

## · 实验研究 ·

# 丝胶对糖尿病大鼠视网膜微血管的保护作用及其作用机制

于宏飞 董志军 张铁民 杨帆

067000 承德医学院附属医院眼科

通信作者:董志军, Email: dongzj1978@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.007

**【摘要】** **背景** 糖尿病视网膜病变(DR)是一种慢性炎症性疾病,并伴有微血管病变。研究证实丝胶具有抗炎和抗氧化功能,但其是否对 DR 早期的微血管结构和功能有保护作用目前仍不十分清楚。**目的** 观察丝胶对糖尿病大鼠视网膜中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、Cx43 表达的影响,探讨其对糖尿病大鼠视网膜微血管病变的防护作用。**方法** 将 48 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠按计算机数字随机分配法分为正常对照组、糖尿病模型组、丝胶治疗组和羟苯磺酸钙阳性对照组,每组 12 只。糖尿病模型组、丝胶治疗组、羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠均采用链脲佐菌素(STZ)连续腹腔内注射 3 d 并予以高脂饲料饮食法制备糖尿病大鼠模型,成模后分别用生理盐水、2.4 g/(kg·d)丝胶溶液和 0.2 g/(kg·d)羟苯磺酸钙灌胃 3 个月。采用过量麻醉法处死大鼠并制备视网膜标本,采用苏木精-伊红染色法观察各组大鼠视网膜组织的形态学变化。分别采用 Western blot 法和逆转录 PCR 技术检测大鼠视网膜中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 蛋白及其 mRNA 的相对表达量,并对各组检测结果进行比较。**结果** 正常对照组大鼠视网膜组织结构正常,糖尿病模型组视网膜可见内界膜肿胀或断裂,偶见突出于内界膜的毛细血管内皮细胞,视网膜神经节细胞(RGCs)数量减少,丝胶治疗组和羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠视网膜内界膜轻度增厚,内外核层细胞排列稍欠规则。糖尿病模型组、丝胶治疗组和羟苯磺酸钙阳性对照大鼠视网膜中 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白相对表达量较正常对照组大鼠均明显升高,而 Cx43 相对表达量均明显下降,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与糖尿病模型组比较,丝胶治疗组大鼠视网膜中 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白相对表达量均明显降低(0.834 3 ± 0.032 1 与 0.918 9 ± 0.042 4, 0.726 4 ± 0.011 2 与 1.235 0 ± 0.078 9),而 Cx43 相对表达量明显升高(0.133 1 ± 0.015 3 与 0.039 2 ± 0.002 0),差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与正常对照组比较,糖尿病组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 和 VCAM-1 mRNA 相对表达量明显升高,而 Cx43 mRNA 表达明显下降,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与糖尿病模型组大鼠比较,丝胶治疗组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 和 VCAM-1 mRNA 相对表达量明显下降(0.716 3 ± 0.008 6 与 0.956 8 ± 0.012 5; 0.393 7 ± 0.035 0 与 0.477 9 ± 0.020 6),而 Cx43 mRNA 表达明显升高(0.676 8 ± 0.064 8 与 0.430 8 ± 0.111 3),差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),各组 ICAM-1 mRNA、VCAM-1 mRNA 和 Cx43 mRNA 相对表达量的变化趋势与其蛋白表达相同。**结论** 丝胶能够减轻糖尿病大鼠早期视网膜的微血管病变,从而对 DR 的发生和发展发挥防护作用,其机制可能是下调视网膜中 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达以及上调 Cx43 的表达。

**【关键词】** 丝胶/药物; 抗炎剂/药物; 糖尿病视网膜病变/生理病理; 基因表达; 细胞间黏附分子-1; 血管细胞黏附分子-1; 缝隙连接蛋白 43; 视网膜血管/生理病理; SD 大鼠

**Protection of sericin to retinal microvessels and its mechanism in diabetic rats** Yu Hongfei, Dong Zhijun, Zhang Tiemin, Yang Fan

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China

Corresponding author: Dong Zhijun, Email: dongzj1978@126.com

**【Abstract】** **Background** Diabetic retinopathy (DR) is a chronic inflammatory disease, with pathological changes of retinal microvessels. Studies demonstrated that sericin has anti-inflammation and anti-oxidation effects, inferring that sericin might play a protective effect on diabetic microangiopathy. **Objective** This study was to investigate the effects of sericin on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and Cx43 expressions in retina and explore the protection of sericin to retinal microangiopathy in diabetic rats. **Methods** Forty-eight specific pathogen free male SD rats were randomly divided into normal control group, diabetic model group, sericin-treated group and calcium dobesilate-treated group, with 12 rats for each group. The diabetic models were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) for 3 consecutive days and

