

· 实验研究 ·

神经生长因子玻璃体腔注射对早期糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的保护作用

吕航¹ 王启常² 唐罗生³¹中南大学爱尔眼科学院,长沙 410000; ²长沙湘江爱尔眼科医院,长沙 410000; ³中南大学湘雅二医院眼科,长沙 410000

通信作者:王启常,Email:wqc1115@sina.com

【摘要】 目的 探讨玻璃体腔注射神经生长因子(NGF)对早期糖尿病大鼠视网膜神经节细胞(RGC)的保护作用及其可能机制。**方法** 取 SD 大鼠按照随机数字表法分为正常对照组、糖尿病模型组、磷酸盐缓冲液(PBS)组和 NGF 组,每组各 6 只,其中糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组大鼠用链脲佐菌素(STZ)腹腔内注射建立糖尿病大鼠动物模型,正常对照组大鼠常规培养。PBS 组及 NGF 组建模成功后 4 周玻璃体腔分别注射 PBS 和 NGF(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)各 2 μl ,均取右眼为实验眼,每周注射 1 次,连续 4 周。给药 4 周后使用 Phoenix Micron IV 小动物视网膜成像系统观察各组大鼠视网膜微血管病变,各组过量麻醉法处死 1 只大鼠眼球制备超薄切片,透射电子显微镜下观察;取 5 只大鼠眼球制备视网膜石蜡切片,TUNEL 法观察 RGC 凋亡指数,免疫组织化学法分析 RGC bcl-2 蛋白及 bax 蛋白的表达。**结果** 糖尿病模型大鼠体重较正常对照组明显减轻,进食进水及尿量明显增多。各组大鼠造模后 4 周体重和血糖值比较,差异均有统计学意义($F=202.352, 148.444$,均 $P<0.001$)。早期糖尿病大鼠眼底照相显示,未见明显糖尿病视网膜微血管病变,透射电子显微镜下可见糖尿病模型组及 PBS 组较正常对照组 RGC 数目明显减少,细胞膜皱缩,细胞质浓缩,细胞器水肿,染色质边集明显,凋亡增加,NGF 组 RGC 损害较糖尿病模型组及 PBS 组轻;正常对照组、糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组的凋亡指数分别为(3.88 $\pm$ 1.28)%、(92.56 $\pm$ 1.58)%、(92.64 $\pm$ 2.30)%和(59.34 $\pm$ 3.89)%,各组凋亡指数总体比较差异有统计学意义($F=854.554, P<0.001$);糖尿病模型组 RGC 凋亡指数较正常对照组明显增加,NGF 组 RGC 凋亡指数较糖尿病模型组及 PBS 组明显减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);正常对照组、糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组的 bcl-2 蛋白表达量分别为 38.11 $\pm$ 1.01、22.38 $\pm$ 3.90、23.04 $\pm$ 3.14 和 84.69 $\pm$ 1.45,总体比较差异有统计学意义($F=366.206, P<0.001$)。正常对照组、糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组的 bax 蛋白表达量分别为 4.22 $\pm$ 1.89、56.59 $\pm$ 6.67、56.30 $\pm$ 8.51 和 26.19 $\pm$ 2.44,总体比较差异有统计学意义($F=61.435, P<0.001$)。糖尿病模型组较正常对照组 bcl-2 蛋白表达明显减少,bax 蛋白表达明显增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。NGF 组 bcl-2 蛋白表达较 PBS 组及糖尿病模型组明显升高,bax 蛋白表达明显下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 早期糖尿病大鼠在眼底照相未发现糖尿病视网膜微血管病变时就已经发生 RGC 超微结构的损害。玻璃体腔注射 NGF 可能通过抑制糖尿病模型大鼠 RGC 的凋亡对视网膜神经元发挥保护作用。

【关键词】 神经生长因子;糖尿病;神经保护;大鼠;玻璃体腔注射;神经节细胞**基金项目:** 长沙市科学技术局项目(kh1801230)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.005

Protective effects of intravitreal injection of nerve growth factor on retinal ganglion cells in early diabetic ratsLyu Hang¹, Wang Qichang², Tang Luosheng³¹AIER School of Ophthalmology Central South University, Changsha 410000, China; ²Changsha Xiangjiang AIER Eye Hospital, Changsha 410000, China; ³Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410000, China

