

亚麻籽油对肥胖小鼠视网膜的保护作用研究

王黎¹, 石蕊², 雷媛¹, 戴思洋¹

(1. 西安医学院药学院, 西安 710021; 2. 陕西省人民医院眼科, 西安 710068)

摘要:为了研究亚麻籽油对肥胖小鼠视网膜的作用,将小鼠随机分为正常膳食组(标准鼠粮)、高脂膳食组(拌合猪油鼠粮),饲养8周,分别检测体重及胰岛素抵抗情况,分析其肥胖性糖尿病诱发情况。将诱发成功的小鼠进一步分为两组,即高脂膳食组(拌合猪油鼠粮)及亚麻籽油组(拌合猪油+亚麻籽油鼠粮)。与正常膳食组同步再饲养8周后,分别检测小鼠的体重、胰岛素抵抗情况,同时处死小鼠,取视网膜组织,以ELISA法检测其视网膜炎症因子IL-10及视网膜血管内皮生长因子VEGF水平。结果表明:连续饲养8周后,高脂膳食组小鼠出现明显的肥胖、胰岛素抵抗症状,肥胖性糖尿病小鼠造模成功;此后再饲养8周,相对高脂膳食组,亚麻籽油组小鼠肥胖状况未得到改善($P>0.05$),但胰岛素抵抗状况明显改善($P<0.05$),IL-10及VEGF水平明显降低($P<0.05$)。研究结果说明含亚麻籽油的膳食饲养可以改善高脂膳食引起的肥胖小鼠的视网膜损伤。

关键词:亚麻籽油;糖尿病视网膜病变;肥胖

中图分类号:TS225.1;R77

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)09-0077-04

Preventive effect of flaxseed oil against diabetic retinopathy in obese mice

WANG Li¹, SHI Rui², LEI Yuan¹, DAI Siyang¹

(1. Department of pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: The preventive effect of flaxseed oil against diabetic retinopathy in obese mice was studied. KM mice were randomly divided into normal dietary group (standard mice grain), high-fat diet group (high lard mice grain). After feeding for eight weeks, the weight and insulin resistance were examined respectively to analyze the induced condition of obesity diabetes. The obese mice were further divided into two groups: the high-fat diet group (lard) and the flaxseed oil group (lard + flaxseed oil). After eight weeks of simultaneous feeding with the normal diet group, the weight and insulin resistance of three groups of mice were examined respectively. The mice were executed, the retina tissue was taken, and the levels of retinal inflammatory factor IL-10 and retinal vascular endothelial growth factor VEGF were detected by ELISA. The results showed that after eight weeks of continuous feeding, mice in the high-fat diet group showed significant obesity, insulin resistance symptoms, and the obese diabetic mice model was successfully introduced, and after eight weeks of feeding, compared with high-fat diet group, the obesity status of mice in the flaxseed oil group did not improve ($P>0.05$), but the insulin resistance was significantly improved ($P<0.05$), the levels of IL-10 and VEGF were significantly reduced ($P<0.05$). The results indicated that dietary feeding with flaxseed oil could improve retinal damage in obese mice caused by high-fat diet.

Key words: flaxseed oil; diabetic retinopathy; obese

收稿日期:2020-03-04;修回日期:2020-05-27

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2017JM8060);陕西省教育厅专项科研计划项目(19JK0772);西安医学院2018年配套基金项目(2018PT60);省级、校级大学生创新创业训练计划项目(S201911840002,2018DC-62)

作者简介:王黎(1978),女,副教授,主要从事药物制备与质量控制工作(E-mail)t_lizi@sina.com。

糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的微血管并发症之一,最终可导致不可逆的视力丧失,是威胁人们视觉健康的首要疾