feeding up with high lipid foods. Normal saline solution, 2.4 g/(kg·d) sericin solution and 0.2 g/(kg·d) calcium dobesilate were used by gavage administration in the rats of the diabetic model group, sericin-treated group and calcium dobesilate-treated for 3 months group, respectively. The rats were sacrificed and retinal sections were prepared, and the retinal morphology was examined by hematoxylin-eosin staining. The expressions of ICAM-1, VCAM-1 and Cx43 proteins and mRNA in retinas were detected by Western blot assay and reverse transcription PCR. The use and care of the rats complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission and ARVO statement. **Results** The retinal structure was normal in the normal control group. The swell and rupture of inter limiting membrane (ILM), scatter vascular endothelial cell nuclei breakthrough ILM and decrease of retinal ganglion cells (RGCs) were displayed in the diabetic model group; while in the sericin-treated group and calcium dobesilate-treated group, the mild thickening of ILM and disorder of retinal cells were obtained. The relative expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 were significantly raised and those of Cx43 were reduced in the diabetic model group, sericin-treated group and calcium dobesilate-treated group when compared with the normal control group (all at  $P < 0.05$ ). Compared with the diabetic model group, the expressions of ICAM-1 and VCAM-1 proteins and mRNA in the sericin-treated group were significantly reduced (ICAM-1 protein:  $0.8343 \pm 0.0321$  vs.  $0.9189 \pm 0.0424$ ; VCAM-1 protein:  $0.7264 \pm 0.0112$  vs.  $1.2350 \pm 0.0789$ ; ICAM-1 mRNA:  $0.7163 \pm 0.0086$  vs.  $0.9568 \pm 0.0125$ ; VCAM-1 mRNA:  $0.3937 \pm 0.0350$  vs.  $0.4779 \pm 0.0206$ ) and those of Cx43 protein and mRNA were evidently elevated (Cx43 protein:  $0.1331 \pm 0.0153$  vs.  $0.0392 \pm 0.0020$ ; Cx43 mRNA:  $0.6768 \pm 0.0648$  vs.  $0.4308 \pm 0.1113$ ) (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Sericin can relieve retinal microangiopathy and protect retina against the pathogenesis and development of DR by down-regulating the expressions of ICAM-1, VCAM-1 and up-regulating the expression of Cx43 in retinas of diabetic rats.

**[Key words]** Sericins/pharmacology; Anti-inflammatory agents/pharmacology; Diabetic retinopathy/physiopathology; Gene expression; Intercellular adhesion molecule-1; Vascular cell adhesion molecule-1; Connexin 43; Retinal vessels/physiopathology; Rats, Sprague-Dawley

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是常见的糖尿病微血管并发症之一, 是糖尿病患者低视力和致盲率升高的主要原因。DR 的组织病理机制复杂。近年的研究认为 DR 是一种轻度的慢性炎症性疾病, 病变早期即出现周细胞减少和视网膜基底膜增厚等微血管病变<sup>[1-3]</sup>, 黏附分子介导的白细胞黏附在 DR 的炎症性微血管病变中起始动作用<sup>[4-5]</sup>, 其中细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 是目前研究较多的黏附分子。白细胞黏附能直接损伤视网膜毛细血管内皮细胞, 从而导致血-视网膜屏障的破坏, 缝隙连接蛋白 43 (connexin43, Cx43) 是与血-视网膜屏障联系紧密的缝隙连接蛋白之一, 其介导的细胞间隙的通讯功能是维持血-视网膜屏障结构和功能正常的重要保障, 与视网膜正常血管通透性的维持密切相关<sup>[6]</sup>。丝胶是蚕茧中的一种天然蛋白质, 具有抗氧化、抗肿瘤等多种生物活性。研究发现, 丝胶能降低多种炎症因子的活化能力, 具有抗炎作用, 且不良反应较少<sup>[7]</sup>。但丝胶能否在 DR 的疾病过程中发挥重要的防治作用鲜有研究。本研究拟观察丝胶对糖尿病模型大鼠视网膜中主要的炎症相关因子 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 表达水平的影响, 探讨丝胶对糖尿病大鼠视网膜微血管病变的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 170 ~ 190 g, 鼠龄 2 ~ 3 个月 [购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号: SCXK (京) 2012-0001]。购买后大鼠饲养于承德医学院实验动物中心, 单笼饲养, 温度 22 ~ 25 °C; 湿度 50% ~ 60%; 12 h/12 h 光照与黑暗循环, 自由饮食。实验动物的饲养和使用符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》和 ARVO 的条例。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 采用正交试验法优选蚕茧中丝胶蛋白, 由彩色蚕茧经过浸泡、水煎、过滤和浓缩制成丝胶蛋白 (承德医学院蚕业研究所制备); 羟苯磺酸钙 (奥地利依比威药品有限公司); 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) (美国 Sigma 公司); 高效 RIP 组织/细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 兔抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体 (ab196171)、兔抗大鼠 VCAM-1 单克隆抗体 (ab215380)、兔抗大鼠 Cx43 单克隆抗体 (ab117843)、兔抗大鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (ab8226)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (ab6721) (英国 abcam 公司); Trizol、逆转录 PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); ICAM-1、VCAM-1、Cx43 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物模型制备及分组** 将 48 只大鼠按照计算机数字随机分配法分为正常对照组、糖尿病模型组、丝胶治疗组和羟苯磺酸钙阳性对照组,每组 12 只。正常对照组大鼠不接受任何干预,糖尿病模型组、丝胶治疗组和羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠用质量分数 2% STZ 25 mg/(kg·d) 连续腹腔内注射 3 d,配合高脂饮食,制备慢性糖尿病大鼠模型。STZ 注射 1 周后大鼠空腹血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 及出现多饮、多食、多尿特点,并逐渐出现消瘦、弓背、皮毛污秽、无光泽和生长缓慢的表现者视为造模成功。成模后糖尿病模型组给予大鼠生理盐水灌胃,按照本研究组前期研究结果<sup>[8]</sup>,给予丝胶治疗组大鼠丝胶 2.4 g/(kg·d) 空腹灌胃,每日 1 次,羟苯磺酸钙阳性对照组用羟苯磺酸钙 0.2 g/(kg·d) 空腹灌胃,每日 1 次,所有药物均连续给药 3 个月。