Corresponding author: Wang Qichang, Email:wqc1115@sina.com

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of intravitreal injection of nerve growth factor (NGF) on apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs) in early diabetic rats and its possible mechanism. **Methods** SD rats were divided into normal control group, diabetic model group, phosphate buffer solution (PBS) group and NGF group according to random number table method, with each group contain 6 rats. The rats in diabetic model group, PBS group and NGF group were injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ) to establish diabetic rat model. After 4 weeks of modeling, 2 μl PBS and 2 μl NGF (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were injected into the vitreous cavity in PBS group and NGF group, respectively. The right eyes served as the experimental eyes, inject once a week for 4 weeks. After 4 weeks of injection, the retina microangiopathy of each group was observed by Phoenix Micron IV small animal retinal imaging

system. After high dose anesthesia, the eyeball of one rat from each group was taken to prepare ultrathin sections and observed by transmission electron microscopy. Five rat eyeballs were taken to prepare retinal paraffin sections from each groups. The RGC apoptotic index was observed by TUNEL method. The expressions of RGC bcl-2 protein and bax protein were analyzed by immunohistochemistry. This study was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Central South University, and the experimental procedures were in accordance with the National Institutes of Health (NIH) guidelines for the Care and Use of Laboratory, and follow the 3R principle. **Results** The weight of the diabetic model rats was significantly lower than that of the normal group, and the intake of water and food were significantly increased, the urine volume was also increased. The body weight and blood glucose level of the rats were significantly different among different groups after 4 weeks of modeling ($F = 202.352, 148.444$, both at $P < 0.001$). Fundus photography of early diabetic rats showed no obvious diabetic retinal microangiopathy. The numbers of RGC in the diabetic model group and PBS group were significantly lower than that in the normal control group under the transmission electron microscope. The membrane shrinkage, cytoplasmic condensation, organelle edema, chromatin peripheral collection were obvious and the cell apoptosis number was increased. The RGC lesions in the NGF group were lighter than those in the diabetic model group and PBS group. The apoptotic indexes in the normal control group, diabetic model group, PBS group and NGF group were $(3.88 \pm 1.28)\%$, $(92.56 \pm 1.58)\%$, $(92.64 \pm 2.30)\%$ and $(59.34 \pm 3.89)\%$, respectively, the overall difference of apoptotic index between the four groups was statistically significant ($F = 854.554, P < 0.001$); the RGC apoptotic index of the diabetic model group was significantly higher than that of the normal control group. The RGC apoptotic index of the NGF group was significantly lower than that of the diabetic model group and PBS group (both at $P < 0.05$). The expression levels of bcl-2 protein in normal control group, diabetic model group, PBS group and NGF group were 38.11 ± 1.01 , 22.38 ± 3.90 , 23.04 ± 3.14 and 84.69 ± 1.45 , respectively, with a significant difference among the groups ($F = 366.206, P < 0.001$). The expression levels of bax protein in normal control group, diabetes model group, PBS group and NGF group were 4.22 ± 1.89 , 56.59 ± 6.67 , 56.30 ± 8.51 and 26.19 ± 2.44 , respectively, with a significant difference among the groups ($F = 61.435, P < 0.001$). The expression of bcl-2 protein in the diabetic model group was significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.05$), and the expression of bax protein was significantly increased ($P < 0.05$). The expression of bcl-2 protein in NGF group was significantly higher and the expression of bax protein was significantly lower than those in the PBS group and diabetic model group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** The ultrastructural damage of RGCs has occurred in early diabetic rats without diabetic retinal microangiopathy. Intravitreal injection of NGF may produce retinal neuroprotective effects by inhibiting apoptosis of RGCs in diabetic rats.

