

依帕司他对大鼠晶状体渗透性膨胀的抑制作用

冀立霞, 沈 宁, 李彩娜, 刘 泉, 环 奕, 申竹芳*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 依帕司他 (epalrestat, Epal) 是目前唯一上市的醛糖还原酶 (aldose reductase, AR) 抑制剂, 主要用于糖尿病外周神经病变。本研究采用离体器官培养方法, 用半乳糖诱导大鼠晶状体发生明显渗透性膨胀, 模拟体内糖尿病性白内障的病理过程, 考察依帕司他是否具有抑制晶状体渗透性膨胀的作用。研究结果显示, 依帕司他 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能够明显抑制离体培养晶状体渗透性膨胀的发生, 对渗透性膨胀相关基因——AR 及水通道蛋白 1 (aquaporins1, AQP1) 在 mRNA 及蛋白水平的高表达也有显著改善作用。该研究为临床应用依帕司他防治糖尿病性白内障提供了参考。

关键词: 依帕司他; 醛糖还原酶; 晶状体; 渗透性膨胀; 白内障

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 10-1107-05

Inhibition effect of epalrestat on rat lens osmotic expansion

Ji Li-xia, SHEN Ning, LI Cai-na, LIU Quan, HUAN Yi, SHEN Zhu-fang*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Epalrestat is the unique aldose reductase inhibitor on the market, which was mainly used for the diabetic neuropathy. Lenses osmotic expansion could be induced by galactose to mimic the pathological process of diabetic cataract *in vitro*. In present study, we mainly investigated whether epalrestat possesses inhibitory effect on the lens osmotic expansion. The results indicated that epalrestat could not only markedly inhibit rat lens osmotic expansion *in vitro*, but also significantly reduced the high expression of the osmotic expansion-related genes such as AR and AQP1 in mRNA and protein levels. The findings may provide an important reference to epalrestat in the clinical application for the treatment of diabetic cataract.

Key words: epalrestat; aldose reductase; lens; osmotic expansion; cataract

醛糖还原酶 (AR) 是多元醇通路的关键酶, 过度激活可引起晶状体发生明显的渗透性膨胀, 成为糖性白内障早期主要的病理改变, 也是多年来抗糖性白内障药物研究的重要靶点^[1]。晶状体是相对独立的视觉器官, 可在体外进行器官培养^[2, 3], 高浓度半乳糖能够激活晶状体内 AR, 导致半乳糖醇在细胞内大量堆积, 继而引起水平衡紊乱及离子代谢失衡, 晶状体内发生明显的渗透性膨胀, 这种变化与糖尿病白内障发生的病理过程非常类似, 是抗糖性白内障

药物在体外研究的重要模型^[4]。依帕司他是目前唯一上市的 AR 抑制剂, 主要用于糖尿病外周神经病变的预防及治疗。本研究将糖性白内障的发病机制与依帕司他的作用特点相结合, 从抗糖性白内障药物离体评价角度探讨依帕司他对大鼠晶状体渗透性膨胀的抑制作用及其机制。

材料与方法

动物 正常雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (200~220 g), 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证标号为 SCXK (京) 2007-0001, 饲养于 SPF 级动物房, 裂隙灯下见所有大鼠晶状体完全透明, 且无其他眼疾。

收稿日期: 2009-07-21.

基金项目: 国家新药开发工程中心项目资助.

*通讯作者 Tel: 86-10-63165194, Fax: 86-10-83172669,

E-mail: shenzhf@imm.ac.cn

药品与试剂 NADPH- Na_4 、DL-甘油醛及 D-半乳糖均购自 Sigma 公司; 依帕司他购自上海金恒化工公司; DMEM 液体培养基购自北京钮因公司; Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; VigoScript First Strand cDNA Synthesis Kit 购自威格拉斯生物技术公司; SYBR Premix Ex TaqTM (perfect Real Time) 购自大连宝生物有限公司; 山羊抗 AR 抗体 (sc17736) 及兔抗 AQP1 抗体 (sc20810) 购自 Santa Cluz Biotechnology 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