**1.2.2 大鼠视网膜标本制备** 3 个月干预结束后,以体积分数 10% 水合氯醛(0.5 g/kg) 行大鼠腹腔内注射以过量麻醉处死大鼠,迅速摘取双侧眼球。于动物手术显微镜下在冰面上迅速钝性分离视网膜,放置于液氮中保存。一侧眼球的视网膜用于苏木精-伊红染色,浸到质量分数 4% 多聚甲醛固定液中固定 24 h,按照常规步骤脱水、透明、浸蜡和包埋;另一侧眼球的视网膜用于 Western blot 及逆转录 PCR 检测。

**1.2.3 苏木精-伊红染色观察视网膜组织形态学表现** 行平行于视神经的连续矢状眼球切片,片厚 4  $\mu$ m。摊片、烤片后用二甲苯和梯度乙醇常规脱蜡至水,苏木精初染 2 min,用体积分数 1% 盐酸乙醇分化 5 s,体积分数 1% 氨水返蓝 5 s,体积分数 0.5% 伊红液复染 4 min,脱水、透明后用中性树胶封片。

**1.2.4 Western blot 法检测视网膜组织中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 蛋白表达** 将液氮中保存的视网膜组织称量后移至匀浆器内,在其球部将组织剪碎,加入裂解液和蛋白酶抑制剂,于冰面上匀浆器中研磨组织,提取蛋白质,用 BCA 法测蛋白浓度。蛋白煮沸变性后上样 40  $\mu$ g,于质量分数 12% SDS-PAGE 凝胶中、80 ~ 120 V 电压下电泳 2 h,将凝胶移至 PVDF 膜上,恒定电流 150 mA 冰浴中转膜 2 h;用丽春红染 PVDF 膜,观察转膜效果;4  $^{\circ}$ C 摇床上用含质量分数 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭过夜;分别加入 ICAM-1、VCAM-1、Cx43 一抗(均为 1:2 000),于室温下摇床上孵育 2 h;洗膜 3 次后加入 HRP 标记二抗(1:1 000),于室温下摇床上孵育 2 h;洗膜 3 次后以超敏型化学发光试剂发光法显影。采用 Image J 软件进行分析,以 ICAM-1、VCAM-1、Cx43 与  $\beta$ -actin 灰度比值分别作为其目的蛋白的相对

