造影 固定深度麻醉的大鼠,经颈内静脉缓慢注射 0.5 ml 加热至 37°C 的伊文思蓝溶液,见大鼠通体逐渐变为蓝色。循环 20 min 后将大鼠安乐死,摘取眼球立刻置于 PBS 中清洗,避光条件下分离视网膜,并展开在载玻片上,晾干、封片。暗室中,倒置荧光显微镜下采图。

1.6 视网膜免疫荧光 将 4% 多聚甲醛固定的眼球清洗、脱水、石蜡包埋等处理后,按 $5\text{ }\mu\text{m}$ 厚度切片并固定于载玻片上。通过脱蜡复水、抗原修复、BSA 封闭、荧光抗体孵育、甘油封片等制成免疫荧光切片,置于荧光显微镜下立即观察、采图。

1.7 视网膜 TRPV1、VEGF、occludin 蛋白水平检测 称取 30 mg 大鼠视网膜组织,经充分裂解匀浆后离心取上清液,BCA 法蛋白定量,变性后于 -20°C 保存。经凝胶电泳分离目的蛋白,恒流转膜,脱脂牛奶封闭,一抗(Anti-TRPV1、Anti-VEGF、Anti-occludin) 4°C 孵育 12~16 h,二抗室温孵育 30~60 min。将承载目的蛋白的纤维素膜均匀滴加显影液,置于显影仪中拍摄保存。显影结果进行灰度扫描,统计分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示组间差异有统计学意义。作图软件采用 GraphPad Prism 8.0。

2 结果

2.1 辣椒辣素对大鼠体质量和血糖的影响 与 NC 组相比,DM 组大鼠在实验第 1 周开始体质量降低。与 DM 组大鼠相比,CAP3、CAP6 大鼠体质量增加,差异有统计学意义($F = 14.83, P < 0.01$)。CAP3 与 CAP6 处理组间体质量有数值差距,但差异无统计学意义(图 1A)。与 NC 组相比,3 组糖尿病大鼠血糖升高($F = 123.8, P < 0.01$)。整个实验周期,DM、CAP3、CAP6 组间血糖值差异无统计学意义(图 1B)。

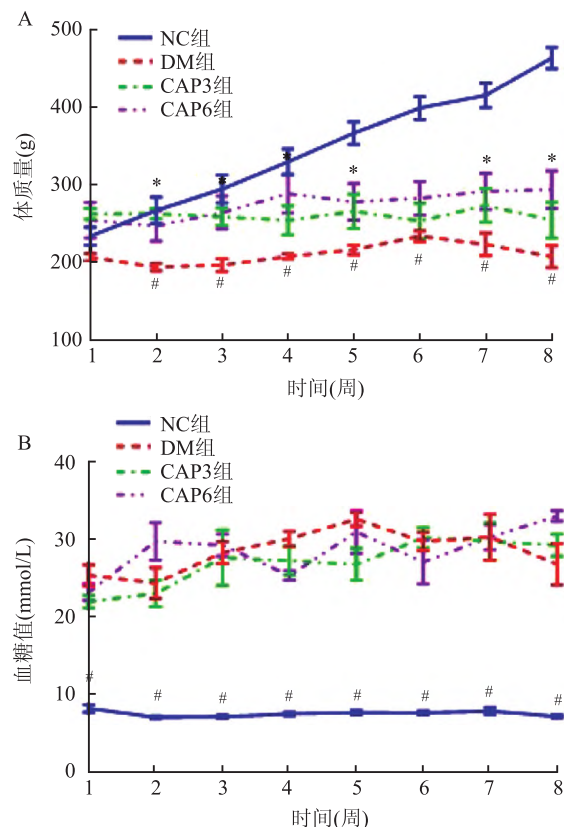


图1 大鼠体质量及空腹血糖值

A: 大鼠体质量; B: 大鼠空腹血糖; $n = 6$; 与 DM 组比较: * $P < 0.05$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$

2.2 辣椒辣素对血管通透性的影响 DM 组大鼠视网膜血管通透性较 NC 组大鼠升高,渗漏明显,辣椒辣素对视网膜血管通透性有改善作用。伊文思蓝眼底造影显示(标尺: $50\text{ }\mu\text{m}$),NC 组大鼠的视网膜