实验仪器 维纳斯剪; 显微外科镊; 裂隙灯 (江苏六六视觉公司); 低温高速冷冻离心机 (Sigma 公司); 6010 型紫外-可见分光光度计 (安捷伦上海分析公司); JY92-II 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝公司); ABI 7000 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); LAS-3000 成像系统 (Fuji Photo Film, Tokyo, 日本)。

大鼠晶状体离体培养 正常大鼠断头处死后立即取出整个眼球, 75%乙醇中浸泡 10 min 后转至超净工作台内, 灭菌人工房水清洗眼球, 使用维纳斯剪, 采用后囊法小心取出整个晶状体, 轻轻滚动以去除晶状体表面的玻璃体, 然后转至 24 孔板, 于低糖 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、无酚红 DMEM 培养基中, 37°C 、5% CO_2 无菌条件下预培养 6 h 后, 选完全透明且培养基中蛋白含量小于 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 者为无损晶状体, 进行后续实验。

依帕司他对离体培养大鼠晶状体渗透性膨胀的影响 半乳糖是 AR 良好的底物, 实验用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 半乳糖诱导晶状体发生明显渗透性膨胀, 依帕司他浓度设为 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。选预培养后无损晶状体 54 只, 分为 3 组 ($n=18$), 同一组内避免一只大鼠两个晶状体同时存在, 更换培养基时加入相应剂量的依帕司他, 药物干预 24 h 后模型组及依帕司他组内添加半乳糖培养基。共培养 48 h 时更换培养基, 96 h 时终止实验, 再次检测培养基蛋白含量以排除培养过程中已损伤晶状体, 体视显微镜下使用测微尺测量晶状体的直径, 称重后于 -80°C 冻存备用, 7 d 内完成各项生化指标的检测。

大鼠晶状体组织处理 -80°C 短期冻存大鼠晶状体, 加入去离子水 ($400 \text{ } \mu\text{L}$ /只) 后, 冰浴下超声破

碎 ($200 \text{ W} \times 10 \text{ s}$ /次 $\times 3$ 次), $15\,000 \times g$ 低温离心 30 min 后, 取上清液用于各项生化指标测定。

晶状体 AR 活性的测定^[5] 首先测定紫外酶标板在 340 nm 及 977/900 nm 的吸收度值作为本底。反应设空白孔、对照孔及待测样品孔, 冰浴条件下依次加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液、晶状体匀浆上清液、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH- Na_4 及 $0.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DL-甘油醛。25 $^\circ\text{C}$ 反应 5 min, 终止反应后立即测定 340 nm 及 977/900 nm 的吸收度值。根据酶学单位的国际定义, 1 单位的 AR 为 25 $^\circ\text{C}$ 下每分钟内 NADPH 消耗的 μmol 数, $\text{AR 比活性} = \text{AR 活性单位} / \text{蛋白含量 (mg)}$, 单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (protein)。

晶状体半乳糖醇含量测定 晶状体匀浆上清液经 10% TCA 沉淀蛋白后, 取上清液备用。96 孔板内分别加入缓冲液、待测样品 (半乳糖醇标准) 及 $12.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高碘酸溶液, 混匀后避光反应 10 min, 然后依次加入 $12.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚砷酸钠溶液及 0.2% 变色酸, 沸水浴 30 min 后冷却、离心, 取上清液测定 570 nm 处的吸收度值, 绘制标准曲线, 计算晶状体内半乳糖醇的含量。

Real time RT-PCR 检测 AR 及 AQP1 mRNA 的表达 实验采用 Trizol 法提取晶状体总 RNA, 取总 RNA 2 μg , 逆转成第一链 cDNA 后, 进行基因产物的扩增 (real time RT-PCR), 反应体系组成: SYBR Premix Ex TaqTM ($2 \times$) 10.0 μL , cDNA 2.0~4.0 μL , 上、下游引物各 0.3 μL , Rox Reference Dye ($50 \times$) 0.4 μL , 去离子水加至 20 μL 。PCR 反应条件: 第 1 步, $95^\circ\text{C} \times 10 \text{ s}$; 第 2 步, $95^\circ\text{C} \times 5 \text{ s} + 61^\circ\text{C} \times 34 \text{ s}$, 重复 40 个循环; 第 3 步, $95^\circ\text{C} \times 15 \text{ s} + 60^\circ\text{C} \times 60 \text{ s} + 95^\circ\text{C} \times 15 \text{ s}$ 。实验以 β -actin 为内参, 各基因引物序列见表 1 (Invitrogen 公司合成)。在以 SYBR 为荧光染料的 real time RT-PCR 实验中, 首先对各基因引物特异性进行鉴定, 然后采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法对 PCR 产物进行相对定量分析。