[Key words] Nerve growth factor; Diabetes; Neuroprotection; Rat; Intravitreal injection; Retinal ganglion cells

Fund program: Changsha Science and Technology Bureau Project (kh1801230)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.005

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是全球范围内不可逆盲的主要病因之一, 是一种高血糖引起的慢性视网膜微血管疾病^[1]。近年来研究发现 DR 早期出现视网膜神经细胞的损害, 其中视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 的功能障碍和凋亡出现最早^[2]。神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 是一种重要的神经保护因子, 可以稳定神经结构蛋白微管素的 mRNA, 抑制神经细胞凋亡, 维持成熟效应神经元的功能及结构完整。在高血糖环境下, 细胞内毒性成分的增加与神经保护因子的减少共同加剧了视网膜神经元的损害^[3-4]。NGF 在视网膜中的受体主要有高亲和力的 Trk 受体和低亲和力的 p75 (NTR) 受体两类。其中, Trk 类受体有促视网膜神经细胞存活的作用, p75 (NTR) 受体有诱导视网膜神经细胞凋亡的作用。增加外源性 NGF 可以促进视网膜高亲和力受体 Trk 类的表达, 促进视网膜神经细胞的存活^[5]。目前对 DR 的关注主要集中在视网膜微血管病变上, 而对视网

膜神经细胞保护的研究较少。本研究中通过动物实验的方法观察玻璃体腔注射 NGF 对早期糖尿病大鼠 RGC 的保护作用, 并探讨其可能的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量 170 g ~ 200 g, 购自湖南斯莱克景达公司, 普通颗粒饲料喂养, 自由饮水。12 h/12 h 明暗循环光照, 饲养环境相对温度为 25 ℃, 相对湿度为 (50±5) ℃。本研究获得中南大学实验动物伦理委员会批准。实验动物的使用遵守美国国立卫生研究院颁布的实验动物使用和护理原则以及 3R 原则。

1.1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) (美国 Sigma 公司); TUNEL 试剂盒 (瑞士 Roche 公司); NGF、小鼠抗 bcl-2 单克隆抗体 (MAB8272) (美国 RD 公司); HRP 标记山羊抗小鼠二抗 (G23301)、兔

抗 bax 单克隆抗体 (Gb11007)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (G23303) (武汉赛维尔生物科技有限公司)。33G 微量注射器 (瑞士 Hamilton 公司); Phoenix Micron IV 小动物视网膜成像系统 (美国 Phoenix Research 公司); HT-7700 透射电子显微镜 (日本日立高新技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型建立及分组处理 将大鼠按照随机数字表法分为正常对照组、糖尿病模型组、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 组和 NGF 组, 每组各 6 只, 取糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组大鼠过夜禁食 12 h 后, 用新鲜配置 pH 4.5 的 0.1 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液稀释 STZ, 按 60 mg/kg 一次性腹腔内注射诱导建立糖尿病大鼠模型, 正常对照组以等容积枸橼酸盐缓冲液行腹腔内注射。STZ 注射后 3 d 检测大鼠尾静脉血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为建模成功。每 14 天称大鼠体质量, 检测鼠尾静脉血糖。造模成功后 4 周, PBS 组和 NGF 组大鼠分别使用复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳, 均取右眼为实验眼, 体积分数 10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔内注射麻醉, 盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉, 待瞳孔充分扩大, 在光学显微镜下, 使用 33G 微量注射器在 2 个组大鼠角膜缘后约 1 mm 处垂直进针, 分别注射 PBS 和 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF 各 2 μl , 缓慢注射后停留约 30 s 拔针。每周注射 1 次, 连续注射 4 周。注射后 3 d 对大鼠进行眼部检查, 剔除已有白内障、玻璃体积血、视网膜脱离等眼部病变者, 并补齐大鼠。

1.2.2 Phoenix Micron IV 小动物视网膜成像系统观察眼底 各组大鼠于分组处理后 4 周, 复方托吡卡胺滴眼液点右眼扩瞳后 10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔内注射麻醉, 盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉, 瞳孔充分扩大后, 滴加玻璃酸钠滴眼液湿润眼球, 参照 Phoenix Micron IV 仪器操作流程, 调整镜头与 SD 大鼠瞳孔的距离和方位, 使视盘及大血管成像最清晰, 观察眼底并拍摄图片。