血管走行规则、清晰,无明显的血管渗漏,见图 2A;DM 组大鼠视网膜血管形态模糊不清,有多处明显强荧光区域,提示血管渗漏显著(白色箭头),见图 2B;CAP3 组大鼠视网膜血管可见微小血管形态迂曲,主要血管有较明显的强荧光,但较 DM 组荧光强度降低,提示血管渗漏减轻,见图 2C。CAP6 组大鼠视网膜血管走行接近 NC 组,血管荧光强度较 DM 组降低,但与 CAP3 组差异无统计学意义,见图 2D。

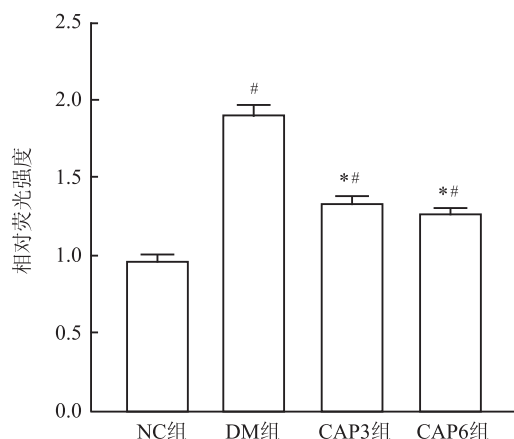
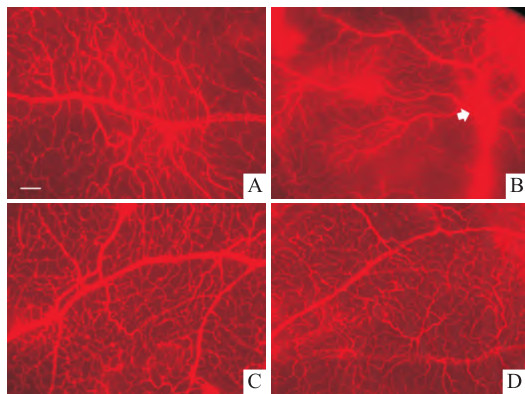


图2 视网膜组织伊文思蓝血管造影 ×100

A: NC 组大鼠视网膜血管; B: DM 组大鼠视网膜血管; C: CAP3 组大鼠视网膜血管; D: CAP6 组大鼠视网膜血管; $n=3$; 与 DM 组比较: * $P<0.05$; 与 NC 组比较: $^{\#}P<0.05$

2.3 辣椒辣素对糖尿病大鼠血脂的影响 分别检测 4 组大鼠血清中 TC、TG、LDL、HDL 浓度。与 NC 组相比,DM 组 TC 浓度升高,CAP3、CAP6 处理组渐次降低该数值,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。且 CAP6 组 TC 浓度接近 NC 组正常值。检测大鼠血清中 TG 浓度,与 NC 组相比,DM 组 TG 浓度升高,CAP3、CAP6 处理组均显示 TG 浓度降低至正常值,两处理组差异无统计学意义。糖尿病大鼠 LDL 导致视网膜脂质沉积。与 DM 组相比,可见 CAP3 组 LDL 浓度降低,CAP6 组 LDL 浓度低于 NC 组,但并

非提示不良反应。与 NC 组相比,其余 3 组均表现 HDL 下降,CAP 处理组未显示改善作用(表 1)。

表1 血清 TC、TG、LDL、HDL 含量 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	TC	TG	LDL	HDL
NC	2.02 ± 0.24	1.67 ± 0.47	2.08 ± 0.13	2.13 ± 0.15
DM	2.65 ± 0.23 [#]	3.21 ± 0.99 [#]	3.40 ± 0.77 [#]	1.38 ± 0.15 [#]
CAP3	2.25 ± 0.18 ^{*#}	1.42 ± 0.70 [*]	2.30 ± 0.69 [*]	1.29 ± 0.19 [#]
CAP6	2.13 ± 0.14 ^{*&}	1.31 ± 0.51 [*]	1.54 ± 0.36 ^{*#&}	1.30 ± 0.13 [#]
F 值	9.170	9.622	10.550	33.490
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与 DM 组比较: * $P<0.05$; 与 NC 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与 CAP3 组比较: $^{\&}P<0.05$