病^[1]。肥胖是导致 2 型糖尿病发生的独立危险因素,脂肪的过度积累引起全身性炎症状态,进而导致骨骼肌葡萄糖摄入量减少和肝糖异生增加^[2-3]。同时,肥胖是导致糖尿病患者并发 DR 的首要危险因素^[4-5],在视网膜微血管等组织中,肥胖引起的脂质代谢紊乱导致自由基生成增加^[6]。而视网膜葡萄糖转运体 1 (GLUT1) 不受胰岛素调控,高血糖时易转运进较其他组织更多的葡萄糖。脂质、自由基协同高糖导致视网膜中炎症因子的积累^[7-8],其中,血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 的增多促使血管增殖性 DR 的发生^[9]。

DR 已被全球“视觉 2020”行动列为“可避免盲”的攻克目标之一,但到目前为止,还未发现可显著遏制 DR 进展的行之有效的办法。多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 是一种存在于鱼油、橄榄油、玉米油等食用油中的多烯类脂肪酸。 ω -3 类 PUFAs 被证实对全身各系统具有抗炎活性,包括对视网膜的抗炎活性^[10]。

亚麻籽油是重要的 ω -3 类 PUFAs 来源,其 α -亚麻酸含量高达 50% 以上^[11-12]。亚麻籽油还含有多酚类物质及脂溶性维生素 E,多酚类物质能够抗氧化、清除自由基,维生素 E 是重要的类脂抗氧化剂。因此,可以推测,亚麻籽油的使用有望能够阻断上述“脂代谢紊乱-氧化应激压力与高糖-炎症-视网膜损伤”病理通路。然而,目前尚无亚麻籽油对 DR 干预作用的研究。因此,本文以视网膜中炎症因子 IL-10 及 DR 的主要成因 VEGF 为主要指标,研究含亚麻籽油的膳食对高脂饮食诱导的肥胖小鼠视网膜损伤进展的影响,阐述含亚麻籽油的膳食对 DR 的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康雄性昆明种小鼠 60 只,4 周龄,体重(21 ± 4)g,购自成都达硕实验动物有限公司。小鼠自由摄食及饮水,分笼饲养于 SPF 级饲养环境,室温(22 ± 2)℃,每日明暗时间各 12 h,每周称量动物的体重。动物实验依据西安交通大学实验室动物准则实施。

1.1.2 试剂与仪器

小鼠基础饲料(颗粒型日粮维持饲料),河南天驰实验动物饲料厂;精炼猪油(食品级),临沂新程金锣肉制品集团有限公司;精炼亚麻籽油(食品级,加工工艺为压榨,质量等级为一级,标称 α -亚麻酸含量 52.6%),上海嘉里食品工业有限公司;anti-

IL-10 与 anti-VEGF 抗体,圣克鲁斯生物技术; γ -生育酚标品(纯度 95%),瑞士罗氏公司;拜安进血糖仪(国食药监械(进)字 2014 第 2404310 号)及拜安进配套试纸(葡萄糖脱氢酶法,国械注(进)20142405084);胰岛素注射液(10 mL,400 U,使用前以生理盐水稀释),江苏万邦生化医药集团有限责任公司;7890A 型气相色谱仪,美国安捷伦公司;YZ5X 型裂隙灯显微镜,苏州六六视觉科技股份有限公司;TDL-80-2B 型离心机,上海安亭科学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 亚麻籽油中 α -亚麻酸、多酚及维生素 E 含量测定^[13-14]

测定亚麻籽油中 α -亚麻酸含量时,以内标法定量;测定亚麻籽油中多酚含量时,以外标法定量,多酚含量以咖啡酸含量计;测定亚麻籽油中维生素 E 含量时,采用外标法定量。

1.2.2 实验膳食的制备

小鼠的实验膳食均依据 AIN-93G 自行配制。将小鼠基础饲料(粗脂肪含量 4%)以粉碎机粉碎,混匀后等分为 3 份:1 份拌入猪油,使脂肪含量达到 35%,作为高脂饲料;1 份采用猪油与亚麻籽油各占 50% 的调和油拌入油脂,同样使脂肪含量达到 35%,作为亚麻籽油饲料;1 份不作调整,作为正常饲料。拌合均匀后捏制成鼠粮形状,烘箱烘干即得实验膳食,4℃ 储存备用。