表达水平。

**1.2.5 逆转录 PCR 技术检测视网膜组织中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 mRNA 的表达** 称取液氮中冷冻保存的大鼠视网膜组织,在冰面上的匀浆器球部将组织剪碎并碾磨成粉末,按照 Trizol 总 RNA 说明书提取各组大鼠视网膜组织的总 RNA。各组均取 2  $\mu$ l RNA 上样,150 V 电压下用质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳 15 min,可见完整明显的 28S、18S 和 5S 条带时提示总 RNA 抽提比较完整;紫外分光光度计测量波长为 260 nm 和 280 nm 的吸光度( $A_{260}$  及  $A_{280}$ ), $A_{260}/A_{280}$  值为 1.9 ~ 2.1 提示 RNA 纯度很好。各组均取 2  $\mu$ l 总 RNA 为模板进行逆转录,合成 cDNA,反应条件:30  $^{\circ}$ C 反应 10 min;55  $^{\circ}$ C 反应 30 min;99  $^{\circ}$ C 反应 5 min;5  $^{\circ}$ C 反应 5 min。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 ~ 65  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,第二步起循环。ICAM-1 引物序列为:正义链:5'-ACAGACACTAGAGGACTGAGCAGG-3',反义链:5'-GTGAGCGTCCATATTTAGGCATGG-3',退火温度为 64  $^{\circ}$ C,32 个循环,产物长度为 342 bp;VCAM-1 引物序列为:正义链:5'-CCCAAGGATCCAGAGATTCA-3',反义链:5'-GGTCATTGTCACAGCACCAC-3',退火温度为 59  $^{\circ}$ C,30 个循环,产物长度为 390 bp;Cx43 引物序列为:正义链:5'-GAACACGGCAAGGTGAAGAT-3',反义链:5'-GAGCGAGAGACACCAAGGAC-3',退火温度为 56.3  $^{\circ}$ C,30 个循环,产物长度为 247 bp; $\beta$ -actin 引物序列为:正义链:5'-GAGAGGGAAATCGTGCCT-3',反义链:5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3',退火温度为 57  $^{\circ}$ C,30 个循环,产物长度为 452 bp。取 PCR 产物,2% 琼脂糖凝胶电泳,电压为 120 V,电泳结束后将凝胶置于 ZF 型紫外透射反射分析仪中,采集图像并保存结果。用 Quantity One-4.6.2 软件进行分析,目的条带 ICAM-1、VCAM-1、Cx43 mRNA 的 A 值与  $\beta$ -actin 条带 A 值比值分别作为目的基因的相对表达水平。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(序列号 449893834,美国 IBM SPSS Statistics 公司)进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间数据资料经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组单因素干预多水平实验设计,正常对照组、糖尿病模型组、丝胶治疗组和羟苯磺酸钙阳性对照组间视网膜中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 蛋白及其 mRNA 的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。



2 结果

2.1 各组大鼠的一般表现

正常对照组大鼠食量无变化,体质量为(285.32±2.64)g,皮毛有光泽。糖尿病成模后大鼠饮食量增多,但较消瘦,体质量明显减轻至(225.33±3.62)g,皮毛无光泽且污秽。丝胶治疗组用丝胶灌胃 2 周后大鼠饮食量与正常组接近,体质量逐渐增加至(261.67±2.26)g,大鼠皮毛较糖尿病模型组有光泽且光滑。羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠体质量为(262.34±1.49)g,饮食及皮毛光泽度与丝胶治疗组相似。

2.2 各组大鼠视网膜组织形态学表现

正常对照组大鼠视网膜组织结构完整且分层清晰,视网膜内界膜表面光滑,细胞形态均一,各层细胞排列整齐。糖尿病模型组大鼠视网膜结构尚完整,但分层欠清晰,视网膜内界膜肿胀,表面粗糙不平,可见部分内界膜断裂,偶见突出于内界膜的毛细血管内皮细胞,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)数量减少,细胞排列紊乱且稀疏,内核层及外核层变薄,细胞排列紊乱。丝胶治疗组和羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠视网膜组织结构完整,分层较糖尿病模型组大鼠清晰,内界膜轻度肿胀且稍增厚,RGCs 数量轻度减少,内核层和外核层细胞排列轻度紊乱(图 1)。

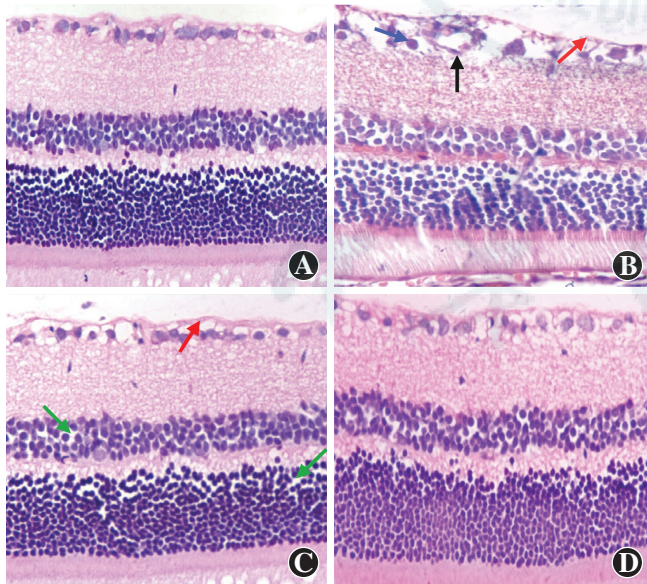


图 1 各组大鼠视网膜组织的常规组织病理学变化(HE ×400) A: 正常对照组大鼠视网膜组织结构正常 B: 糖尿病模型组大鼠视网膜内界膜肿胀或断裂(红箭头),偶见突出于内界膜的毛细血管内皮细胞(黑箭头),RGCs 数量减少(蓝箭头) C: 丝胶治疗组大鼠视网膜内界膜轻度增厚(红箭头),内核层和外核层细胞排列稍欠规则(绿箭头) D: 羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠视网膜组织病理学表现与丝胶治疗组接近