1.2.3 透射电子显微镜下观察 RGC 超微结构 大鼠分组处理后 4 周, 每组各取 1 只大鼠过量麻醉法处死, 取眼球分离出视网膜神经上皮层, 体积分数 2.5% 戊二醛固定, 0.1 mol/L 磷酸漂洗液漂洗 3 次, 体积分数 1% 锇酸固定液固定 1 h, 0.1 mol/L 磷酸漂洗液漂洗 3 次。体积分数 50%、70%、90% 和 100% 丙酮逐级脱水。纯丙酮与包埋液等容积混合后 37 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 12 h, 纯包埋液 37 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 12 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内过夜, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内 12 h。使用超薄切片机切片, 切片厚 50 μm , 质量分数 3% 乙酸铀及硝酸铅双染色, HT-7700 型透射电子显微镜观察并拍照。

1.2.4 苏木精-伊红染色观察 RGC 形态变化 大鼠分组处理后 4 周, 每组各取 5 只过量麻醉法处死后取视网膜行常规石蜡包埋。石蜡切片脱蜡至水, 常规苏木精-伊红染色, 脱水封片, 光学显微镜下观察 RGC 的形态及结构变化, 并采集图像进行分析。

1.2.5 TUNEL 染色观察 RGC 凋亡指数 取各组石蜡切片脱蜡水化后, 用免疫组织化学笔画圈并滴加蛋白酶 K 工作液覆盖组织, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 25 min。PBS (pH 7.4) 重复洗涤 3 次。切片稍甩干后滴加破膜工作液, 室温下孵育 20 min, PBS 重复洗涤 3 次。取 TUNEL 试剂盒内试剂 1 (TdT) 和试剂 2 (dUTP) 按容积比 1:9 混合后覆盖组织, 切片置于湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 2 h。PBS 重复洗涤 3 次后滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min。PBS 重复洗涤 3 次后封片。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。TUNEL 染色阳性凋亡细胞核呈绿色荧光, DAPI 核染呈蓝色荧光。将染色结果用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行半定量分析, 各组 5 个标本各 1 张铺片, 400 倍视野下任意选择 5 个视野进行拍照, 以 RGC 层为观察边框, 计算凋亡指数。凋亡指数 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 免疫组织化学法观察 RGC 的 bcl-2 蛋白及 bax 蛋白表达量 取各组石蜡切片脱蜡水化后置于含枸橼酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0) 的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。修复完成后放入体积分数 3% 双氧水溶液室温孵育 25 min, PBS 重复洗涤 3 次。滴加质量分数 3% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 均匀覆盖组织, 室温封闭 30 min。分别滴加 bcl-2 一抗 (1:50)、bax 一抗 (1:3 000), 于湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 中重复洗涤 3 次, 稍甩干后滴加相应 HRP 标记的二抗覆盖组织, 室温孵育 50 min。PBS 重复洗涤 3 次后滴加新鲜配制的 DAB 显色液, 显微镜下控制显色时间, 自来水冲洗切片终止显色。苏木素复染细胞核, 脱水封片。光学显微镜下以 RGC 层为观察边框, 各组 5 个标本各 1 张铺片, 400 倍视野下任意选择 5 个视野进行拍照, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析照片, 计算阳性的吸光度 (A) 值并分别分析组织中 bcl-2 蛋白及 bax 蛋白的表达情况以及 bcl-2/bax 比值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的计量资料经 W 检验呈正态分布, 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。各组各测量参数均数总体比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠基本情况

正常对照组大鼠精神状态佳,毛皮有光泽,活动自如,进食、进水及尿量无明显异常,血糖稳定,体质量渐增。糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组大鼠精神状态差,毛皮发黄,光泽度差,活动较少,进食、进水及尿量均明显增加,持续高血糖,同时体质量明显减轻。各组大鼠造模后 4 周体质量和血糖值总体比较,差异均有统计学意义($F=202.352, 148.444$, 均 $P<0.001$) (表 1)。

表 1 各组大鼠造模后 4 周体质量和血糖值比较 (mean±SD)

组别	样本量	体质量 (g)	血糖值 (mmol/L)
正常对照组	6	383.22±14.10	5.84±0.60
糖尿病模型组	6	230.98±8.10 ^a	28.06±2.33 ^a
PBS 组	6	238.46±4.07 ^a	28.36±2.72 ^a
NGF 组	6	236.26±16.16 ^a	28.68±1.98 ^a
<i>F</i> 值		202.352	148.444
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