1.2.3 动物实验

将小鼠随机分为 2 组,正常膳食组(SD 组)及高脂膳食组(HD 组)。SD 组饲喂正常饲料,HD 组饲喂高脂饲料,共喂养 8 周。每日称量投喂及剩余饲料,观察摄食情况,每周称量小鼠体重,观察体重变化情况。在 8 周结束后,测定小鼠的胰岛素抵抗情况,通过体重及胰岛素抵抗情况判定肥胖性糖尿病模型是否造模成功。将造模成功的小鼠随机再分为 HD 组和亚麻籽油组(FOD 组),HD 组继续饲喂高脂饲料,FOD 组饲喂亚麻籽油饲料。SD 组继续饲喂正常饲料。继续饲喂 8 周后,处死全部小鼠,摘取双眼眼球。以眼科手术器械在放大镜下分离眼球各组织,自虹膜后切去前节部分,去除晶状体与玻璃体,使用镊子小心剥取视网膜并立即以液氮冷冻,于 -80℃ 冻存。

1.2.4 小鼠的胰岛素抵抗测试^[15-16]

将实验小鼠禁食 8 h,腹腔内注射胰岛素(注射剂量 1.5 U/kg),注射后在 0、10、20、30 min 时在尾静脉取血,立即使用电子血糖仪测定血糖,绘制血糖

随时间的变化曲线,计算血糖相对时间的平均下降率(K_{ITT})。

1.2.5 视网膜组织中 VEGF、IL-10 水平的 ELISA 法检测^[17]

将-80℃下冻存的视网膜组织取出,在预冷的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.0~7.2)中洗去血污,冰上加 PBS 研磨,反复冻融得匀浆液。用包被缓冲液(pH 9.6, 0.05 mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液)稀释 anti-IL-10、anti-VEGF,在 96 孔板上每孔加 0.3 mL,4℃过夜。次日去除包被液,各孔用洗涤缓冲液(0.05% Tween20)洗涤 3 次。在各孔中加入稀释液(pH 7.4, 0.02 mol/L Tris 缓冲液)稀释的上述待测标本 0.2 mL,同时加入阳性和阴性对照标本,

在 37℃放置 90 min。去除液体后洗涤 3 次,加入 VEGF、IL-10 的酶标抗体 0.2 mL,于 37℃放置 90 min。去除液体后洗涤 3 次,加入 0.2 mL 底物溶液(OPD)于各孔中,室温作用 30 min,加终止剂 2 mol/L H₂SO₄ 溶液 0.05 mL。在酶标仪上读取 450 nm 下的吸光值,分析 VEGF、IL-10 水平。

2 结果与讨论

2.1 亚麻籽油中 α -亚麻酸、多酚及维生素 E 含量

经测定本研究所使用的亚麻籽油中 α -亚麻酸平均含量为 53.59%,总多酚平均含量为 0.097 mg/g,其主要生育酚异构体 γ -生育酚平均含量为 418.78 μ g/g。

2.2 小鼠的体重变化及胰岛素抵抗情况(见表 1)

表 1 小鼠的体重变化及胰岛素抵抗情况

组别	初始体重/g	体重/g		$K_{ITT}/(\%/min)$	
		第 8 周	第 16 周	第 8 周	第 16 周
SD 组	21 ± 4	39 ± 4	47.5 ± 5.0	3.92	3.25
HD 组	21 ± 4	53 ± 5	68.3 ± 11.0	1.94	1.91
FOD 组	-	53 ± 5	66.4 ± 8.0	1.94	2.98

由表 1 可见:SD 组及 HD 组小鼠在实验起始时,体重为(21 ± 4) g,第 8 周时,SD 组小鼠的体重增至(39 ± 4) g,而 HD 组增至(53 ± 5) g,HD 组体重显著大于 SD 组($P < 0.05$);SD 组小鼠的血糖相对时间的平均下降率(K_{ITT})为 3.92%/min,而 HD 组仅为 1.94%/min,HD 组小鼠血糖对胰岛素注射的敏感度显著小于 SD 组($P < 0.05$),说明 HD 组已出现明显的胰岛素抵抗。结合 HD 组体重及胰岛素抵抗情况数据,说明肥胖性糖尿病小鼠模型成功建立。