2.3 各组大鼠视网膜组织中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 蛋白的定量表达

在蛋白标志物相对分子质量 56 000、81 000、43 000 水平处分别可见 ICAM-1、VCAM-1、Cx43 特异性蛋白表达条带;在蛋白标志物相对分子质量 43 000 水平处可见 β-actin 表达条带(图 2)。与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠视网膜中 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白相对表达量均明显升高,Cx43 蛋白相对表达量明显降低,差异有统计学意义( $t=24.67、12.31、148.52$ ,均  $P<0.05$ );与糖尿病模型组大鼠比较,丝胶治疗组大鼠视网膜 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白相对表达量明显降低,而 Cx43 蛋白相对表达量明显升高,差异有统计学意义( $t=3.12、13.93、36.39$ ,均  $P<0.05$ );羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠视网膜中 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白相对表达量明显降低,而 Cx43 蛋白相对表达量明显升高,差异有统计学意义( $t=31.56、14.11、52.67$ ,均  $P<0.05$ );羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠视网膜中 ICAM-1 蛋白的相对表达量明显低于丝胶治疗组,而 Cx43 蛋白相对表达量明显高于丝胶治疗组,差异均有统计学意义( $t=28.29、17.67$ ,均  $P<0.05$ ),2 个组间 VCAM-1 蛋白的相对表达量差异无统计学意义( $t=0.1808, P>0.05$ )(表 1)。

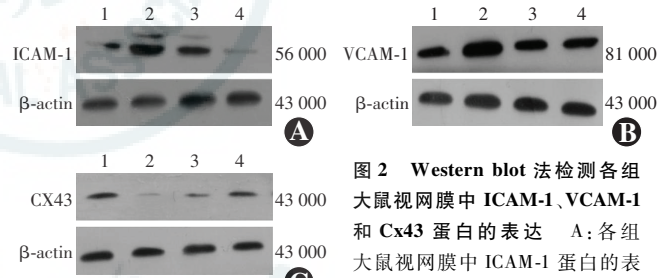


图 2 Western blot 法检测各组大鼠视网膜中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 蛋白的表达 A: 各组大鼠视网膜中 ICAM-1 蛋白的表达 B: 各组大鼠视网膜中 VCAM-1 蛋白的表达 C: 各组大鼠视网膜中 Cx43 蛋白的表达 1: 正常对照组 2: 糖尿病模型组 3: 丝胶治疗组 4: 羟苯磺酸钙阳性对照组

表 1 各组大鼠视网膜中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 蛋白相对表达量的比较( $\bar{x}±s$ )

组别	样本量	ICAM-1	VCAM-1	Cx43
正常对照组	12	0.282 4±0.030 2	0.785 6±0.012 0	0.422 4±0.014 4
糖尿病模型组	12	0.918 9±0.042 4 <sup>a</sup>	1.235 0±0.078 9 <sup>a</sup>	0.039 2±0.002 0 <sup>a</sup>
丝胶治疗组	12	0.834 3±0.032 1 <sup>abc</sup>	0.726 4±0.011 2 <sup>ab</sup>	0.133 1±0.015 3 <sup>abc</sup>
羟苯磺酸钙阳性对照组	12	0.104 4±0.006 9 <sup>ab</sup>	0.719 8±0.016 0 <sup>ab</sup>	0.178 7±0.022 1 <sup>ab</sup>
F 值		512.220	108.680	341.640
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与各自的正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与各自的糖尿病模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与各自的羟苯磺酸钙阳性对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- $t$ 检验) ICAM:细胞间黏附分子 VCAM:血管细胞黏附分子 Cx:缝隙连接蛋白

2.4 各组大鼠视网膜组织中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 mRNA 的表达



在 DNA 相对分子质量标准的 342、390、247 和 452 bp 水平处分别可见清晰的 ICAM-1、VCAM-1、Cx43 mRNA 及  $\beta$ -actin mRNA 表达条带(图 3)。与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 和 VCAM-1 mRNA 的相对表达量明显升高, Cx43 mRNA 的相对表达量明显降低,差异均有统计学意义( $t = 13.22, 5.98, 8.35$ , 均  $P < 0.05$ );与糖尿病模型组大鼠比较,丝胶治疗组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 和 VCAM-1 mRNA 的相对表达量明显降低, Cx43 mRNA 的相对表达量明显升高,差异均有统计学意义( $t = 6.58, 3.26, 4.26$ , 均  $P < 0.05$ );羟苯磺酸钙阳性对照组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 和 VCAM-1 mRNA 的相对表达量明显降低, Cx43 mRNA 的相对表达量明显升高,差异均有统计学意义( $t = 9.32, 2.80, 3.23$ , 均  $P < 0.05$ );与羟苯磺酸钙阳性对照组比较,丝胶治疗组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 的相对表达量明显升高, Cx43 mRNA 的相对表达量明显降低,差异均有统计学意义( $t = 2.73, 3.23, P < 0.05$ ),而 2 个组间 VCAM-1 mRNA 的相对表达量差异无统计学意义( $t = 0.45, P > 0.05$ )(表 2)。