2.4 辣椒辣素对视网膜 TRPV1、VEGF、occludin 的影响 大鼠视网膜组织免疫荧光(标尺:50 μm)显示,与未接受辣椒辣素处理组(NC、DM)相比,CAP3、CAP6 处理组 TRPV1 具有较高荧光强度,差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3A);检测视网膜蛋白提示,CAP3、CAP6 组大鼠视网膜 TRPV1 含量较 NC、DM 组升高(图 3B),结果表明辣椒辣素可促进视网膜中 TRPV1 的表达。此外经辣椒辣素干预后,与 DM 组相比,CAP3、CAP6 处理组视网膜 VEGF 蛋白浓度降低,occludin 蛋白浓度升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);其中,CAP6 处理组较 CAP3 处理组视网膜 VEGF 更接近 NC 组(图 3C、D)。由此可见,辣椒辣素在视网膜组织中参与调节血管通透性关联蛋白 VEGF 与 occludin 的表达。

3 讨论

DR 随着糖尿病发生率的升高已经成为严重的眼科常见病。高血糖可导致组织缺血低氧、氧化应激和炎症反应,造成视网膜内皮细胞损伤、细胞间连接蛋白减少,最终引起 DR^[6]。血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)的破坏是 DR 的特征性病理改变,可引起血管通透性增加和新生血管形成。

辣椒辣素是 TRPV1(又称瞬时受体电位香草酸亚型 1)的激动剂,是存在于辣椒果实中的香草酰胺类生物碱。研究^[7]表明,辣椒辣素能促进胆固醇在肝脏中分解代谢,改善高脂血症大鼠血清脂质含量,降低 TC、TG、LDL 浓度,甚至能有效降低高脂血症大鼠体质量。此外,辣椒辣素能够显著抑制外源性 VEGF 诱导的内皮细胞血管渗漏、血管形成^[3],其机制可能是辣椒辣素通过抑制血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)的磷酸化来抑制 VEGF 诱导的血管通透性增高。该实验中,辣椒辣素处理组体质量较