按 1.2.3 方法饲喂小鼠至第 16 周,SD 组小鼠的 K_{ITT} 为 3.25%/min,HD 组仅为 1.91%/min,HD 组显著小于 SD 组($P < 0.05$),且与其第 8 周时的数据相比无显著性差异($P > 0.05$),说明 HD 组在第 8 周出现的胰岛素抵抗未改善;自第 8 周时从 HD 组分出饲喂含亚麻籽油膳食的 FOD 组在第 16 周时 K_{ITT} 为 2.98%/min,相对 SD 组无显著性差异($P > 0.05$),相对 HD 组第 8 周时的数据具有显著性差异($P < 0.05$),说明该组小鼠在第 8 周出现的胰岛素抵抗已明显改善。

第 16 周时,SD 组小鼠的体重增至(47.5 ± 5.0) g,HD 组增至(68.3 ± 11.0) g,FOD 组增至(66.4 ± 8.0) g,HD 组体重显著大于 SD 组($P < 0.05$),但 HD 组与 FOD 组间体重无明显差异,说明饲喂亚麻籽油在未改善小鼠肥胖的情况下,改善了其糖尿病胰岛素抵抗情况。

2.3 小鼠视网膜组织中 VEGF、IL-10 的相对表达水平(见表 2)

表 2 第 16 周时小鼠视网膜组织中 VEGF、IL-10 相对表达水平

组别	VEGF	IL-10
SD 组	100 ± 43	100 ± 56
HD 组	265 ± 17	329 ± 132
FOD 组	121 ± 11	97 ± 34

由表 2 可见:HD 组小鼠视网膜组织中 VEGF 及 IL-10 水平均显著高于 SD 组($P < 0.05$);FOD 组小鼠视网膜组织中的 VEGF 及 IL-10 水平与 SD 组相比无显著性差异,相比 HD 组存在显著性差异($P < 0.05$)。

目前的研究表明,肥胖型糖尿病患者更易发生微血管并发症。叶守姣等^[5]研究发现,合并肥胖的糖尿病患者的视网膜病变、糖尿病肾病、周围神经病变、下肢血管病变显著增多,而心脑血管病变则未增多。郑锦标等^[4]对 213 例 DR 患者进行患病危险因素的调查分析发现,肥胖对 DR 的影响居首,其定义比数比(odds ratio)是第二位影响因素“饮酒”的 3 倍多。

肥胖型糖尿病患者更易发生微血管并发症的机制目前尚不十分清楚。目前的研究普遍认为,可能与肥胖导致的脂质代谢紊乱等多种因素有关^[18],并受到脂联素的调控^[19-20],而脂联素受 $\omega-3$ 类

PUFAs 的调控^[21]。这有可能是亚麻籽油中富含的 ω -3 类 PUFAs 发挥抗视网膜损伤作用的途径之一。

脂质代谢紊乱导致的氧化应激压力可能是肥胖型糖尿病合并 DR 的另一原因。多酚类化合物丹酚酸 A 可以改善肥胖型糖尿病大鼠的视网膜病变^[22]，这可能与其对抗氧化应激的作用有关。本研究测定了亚麻籽油中的多酚和维生素 E 的含量，亚麻籽油富含多酚及维生素 E 等抗氧化性类脂可能是其发挥抗 DR 作用的另一途径。

3 结 论

在连续 8 周饲喂高脂饲料后，小鼠出现明显的肥胖、胰岛素抵抗症状，肥胖性糖尿病小鼠造模成功。此时，若改变饲喂方式，以混合亚麻籽油膳食饲喂肥胖性糖尿病小鼠，8 周后相对高脂膳食组，其肥胖状况未得到改善，但胰岛素抵抗状况明显改善，视网膜炎症因子 IL-10、视网膜血管内皮生长因子 VEGF 水平明显降低。因此，含亚麻籽油膳食饲喂可以改善高脂膳食引起的肥胖小鼠的视网膜损伤。