Western blotting 检测 AR 及 AQP1 的蛋白表达水平 收集各组晶状体囊, 每组 8 个, 加入预冷蛋白裂解液 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.8, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠,

Table 1 The primers of the target genes

Gene	Sense primer (5'→3')	Anti-sense primer (5'→3')	Product / bp
β -Actin	ACTCTTCCAGCCTTCCTTC	ATCTCCTTCTGCATCTGTC	171
AR	GTGACCGAGGCTGTGAA	AGAGGGTTGAAGTTGGAGA	413
AQP1	TCACCCGCAACTTCTCA	TCACCCGCAACTTCTCA	218

0.1% SDS, 1 mmol·L⁻¹ PMSF 及 1% 蛋白酶抑制剂), 冰浴裂解 20 min 后, 冰浴下超声破碎 (100 W×10 s/次×5 次), 再次冰浴裂解 20 min 后 4 °C 离心 (15 000×g, 30 min), 取上清液, BCA 法进行蛋白定量, 调整蛋白浓度后加蛋白上样缓冲液 (5×), 煮沸 10 min 蛋白变性后冻存以备电泳。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白样品进行分离, 转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后常规一抗 4 °C 孵育过夜 (AR 及 AQP1 抗体滴度均为 1:1 000), 以 β -actin 为内参, 二抗室温孵育 1 h, 加超敏反应液捕获图像, 最后对蛋白条带的灰度值进行定量分析。

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异进行 *t* 检验, real time RT-PCR 结果采用 $\Delta\Delta C_t$ 法进行相对定量分析。

结果

1 依帕司他对渗透性膨胀晶状体形态学的影响

正常大鼠晶状体体外培养 96 h 后, 透明度、形态与刚取出晶状体无明显差异, 而 50 mmol·L⁻¹ 半乳糖可以诱导晶状体发生明显的渗透性膨胀, 晶状体的体积增大, 透明度下降, 成朦胧状态, 且在皮质区出现明显高密度晕环, 晕环内外晶状体透明度基本一致, 位置靠近皮质与核的交界线。依帕司他 (5 μ mol·L⁻¹) 明显改善了晶状体的整体混浊度, 显著降低了晕环的密度, 抑制了晕环的内移 (始终位于晶状体皮质

外围边缘处)。见图 1。

2 依帕司他对渗透性膨胀晶状体直径及重量的影响

正常大鼠晶状体重约为 (36.58 $\pm$ 1.43) mg, 直径约为 (4.51 $\pm$ 0.03) mm。模型组晶状体重量明显增至 (47.33 $\pm$ 3.12) mg ($P < 0.001$), 直径扩大至 (4.70 $\pm$ 0.56) mm ($P < 0.001$)。与模型组相比, 依帕司他 (5 μ mol·L⁻¹) 能够显著抑制晶状体重量的增加及直径的增大 ($P < 0.001$, $P < 0.05$, 图 2)。

3 依帕司他对渗透性膨胀晶状体 AR 活性及半乳糖醇含量的影响

正常组的晶状体 AR 活性及半乳糖醇含量较低, 模型组的晶状体 AR 活性被显著激活 ($P < 0.001$), 同时引起半乳糖醇的大量堆积 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 依帕司他 (5 μ mol·L⁻¹) 明显抑制晶状体内 AR 的激活, 并降低半乳糖醇含量 ($P < 0.05$, 图 3)。