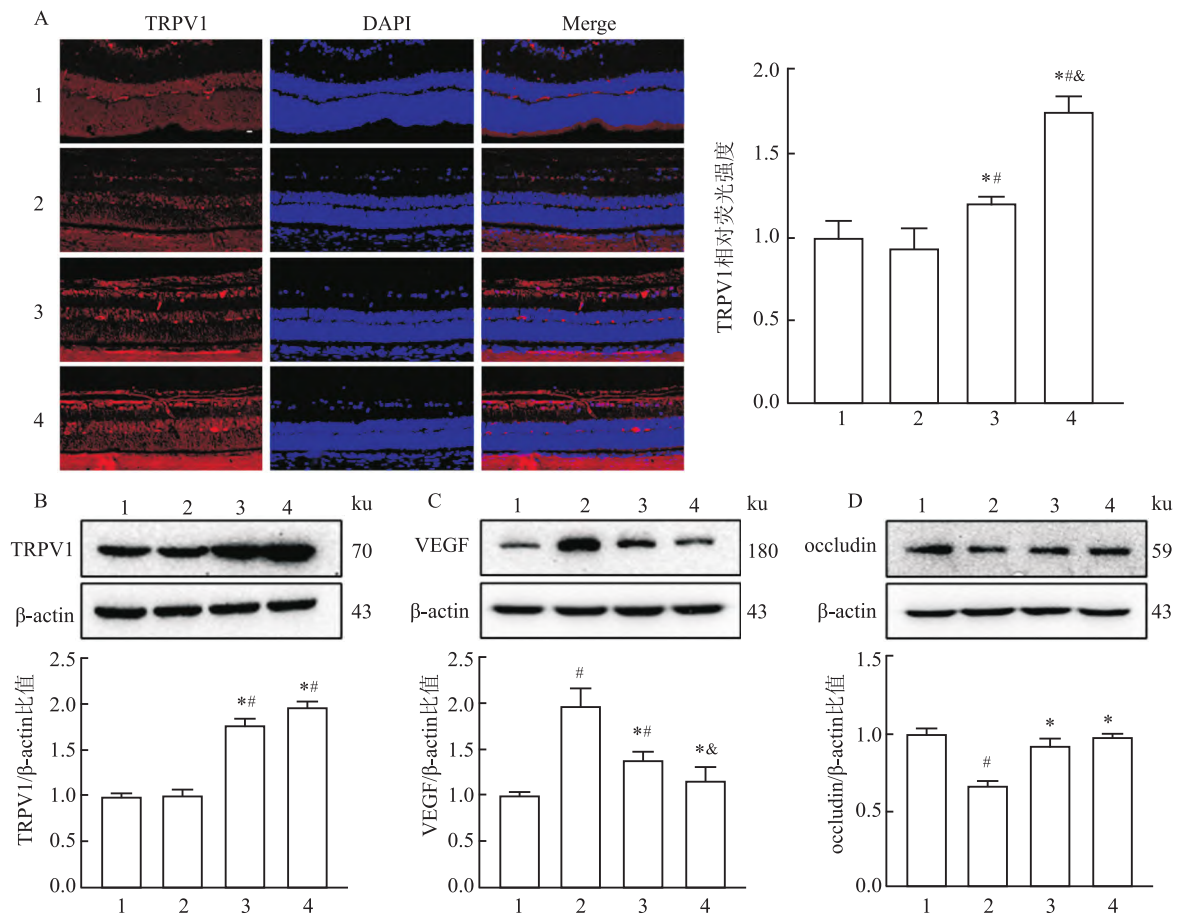


图3 视网膜 TRPV1 受体分布、occludin、VEGF 蛋白水平

A: 免疫荧光检测视网膜 TRPV1 表达量; 红色荧光: TRPV1; 蓝色荧光: DAPI; B: TRPV1/β-actin 比值; C: VEGF/β-actin 比值; D: occludin/β-actin 比值; $n=3$; 1: NC 组; 2: DM 组; 3: CAP3 组; 4: CAP6 组; 与 DM 组比较: * $P<0.05$; 与 NC 组比较: # $P<0.05$; 与 CAP3 组比较: & $P<0.05$

DM 组增加,提示辣椒辣素可能缓解糖尿病特征性体质量下降的症状。两种浓度的辣椒辣素均降低糖尿病大鼠血清 TC、TG、LDL 浓度,但对 HDL 含量无改善效果,说明辣椒辣素能促进脂质分子在体内的代谢,但不具备协助 HDL 将脂质转运进入肝脏的能力。

视网膜血管通透性改变是 DME 的重要病理特征,而 BRB 的完整性是保证视网膜血管通透性功能正常的必要条件。视网膜血管内皮细胞是在血液循环和神经视网膜间发挥屏障作用的单层细胞^[8],其细胞间的 3 种连接结构是保证该作用的核心支柱,包括紧密连接(tight junctions, TJs)、黏附连接(adherens junctions, AJs)及缝隙连接(gap junctions, GJs),三者共同维持视网膜血管功能稳定^[9]。其中,TJs 是 BRB 最重要的连接结构,其完整性是决定 BRB 功能是否正常的关键因素。occludin 是一种跨膜蛋白,是 TJs 的重要组成部分,参与维持上皮细胞及内皮细胞间结构的完整性。occludin 受多途径调控,其中促炎因子 VEGF 会抑制其表达^[10-11]。实验

结果显示,DM 组大鼠视网膜 VEGF 较 NC 组表达增高,occludin 表达下降。经辣椒辣素处理的 CAP3、CAP6 组糖尿病大鼠视网膜组织 VEGF、occludin 表达趋势与 DM 组相反。该结果提示,DM 组大鼠视网膜中过表达 VEGF 可能抑制了 occludin 的正常生成,导致 TJs 构成组分不全,进而导致 BRB 屏障功能受损,血管通透性异常改变。辣椒辣素处理后,大鼠视网膜 VEGF 表达下降,occludin 受抑制减少,表达恢复。该结果与病理数据也相符合。免疫荧光提示,TRPV1 受体在视网膜中广泛分布,且辣椒辣素处理后 TRPV1 受体较未处理组激活增多。造影结果显示,与 NC 组相比,DM 组大鼠视网膜血管有强而多的荧光渗漏区域,表明视网膜血管壁受损,通透性异常增高,造影剂随损伤的血管壁渗漏进入视网膜组织内。CAP3、CAP6 处理组较 DM 组大鼠视网膜血管可见改善,眼底血管未见明显强荧光区,血管走行较为清晰,提示辣椒辣素缓解了糖尿病大鼠视网膜血管渗漏的情况,具有改善视网膜血管通透性的作用。该研究表明,辣椒辣素能激活糖尿病大鼠