参考文献：

- [1] YAU J W, ROGERS S L, KAWASAKI R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(3):556-564.
- [2] 刘俊,郭毅,刘晴,等. 超重、肥胖与 2 型糖尿病相关性的 Meta 分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2013, 13(2):190-195.
- [3] ZAND H, MORSHEDEZADEH N, NAGHASHIAN F. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2017, 11: S307-S309.
- [4] 郑锦标,马萍萍,马瑞倩. 糖尿病伴发视网膜微血管异常临床特征及危险因素调查研究[J]. *陕西医学杂志*, 2019, 48(11):1571-1573.
- [5] 叶守姣,张硕,常柏. 肥胖与 2 型糖尿病患者并发症的关系[J]. *山东医药*, 2015, 55(37):41-42.
- [6] 王侃侃. 膳食能量和蛋氨酸限制对小鼠脂代谢和氧化应激的影响[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2016.
- [7] LU L. Suppression of GLUT1; a new strategy to prevent diabetic complications [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228: 251-257.
- [8] 潘爱平,杨云霞,徐洪磊. 2 型糖尿病视网膜病变患者血清脂联素与 VEGF 水平的变化及意义[J]. *临床输血与检验*, 2017, 19(2):170-172, 184.
- [9] 周林,孙昊,徐岬,等. VEGF、IL-6 的水平与糖尿病视网膜病变关系的研究[J]. *眼科学报*, 2010, 25(1):26-30.
- [10] CONNOR K M. Increased dietary intake of *omega*-3 polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis[J]. *Nat Med*, 2007, 13:868-873.
- [11] 杨敏,魏冰,孟橘,等. ω -3 多不饱和脂肪酸的来源及生理功能研究进展[J]. *中国油脂*, 2019, 44(10):110-115.
- [12] 祁惠芳,程子良,孔维宝,等. 亚麻籽有效成分的提取及其综合利用研究进展[J]. *中国油脂*, 2019, 44(11):102-107.
- [13] 魏晓珊. 亚麻籽营养品质特性的研究[D]. 辽宁 大连:大连海洋大学, 2015.
- [14] RANALLI A, CABRAS P, LANNUCCI E, et al. Lipochromes, vitamins, aromas and other components of virgin olive oil are affected by processing technology[J]. *Food Chem*, 2001, 73(4):445-451.
- [15] 郭胜男,刘弘毅,吴深涛. 化浊解毒方对多氯联苯暴露大鼠胰岛素抵抗及糖脂代谢的影响[J]. *吉林中医药*, 2020, 40(3):371-374.
- [16] 赵晓唐,张红艳,刘春燕,等. 两种检测小鼠血糖方法的比较[J]. *承德医学院学报*, 2007, 24(3):291-292.
- [17] 郭丹,杜宁. 白皮杉醇对糖尿病视网膜病变模型大鼠的治疗效果及作用机制[J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19(12):2026-2030.
- [18] 傅奥博,谢雨婷,何斌斌,等. 超重/肥胖 2 型糖尿病患者夜间皮质醇水平和微血管并发症的相关性分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2018, 34(10):834-838.
- [19] 杨宇航. 脂联素在早产儿视网膜病变中的作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37(10):833-838.
- [20] 邢建东,李兴. 血清脂联素和炎症因子对 2 型肥胖糖尿病患者视网膜病变的影响[J]. *中国药物与临床*, 2017, 17(6):895-897.
- [21] FU Z, LOFQVIST C A, SHAO Z, et al. Dietary *omega*-3 polyunsaturated fatty acids decrease retinal neovascularization by adipose-endoplasmic reticulum stress reduction to increase adiponectin[J]. *Am J Clin Nutr*, 2015, 101(4):879-888.
- [22] 马全鑫,陈小真,戎亦骊,等. 丹酚酸 A 改善 ZDF 大鼠视网膜病变及其作用机制[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(10):40-46.