4 依帕司他对渗透性膨胀晶状体 AR、AQP1 mRNA 表达的影响

内参 β -actin 及目的基因 AR 和 AQP1 融解曲线基线平稳, 且仅有单一主峰, 引物特异性较好, 产物中无明显非特异扩增及引物二聚体生成。Real time RT-PCR 相对定量分析结果 (图 4) 显示, 正常组晶状体 AR 及 AQP1 均有一定表达, 半乳糖 (50 mmol·L⁻¹) 能够诱导晶状体内 AR 及 AQP1 高表达明显, 分别为正常水平的 4.24 倍和 9.23 倍, 两者共同参与了晶状体渗透性膨胀的发生。依帕司他 (5 μ mol·L⁻¹) 对晶

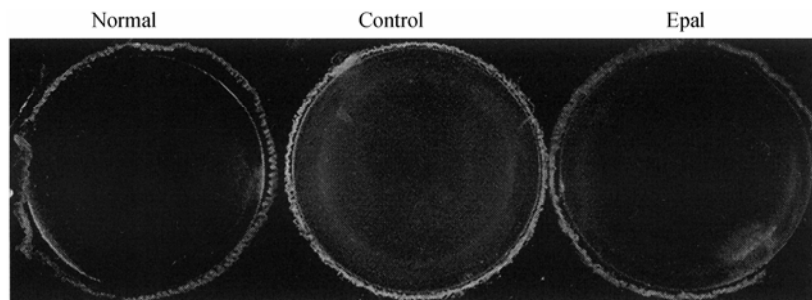


Figure 1 Effect of epalrestat (Epal, 5 μ mol·L⁻¹) on the morphologic change of lens osmotic expansion induced by 50 mmol·L⁻¹ galactose

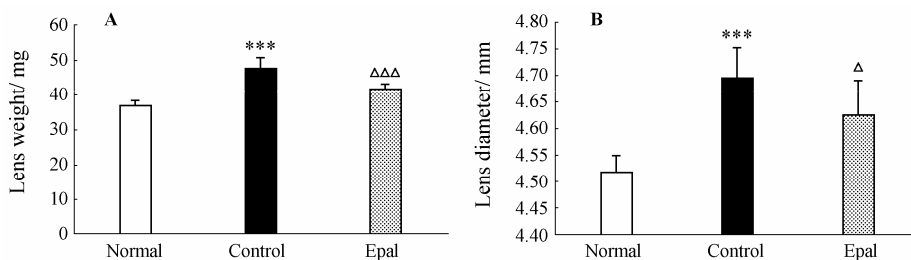


Figure 2 Effects of epalrestat (5 μ mol·L⁻¹) on lens weight (A) and diameter (B) of osmotic expansive lenses induced by 50 mmol·L⁻¹ galactose. $n = 18$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs normal group (without galactose); $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.001$ vs control group (with galactose)

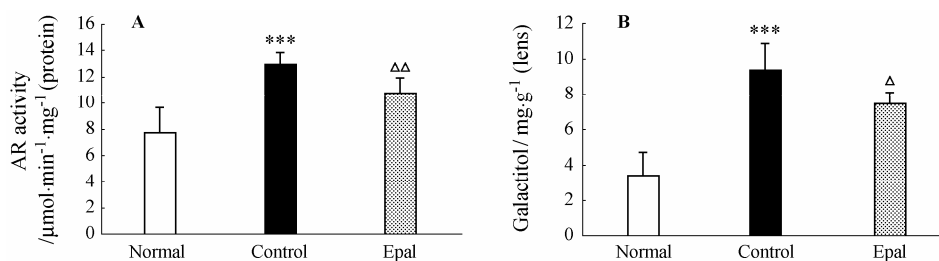


Figure 3 Effect of epalrestat ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on AR activity (A) and galactitol (B) of osmotic expansive lenses induced by $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ galactose. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs normal group (without galactose); $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group (with galactose)

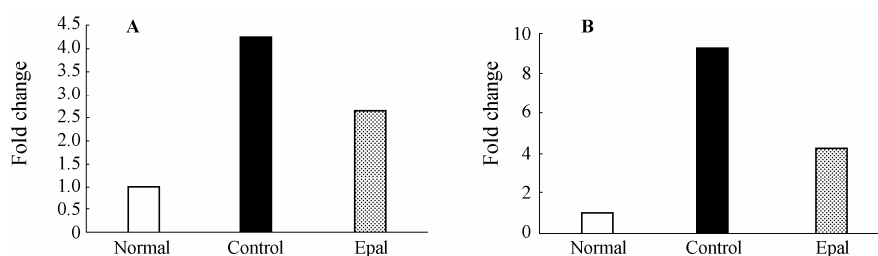


Figure 4 Effects of epalrestat ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on AR (A) and AQP1 (B) mRNA expression of osmotic expansive lenses induced by $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ galactose. The expression of each gene is normalized to a housekeeper gene (β -actin), which is evenly expressed in rat lens. The ratio is expressed as: Fold change = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