PBS:磷酸盐缓冲液;NGF:神经生长因子

2.2 各组大鼠眼底情况

Phoenix Micron IV 眼底照相系统观察各组大鼠均未见明显视网膜微血管病变 (图 1)。

2.3 各组大鼠视网膜组织病理学改变

正常对照组 RGC 结构清晰,视网膜各层结构未发生明显改变;糖尿病模型组和 PBS 组 RGC 明显减少,少量细胞染色质边集,视网膜各层结构未发生明显改变;NGF 组 RGC 排列紧密,少量细胞染色质边集,视网膜各层结构未发生明显改变 (图 2)。

2.4 各组大鼠视网膜超微结构改变

正常对照组 RGC 体积中等,细胞膜完整,染色质丰富、分布均匀,线粒体、内质网、核糖体未见明显异常;糖尿病模型组和 PBS 组 RGC 数目明显减少,细胞膜皱缩,细胞质浓缩,细胞器水肿,染色质边集明显,出现细胞凋亡;NGF 组 RGC 数目轻度减少,染色质未见明显边集 (图 3)。

2.5 各组大鼠 RGC 凋亡情况及 bcl-2、bax 蛋白表达变化

荧光显微镜下观察可见, TUNEL 染色阳性凋亡细胞核呈绿色荧光, DAPI 核染呈蓝色荧光。正常对照组

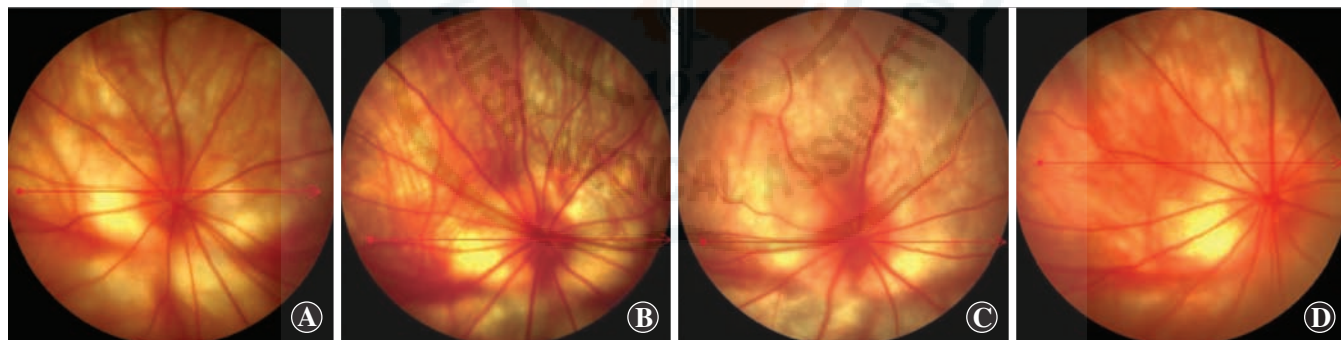


图 1 各组大鼠眼底照片 4 个组均未见明显视网膜微血管病变 A:正常对照组 B:糖尿病模型组 C:PBS 组 D:NGF 组

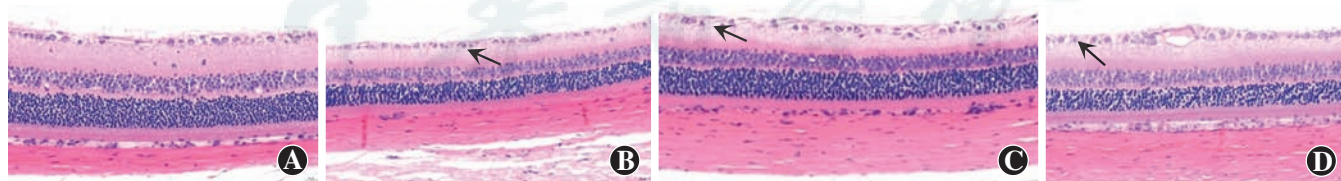


图 2 各组大鼠视网膜组织病理学染色结果 (HE ×400) A:正常对照组视网膜各层结构未发生明显改变 B:糖尿病模型组 RGC 染色质边集 (箭头) C:PBS 组 RGC 染色质边集 (箭头) D:NGF 组少量细胞染色质边集 (箭头), 视网膜各层结构未发生明显改变