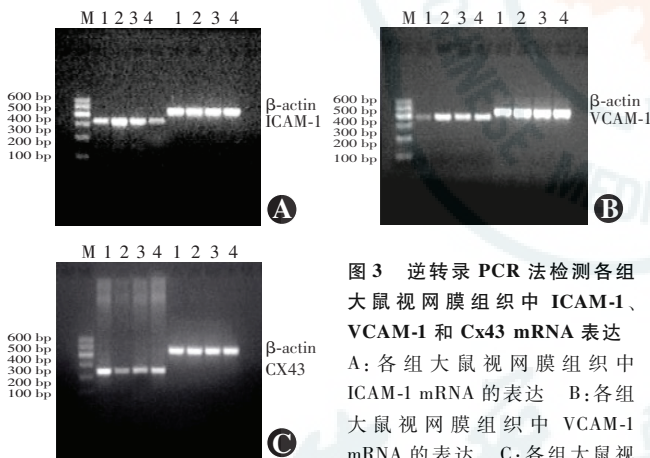


图 3 逆转录 PCR 法检测各组大鼠视网膜组织中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 mRNA 表达 A: 各组大鼠视网膜组织中 ICAM-1 mRNA 的表达 B: 各组大鼠视网膜组织中 VCAM-1 mRNA 的表达 C: 各组大鼠视网膜组织中 Cx43 mRNA 的表达 M: 相对分子质量标准 1: 正常对照组 2: 糖尿病模型组 3: 丝胶治疗组 4: 羟苯磺酸钙阳性对照组

ICAM: 细胞间黏附分子; VCAM: 血管细胞黏附分子; Cx: 缝隙连接蛋白

表 2 各组大鼠视网膜中 ICAM-1、VCAM-1 和 Cx43 mRNA 相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	ICAM-1	VCAM-1	Cx43
正常对照组	12	0.474 0 ± 0.006 7	0.323 6 ± 0.018 6	0.913 0 ± 0.024 5
糖尿病模型组	12	0.956 8 ± 0.012 5 <sup>a</sup>	0.477 9 ± 0.020 6 <sup>a</sup>	0.430 8 ± 0.111 3 <sup>a</sup>
丝胶治疗组	12	0.716 3 ± 0.008 6 <sup>abc</sup>	0.393 7 ± 0.035 0 <sup>ab</sup>	0.676 8 ± 0.064 8 <sup>abc</sup>
羟苯磺酸钙阳性对照组	12	0.616 6 ± 0.091 2 <sup>ab</sup>	0.405 5 ± 0.037 8 <sup>ab</sup>	0.763 6 ± 0.053 9 <sup>ab</sup>
F 值		57.650	13.930	24.320
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与各自的正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与各自的糖尿病模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与各自的羟苯磺酸钙阳性对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- $t$  检验) ICAM: 细胞间黏附分子 VCAM: 血管细胞黏附分子 Cx: 缝隙连接蛋白

### 3 讨论

目前越来越多的证据表明 DR 的发生和发展是一种与视网膜微血管系统病变有关的慢性炎症过程。DR 早期, ICAM-1 介导白细胞附壁、滚动、紧密黏附和移行, 导致白细胞积聚于毛细血管内形成栓子, 阻塞毛细血管并释放多种活性物质, 直接损伤视网膜血管内皮细胞<sup>[9]</sup>。VCAM-1 是血管内皮细胞活化的标志物, 在受到致炎因子刺激时在组织中的表达增加, 参与淋巴细胞的活化、迁移和造血细胞的生长发育, 并在炎症、肿瘤转移等病理过程中起重要作用, 能特异地与白细胞所产生的 Integrin 家族黏附因子 VLA-4 结合, 参与白细胞和血管内皮细胞的黏附及信号传递过程<sup>[10-12]</sup>。ICAM-1、VCAM-1 可增加血管内皮细胞的黏性, 促使白细胞黏附于视网膜毛细血管, 损伤视网膜毛细血管内皮细胞, 破坏血-视网膜屏障, 诱发视网膜微血管病变<sup>[13-15]</sup>。细胞间隙的正常通讯功能也是维持血-视网膜屏障生理功能的重要保障<sup>[16]</sup>, Cx43 是重要的缝隙连接蛋白之一。研究表明, 高血糖状态下 Cx43 表达下调, 导致细胞间隙通讯信号的减弱, 还可能通过磷酸化后降解阻断基于蛋白体酶机制的信号转导通路, 导致血管内皮细胞结构的改变<sup>[17-19]</sup>, 从而破坏血-视网膜屏障, 诱发视网膜微血管病变。丝胶作为一种天然蛋白质, 其抗氧化、抗肿瘤和抗炎等多种生物活性越来越多地引起人们的重视。为了研究丝胶是否能够缓解 DR 的炎症过程及其作用机制, 本研究采用 STZ 大鼠腹腔内注射联合高脂饮食法制备慢性糖尿病模型, 并应用丝胶进行干预, 以探讨丝胶对慢性糖尿病大鼠视网膜的作用。