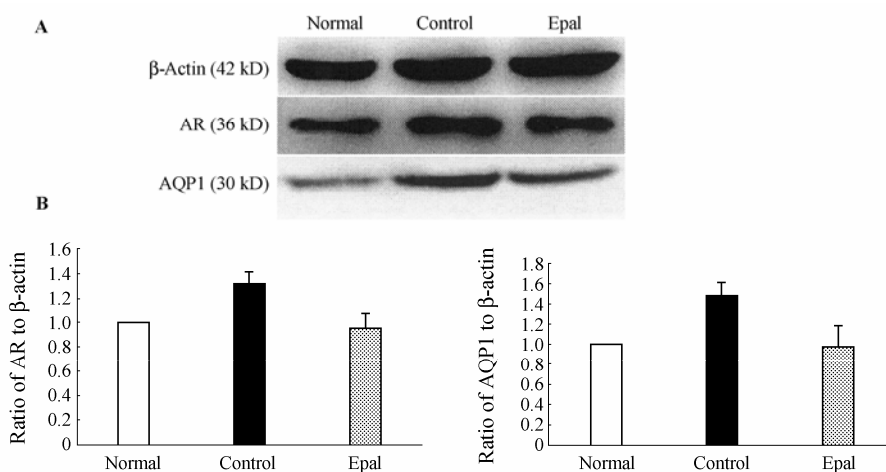


Figure 5 Western blotting analysis confirms the up or down expressions of AR and AQP1 in the capsules of osmotic expansive lenses induced by $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ galactose (β -actin was used as an internal marker). A: The representative photograph of Western blotting analysis; B: The optical densities of AR and AQP1 in Western blotting expressed as a ratio to that of β -actin

状体内 AR 及 AQP1 的高表达均有一定的抑制作用, 两者分别降至正常水平的 2.61 倍和 4.21 倍。

5 依帕司他对渗透性膨胀晶状体 AR、AQP1 蛋白表达的影响

内参 β -actin 在晶状体囊内稳定表达, 半乳糖 ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能够诱导晶状体囊内 AR 及 AQP1 两种渗透性相关蛋白的表达明显升高, 分别增至正常水平的 1.31 倍和 1.48 倍。而依帕司他 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与半乳糖共培养 96 h 后, AR 及 AQP1 的高表达得到一定程度的改善, 基本恢复到正常水平 (图 5)。

讨论

化学合成的 AR 抑制剂分为海因类和羧酸类, 虽然有不少此类药物先后进入临床研究, 但绝大多数因为严重的毒副作用而被迫终止研发^[1]。目前唯一在日本上市的羧酸类 AR 抑制剂——依帕司他, 主要用于糖尿病末梢神经障碍的预防及治疗, 尚未用于糖性白内障的防治。

在糖尿病白内障的发生机制中, 晶状体的高渗透性膨胀早已在动物实验及临床研究中得到证实^[6, 7]。渗透性膨胀发生在真性白内障之前, 与体内高血糖

水平密切相关。高糖情况下,尤其是当血糖水平高于 $200 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 时, 30%以上葡萄糖涌入多元醇通路, 中间产物山梨醇不易透过细胞膜而在晶状体细胞内大量堆积, 引发渗透性膨胀^[1, 8], 并导致晶状体内水平衡失调及离子代谢紊乱, 诱导 AR 及 AQP1 的高表达。AQP1 是第一个被发现的跨膜水通道蛋白^[9], 允许水分子自由通过细胞膜, 参与晶状体的体液代谢。AQP1 在晶状体上皮细胞内有明确表达^[10]。