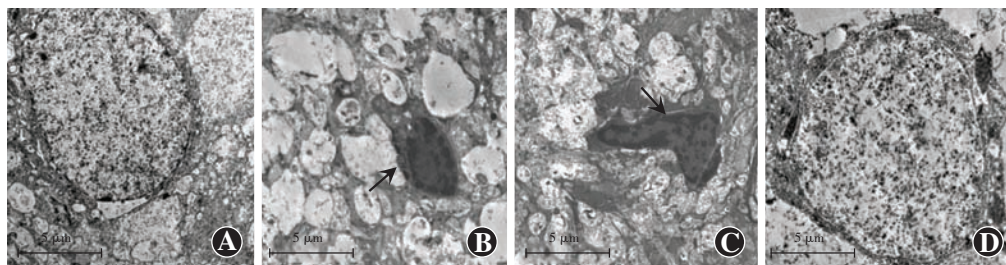


图 3 透射电子显微镜观察各组大鼠视网膜超微结构 (标尺 = 5 μm) A:正常对照组 RGC 结构完整 B:糖尿病模型组染色质明显边集 (箭头) C:PBS 组染色质明显边集 (箭头) D:NGF 组染色质未见明显边集

大鼠 RGC 层可见散在 TUNEL 阳性细胞;糖尿病模型组和 PBS 组 RGC 层可见大量 TUNEL 阳性细胞;NGF 组 RGC 层 TUNEL 阳性细胞数较 PBS 组和糖尿病模型组减少(图 4)。

正常对照组大鼠 RGC 层可见部分 bcl-2 阳性表达

和少量 bax 阳性表达;糖尿病模型组及 PBS 组 RGC 层可见少量 bcl-2 阳性表达,bax 阳性表达量较正常对照组明显增加;NGF 组 RGC 层 bcl-2 阳性表达量较糖尿病模型组及 PBS 组明显增加、bax 阳性表达量较糖尿病模型组及 PBS 组明显减少(图 5)。

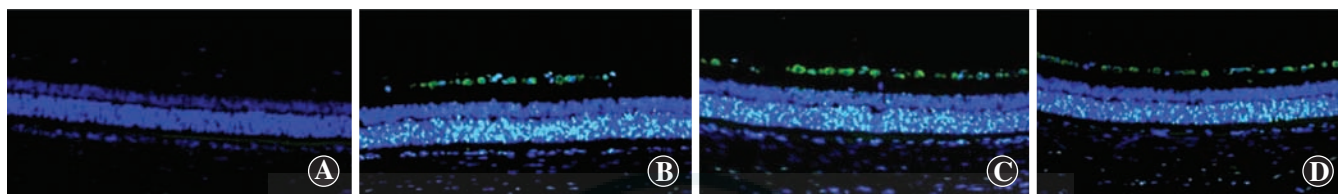


图 4 各组大鼠 RGCs 凋亡情况比较($\times 400$) TUNEL 染色阳性凋亡细胞核呈绿色荧光(FITC),细胞核呈蓝色荧光(DAPI) A:正常对照组未见明显 RGC 凋亡 B:糖尿病模型组可见大量 RGC 凋亡 C:PBS 组可见大量 RGC 凋亡 D:NGF 组可见部分 RGC 凋亡