本研究中发现, 糖尿病模型组大鼠视网膜中 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达从基因转录水平和蛋白水平均较正常对照组大鼠明显上调, 在高血糖状态下, 视网膜微循环血流动力学变化, 促使内皮细胞表达 ICAM-1、VCAM-1, 破坏血-视网膜屏障。本研究中还发现, 糖尿病模型组大鼠视网膜 Cx43 表达水平较正常组明显降低, 因为 Cx43 作为血管内皮细胞间、周细胞间、血管内皮细胞和周细胞间的重要缝隙连接蛋白, 可能对高血糖和 ICAM-1、VCAM-1 等炎性因子刺激做出应答, 通过低表达及磷酸化降解等途径降低视网膜毛细血管细胞间隙通讯功能, 加速血-视网膜屏障的功能和结构损伤, 诱发和加重视网膜微血管病变。

丝胶是蚕茧外围的重要组成成分, 其被覆在中心的丝素上将蚕丝蛋白纤维胶合在一起, 是一种天然高分子水溶性蛋白, 主要由丝氨酸、天冬氨酸和甘氨酸等

18 种氨基酸组成,具有抗氧化、抗肿瘤、抗衰老等功效,耐热性能良好<sup>[20-21]</sup>。研究表明丝胶能有效降低糖尿病大鼠的血糖水平,对糖尿病大鼠肾脏微血管病变具有保护作用<sup>[22]</sup>。羟苯磺酸钙是临床疗效比较确切的 DR 微血管保护剂,能有效改善视网膜的微循环障碍,稳定并改善病情。本研究中发现,丝胶治疗组大鼠视网膜 ICAM-1、VCAM-1 的表达水平明显低于糖尿病模型组,提示丝胶可能通过下调 ICAM-1、VCAM-1 的表达而抑制白细胞黏附聚集和多种炎症因子的活化,减轻视网膜毛细血管内皮细胞的损伤;本研究中还显示丝胶治疗组大鼠视网膜中 Cx43 的表达上调,从而减轻血-视网膜屏障损害,对糖尿病大鼠视网膜微血管病变发挥保护作用。由此可见,丝胶可能在 DR 形成的早期即对视网膜发挥防治优势,抑制糖尿病大鼠视网膜炎症因子的表达,上调缝隙连接蛋白 Cx43 的表达,从而保护视网膜微血管的结构和功能,为预防 DR 的发生和发展提供了新的思路。因 DR 发病机制较为复杂,本研究仅从单因子研究的角度进行探讨,研究结果可能存在一定的局限性,丝胶对 DR 的保护作用及作用机制仍需进一步探索。