视网膜组织中的 TRPV1 受体,上调因 VEGF 过表达而受到抑制的 occludin,保护 TJs 构成组分、维持 BRB 正常功能。

参考文献

- [1] Wang W, Lo A. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6):1816.
- [2] 门愿如,杨 帅,纪惠谦,等. 糖尿病视网膜病变增生期Ⅳ期合并黄斑水肿患者经阈下微脉冲激光治疗的短期随访效果[J]. 慢性病学杂志, 2021, 22(8):1280-2.
- [3] Pyun B J, Choi S, Lee Y, et al. Capsiate, a nonpungent capsaicin-like compound, inhibits angiogenesis and vascular permeability via a direct inhibition of Src kinase activity[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1):227-35.
- [4] 张 廷,杨继红,郭 政. 辣椒素预处理对糖尿病大鼠视网膜细胞凋亡的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(1):34-8.
- [5] 高 翔,刘 扣,桂衍超,等. 卡托普利抑制糖尿病视网膜病变大鼠脂代谢紊乱的作用及机制[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(4):592-5, 618.
- [6] Huang H W, Yang C M, Yang C H. Fibroblast growth factor type 1 ameliorates high-glucose-induced oxidative stress and neuroinflammation in retinal pigment epithelial cells and a streptozotocin-induced diabetic rat model[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13):1-10.
- [7] 陈朝军,李 俊,王 辉,等. 花椒麻素和辣椒辣素对大鼠体内脂质的调节作用[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(21):168-72.
- [8] Santiago A R, Boia R, Aires I D, et al. Sweet stress: coping with vascular dysfunction in diabetic retinopathy[J]. *Front Physiol*, 2018, 9:820.
- [9] Díaz-Coránguez M, Ramos C, Antonetti D A. The inner blood-retinal barrier: cellular basis and development[J]. *Vision Res*, 2017, 139:123-37.
- [10] Feldman G J, Mullin J M, Ryan M P. Occludin: structure, function and regulation[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(6):883-917.
- [11] Wang S S, Liao X, Liu F, et al. MiR-132 mediates cell permeability and migration by targeting occludin in high-glucose-induced ARPE-19 cells[J]. *Endocr J*, 2021, 68(5):531-41.

The effect of capsaicin on the retinal vascular permeability in diabetic rats

Liu Kou¹, Gao Xiang¹, Chen Keyang², Jiang Zhengxuan¹

(¹*Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;*

²*Dept of Inspection and Quarantine Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To investigate the effect of capsaicin on retinal vascular permeability in diabetic rats (DM).

Methods 24 eight-week-old male sprague-dawley (SD) rats were randomly categorized into four groups ($n=6$): control group (NC), diabetic group (DM), diabetic group with 3 mg/kg capsaicin treatment (CAP3) and diabetic group with 6 mg/kg capsaicin treatment (CAP6). Type 2 diabetic rat (T2DM) model was established by high-fat diet combined with small-dose streptozotocin (STZ) induction. The body weight and fasting blood glucose in 4 groups were monitored. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) concentrations in serum were detected according to manufacturer's instructions. Evans blue angiography was used to observe the changes of retinal vascular permeability. Immunofluorescence was used to measure the distribution and expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in retina. Western blot was used to detect the expression of TRPV1, vascular endothelial growth factor (VEGF) and occludin in rat retina. **Results**

Compared with the DM group, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein (LDL) levels in the CAP3 and CAP6 groups significantly decreased ($P<0.01$). The results of angiography showed that the retinal vascular permeability increased in the DM group and that there were many strong fluorescent leakage areas, while the leakage was reduced in CAP3 and CAP6 groups. In CAP3 and CAP6 groups, immunofluorescence showed the activation of TRPV1 in the retinal ganglion cell layer, inner nuclear layer and outer nuclear layer. Western blot indicated that the expression of TRPV1 and occludin increased while the expression of VEGF decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Capsaicin may exert the effect of improving diabetic retinopathy, underlying which the mechanism may be that capsaicin activates retinal TRPV1, resulting in the downregulation of VEGF and upregulation of occludin.

Key words diabetic retinopathy; macular edema; capsaicin; occludin