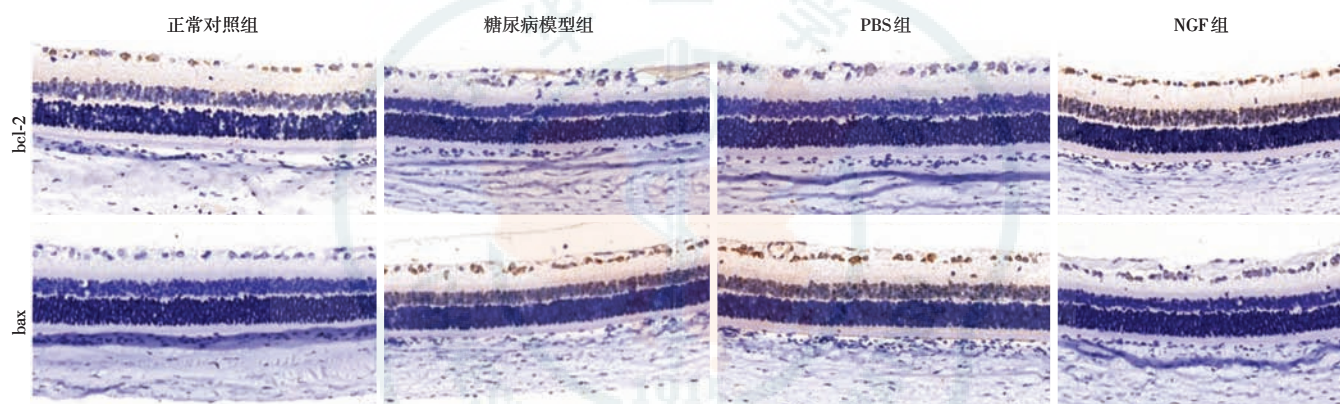


图 5 各组大鼠 bcl-2 蛋白、bax 蛋白表达情况($\times 400$) bcl-2 蛋白及 bax 蛋白阳性表达为棕黄色,苏木素染细胞核为蓝色 正常对照组 RGC 部分表达 bcl-2,散在表达 bax;糖尿病模型组少量表达 bcl-2,bax 表达明显增加;PBS 组少量表达 bcl-2,bax 表达明显增加;NGF 组 bcl-2 表达较多,少量表达 bax PBS:磷酸盐缓冲液;NGF:神经生长因子

正常对照组、糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组的凋亡指数总体比较,差异有统计学意义($F = 854.554$, $P < 0.001$);与正常对照组相比,糖尿病模型组及 PBS 组凋亡指数明显增加,NGF 组凋亡指数较糖尿病模型组及 PBS 组明显减低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);糖尿病模型组与 PBS 组凋亡指数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常对照组、糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组的 bcl-2 相对表达量总体比较,差异有统计学意义($F = 366.206$, $P < 0.001$);糖尿病模型组及 PBS 组 bcl-2 蛋白含量较正常对照组含量明显降低,NGF 组 bcl-2 蛋白含量较糖尿病模型组及 PBS 组明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);糖尿病模型组与 PBS 组 bcl-2 蛋白含量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常对照组、糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组的 bax 相对表达量总体比较,差异有统计学意义($F = 61.435$, $P < 0.001$),其中糖尿病模型组及 PBS 组 bax 蛋白含量较正常对照组和 NGF 组含量明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);糖尿病模

型组与 PBS 组 bax 蛋白含量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常对照组、糖尿病模型组、PBS 组和 NGF 组的 bcl-2/bax 比值总体比较,差异有统计学意义($F = 12.955$, $P = 0.002$);糖尿病模型组及 PBS 组 bcl-2/bax 比值较正常对照组和 NGF 组明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);糖尿病模型组与 PBS 组 bcl-2/bax 比值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

表 2 各组大鼠 RGC 凋亡指数、bcl-2 蛋白表达量、bax 蛋白表达量及 bcl-2/bax 比值比较(mean $\pm$ SD)

组别	样本量	凋亡指数	bcl-2 蛋白	bax 蛋白	bcl-2/bax
正常对照组	5	3.88 $\pm$ 1.28	38.11 $\pm$ 1.01	4.22 $\pm$ 1.89	10.33 $\pm$ 4.50
糖尿病模型组	5	92.56 $\pm$ 1.58 ^a	22.38 $\pm$ 3.90 ^a	56.59 $\pm$ 6.67 ^a	0.39 $\pm$ 0.02 ^a
PBS 组	5	92.64 $\pm$ 2.30 ^a	23.04 $\pm$ 3.14 ^a	56.30 $\pm$ 8.51 ^a	0.41 $\pm$ 0.05 ^a
NGF 组	5	59.34 $\pm$ 3.89 ^{ab}	84.69 $\pm$ 1.45 ^{ab}	26.19 $\pm$ 2.44 ^{ab}	3.25 $\pm$ 0.31 ^{ab}
F 值		854.554	366.206	61.435	12.955
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.002

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与糖尿病模型组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) RGC:视网膜神经节细胞;PBS:磷酸盐缓冲液;NGF:神经生长因子