半乳糖是 AR 的良好底物, 两者亲和力远高于葡萄糖, 它不仅能激活 AR, 而且中间产物半乳糖醇不易被代谢, 更易引发晶状体的渗透性膨胀。由于两者引发晶状体渗透性膨胀的原理极为相似, 且病程进展速度明显加快, 半乳糖被广泛应用于糖尿病性白内障的实验研究^[4, 11, 12]。

晶状体是一个相对独立的视觉器官, 可在体外模拟体内环境进行器官培养^[2, 3]。本研究选择手术中无损伤晶状体, 主要考察依帕司他对半乳糖 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导的晶状体渗透性膨胀有无改善作用。参考文献[13]设定依帕司他的浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并经过多次验证。目前临床上缺乏糖性白内障的有效治疗药物, 重症患者仅能通过手术解除痛苦, 因此本研究中未设阳性对照药组。从形态学变化来看, 依帕司他不仅能够降低外层皮质晕环的密度, 明显延缓高密度晕环的内移, 而且抑制了晶状体重量的增加和直径的扩大, 对晶状体的渗透性膨胀有较强的抑制作用。各项生化指标显示, 依帕司他 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 显著抑制了晶状体内 AR 的激活, 避免中间产物——半乳糖醇在晶状体内大量堆积, 这与晶状体形态学的变化相吻合。机制研究结果提示, 依帕司他不仅抑制了渗透性膨胀相关基因 AR 及 AQP1 mRNA 水平的高表达, 而且对两者蛋白水平的高表达也有显著的改善作用。

综合晶状体形态学、生化指标、mRNA 及蛋白表达水平的实验结果, 依帕司他显著抑制了高半乳糖诱导的晶状体内 AR 的激活, 降低了渗透性膨胀相关基因的表达, 显著改善了晶状体的渗透性膨胀。本研究为依帕司他在临床上防治糖尿病性白内障提供了参考。

References

[1] Kyselova Z, Stefek M, Bauer V. Pharmacological prevention

of diabetic cataract [J]. J Diabetes Complications, 2004, 18: 129–140.

[2] Moghaddam MS, Kumar PA, Reddy GB, et al. Effect of Diabecon on sugar-induced lens opacity in organ culture: mechanism of action [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 97: 397–403.

[3] Cheng Q, Gerald Robison W, Samuel Zigler J. Geranylgeranyl pyrophosphate counteracts the cataractogenic effect of lovastatin on cultured rat lenses [J]. Exp Eye Res, 2002, 75: 603–609.

[4] Zatechka DS Jr, Kador PF, Garcia-Castñeiras S, et al. Diabetes can alter the signal transduction pathways in the lens of rats [J]. Diabetes, 2003, 52: 1014–1022.

[5] Xie MZ, Shen ZF. Inhibition of aldose reductase from rat lens by flavonoids [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1986, 21: 721–724.

[6] Kubo E, Urakami T, Fatma N, et al. Polyol pathway-dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells: role of AOP2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314: 1050–1056.

[7] Kanth VR, Lavanya K, Srinivas J. Elevated expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and accumulation of kynurenic acid in the pathogenesis of STZ-induced diabetic cataract in Wistar rats [J]. Curr Eye Res, 2009, 34: 274–281.

[8] Anil Kumar P, Bhanuprakash Reddy G. Focus on molecules: aldose reductase [J]. Exp Eye Res, 2007, 85: 739–740.

[9] Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 11110–11114.

[10] Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH. Functions of aquaporins in the eye [J]. Prog Retin Eye Res, 2008, 27: 420–433.

[11] Mulhern ML, Madson CJ, Kador PF, et al. Cellular osmolytes reduce lens epithelial cell death and alleviate cataract formation in galactosemic rats [J]. Mol Vis, 2007, 13: 1397–1405.

[12] Ajani EO, Salako AA, Sharlie PD, et al. Chemopreventive and remediation effect of *Hydrocotyl bonariensis* Comm. Ex Lam (Apiaceae) leave extract in galactose-induced cataract [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 123: 134–142.

[13] Kim YS, Kim NH, Jung DH, et al. Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose-induced TGF- β 2 expression in human lens epithelial cells [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 594: 18–25.