## 参考文献

- [1] Tomić M, Ljubić S, Kastelan S. The role of inflammation and endothelial dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. Coll Antropol, 2013, 37 Suppl 1 : 51-57.
- [2] El-Asrar AM. Role of inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. Mid East Afr J Ophthalmol, 2012, 19 (1) : 70-74. DOI: 10. 4103/0974-9233. 92118.
- [3] Guess M, Dubovy SR. Histopathology of diabetic retinopathy [M]// Scott IU, Flynn HW, Smiddy WE. Diabetes and ocular disease: past, present, and future therapies. Oxford University Press, 2010 : 25-48.
- [4] Noda K, Nakao S, Zandi S, et al. Retinopathy in a novel model of metabolic syndrome and type 2 diabetes: new insight on the inflammatory paradigm [J]. FASEB J, 2014, 28 (5) : 2038-2046. DOI: 10. 1096/fj. 12-215715.
- [5] Jousseaume AM, Poulaki V, Qin W, et al. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion *in vivo* [J]. Am J Pathol, 2002, 160 (2) : 501-509. DOI: 10. 1016/S0002-9440 (10) 64869-9.
- [6] Tien T, Muto T, Barrette K, et al. Downregulation of Connexin 43 promotes vascular cell loss and excess permeability associated with the development of vascular lesions in the diabetic retina [J/OL]. Mol Vis, 2014, 20 : 732-741 [2016-6-10]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4043608/.
- [7] Aramwit P, Towiwat P, Srichana T. Anti-inflammatory potential of silk sericin [J]. Nat Prod Commun, 2013, 8 (4) : 501-504.
- [8] 宋成军, 张艳, 和亚强, 等. 丝胶对 2 型糖尿病大鼠海马蛋白激酶 B 信号转导通路的作用 [J]. 解剖学报, 2014, 45 (1) : 31-36. DOI: 10. 3969/j. issn. 0529-1356. 2014. 01. 006.  
Song CJ, Zhang Y, He YQ, et al. Effects of sericin on Akt signal transduction pathway of hippocampus of the rat with diabetes mellitus [J]. Acta Anatomica Sinica, 2014, 45 (1) : 31-36. DOI: 10. 3969/j. issn. 0529-1356. 2014. 01. 006.
- [9] Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96 (19) : 10836-10841.
- [10] Gustavsson C, Agardh CD, Zetterqvist AV, et al. Vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in mice retinal vessels is affected by both hyperglycemia and hyperlipidemia [J/OL]. PLoS One, 2010, 5 (9) : e12699 [2016-10-20]. http://journals.plos.org/plosone/article? id = 10. 1371/journal.pone. 0012699. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0012699.
- [11] Garmy-Susini B, Jin H, Zhu Y, et al. Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation [J]. J Clin Invest, 2005, 115 (6) : 1542-1551. DOI: 10. 1172/JCI23445.
- [12] Hafezi-Moghadam A, Noda K, Almulki L, et al. VLA-4 blockade suppresses endotoxin-induced uveitis: *in vivo* evidence for functional integrin up-regulation [J]. FASEB J, 2007, 21 (2) : 464-474. DOI: 10. 1096/fj. 06-6390com.
- [13] Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94 (9) : 3171-3182. DOI: 10. 1210/jc. 2008-2534.
- [14] 周纯, 牛佳媛, 蔡洁, 等. 糖尿病视网膜病变细胞因子及视网膜血流变化的意义 [J]. 国际眼科杂志, 2015, 15 (6) : 1030-1032. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2015. 6. 25.  
Zhou C, Niu JY, Cai J, et al. Study on the change of cytokines and retinal blood flow index for patients with diabetic retinopathy [J]. Int Eye Sci, 2015, 15 (6) : 1030-1032. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2015. 6. 25.
- [15] Jousseaume AM, Poulaki V, Le ML, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. FASEB J, 2004, 18 (12) : 1450-1452. DOI: 10. 1096/fj. 03-1476fje.
- [16] Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions [J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, (11) : a002576 [2015-12-23]. http://cshperspectives.cshlp.org/content/1/1/a002576.long. DOI: 10. 1101/cshperspect.a002576.
- [17] Fernandes R, Girão H, Pereira P. High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependent mechanism [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (26) : 27219-27224. DOI: 10. 1074/jbc. M400446200.
- [18] Tien T, Muto T, Zhang J, et al. Association of reduced Connexin 43 expression with retinal vascular lesions in human diabetic retinopathy [J]. Exp Eye Res, 2016, 146 : 103-106. DOI: 10. 1016/j. exer. 2015. 12. 011.
- [19] Bobbie MW, Roy S, Trudeau K, et al. Reduced connexin 43 expression and its effect on the development of vascular lesions in retinas of diabetic mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (7) : 3758-3763. DOI: 10. 1167/iovs. 09-4489.
- [20] Dash R, Acharya C, Bindu PC, et al. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts [J]. BMB Rep, 2008, 41 (3) : 236-241.
- [21] 钟蕾, 张晓峰, 孙正太, 等. 丝素膜移植兔眼原位重建的研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29 (11) : 968-972. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 11. 003.  
Zhong L, Zhang XF, Sun ZT, et al. Experimental study on the eyelid reconstruction *in situ* with the silk fibroin membrane [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29 (11) : 968-972. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 11. 003.
- [22] 郝祥俊, 于晓敏, 宋成军, 等. 丝胶对糖尿病大鼠肾脏 ERK 信号通路的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2013, 42 (1) : 60-64. DOI: 10. 3969/j. issn. 0258-4646. 2013. 01. 017.  
Hao XJ, Yu XM, Song CJ, et al. Effects of Sericin on ERK Signaling pathway of diabetic rats' kidney [J]. J Chin Med Univ, 2013, 42 (1) : 60-64. DOI: 10. 3969/j. issn. 0258-4646. 2013. 01. 017.

(收稿日期: 2016-12-04)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)