3 讨论

研究表明在眼底未见明显糖尿病视网膜微血管病变之前,可以观察到视网膜的结构病理改变和功能改变^[6-7],主要有毛细血管周细胞数量减少、毛细血管闭塞、基底膜增厚、血管渗漏,还伴有神经细胞凋亡、胶质细胞活化、视神经纤维数量减少、髓鞘脱失等改变。DR 可被认为是一种神经血管性疾病。啮齿类动物视网膜神经胶质结构及血管系统与人类相似,能模拟部分人类非增生性 DR 的早期特征^[8],故本研究选取 SD 大鼠建立早期糖尿病动物模型。

糖尿病早期常伴随着视觉电生理指标的改变^[9],色觉、对比敏感度降低以及视网膜电图异常均提示早期视网膜神经细胞的损害。糖尿病大鼠成模后 4 周视网膜内丛状层厚度减少 10%^[10],成模后 7.5 个月内丛状层厚度减少了 22%^[11],提示视网膜神经细胞进行性丧失。Park 等^[12]研究发现,糖尿病大鼠建模 1 周即可出现视网膜细胞突触变性,建模后 4 周起出现 RGC、感光细胞以及无长突细胞的凋亡。本研究表明,糖尿病建模 8 周的大鼠彩色眼底照相及苏木精-伊红染色均未见明显视网膜微血管病变,透射电子显微镜下观察发现视网膜 RGC 出现明显凋亡,与正常对照组相比 RGC 数目明显减少,细胞膜皱缩,细胞质浓缩,线粒体水肿,染色质边集明显;TUNEL 染色及免疫组织化学染色显示,与正常对照组相比,糖尿病模型组凋亡指数明显增加,bcl-2 蛋白含量降低,bax 蛋白含量增加,bcl-2/bax 比值降低,提示高糖环境可能通过改变 bcl-2 及 bax 的表达来调控 RGC 的凋亡,与 Liao 等^[13]研究相符。细胞凋亡受多种基因及其蛋白调控,bcl-2 家族的表达及调控是影响糖尿病大鼠视网膜细胞凋亡的关键因素^[14-17],在高血糖状态下,RGC 中 bcl-2 蛋白表达减少,bax 蛋白过度表达,并通过特殊的 BH3 结构域形成 bcl-2/bax 异源二聚体来拮抗 bcl-2 蛋白抗凋亡的作用,同时 bax/bax 同源二聚体的形成改变了线粒体膜的渗透性,激活细胞凋亡,引发细胞凋亡连锁反应^[18]。bcl-2/bax 比值反映 bcl-2 蛋白和 bax 蛋白在细胞凋亡中的效应,该比值变化是细胞存活或凋亡的决定因素。

糖尿病导致视网膜 NGF 前体,即 proNGF 与成熟 NGF 水平的失衡,导致 proNGF 的积累,并通过激活 p75NTR 引起神经血管损伤^[19-20]。在大鼠和小鼠的视网膜组织中,NGF 蛋白水平在糖尿病成模后 4~8 周明显降低^[21],而糖尿病模型动物视网膜 proNGF 水平于成模后 3~6 周显著上调,因此 Garcia 等^[4]认为

RGC 的丢失可能是源于 proNGF/成熟 NGF 表达的失衡和 NGF 受体 TrkA/p75NTR 表达的失衡。最近的研究表明,补充外源性 NGF 可以有效减少糖尿病引起的 RGC 死亡。Colafrancesco 等^[22]研究发现,持续向糖尿病大鼠滴用 NGF 滴眼液可在眼内发挥神经保护作用,抑制 RGC 的凋亡;Hammes 等^[23]认为糖尿病大鼠 RGC 的凋亡与 RGC 上低亲和力 NGF 受体表达上调有关,研究发现糖尿病大鼠腹腔内注射 NGF 可阻止 RGC 和 Müller 细胞凋亡,防止周细胞持续丢失及毛细血管的闭塞。以往的研究多使用滴眼液或者腹腔内注射的方式给药,到达眼内的药物浓度有限。为了增加药物的眼部利用率,本研究中采用玻璃体腔注射 NGF,并用透射电子显微镜观察发现 NGF 组 RGC 数目较正常对照组轻度减少,染色质未见明显边集,线粒体轻度水肿,RGC 凋亡细胞较 PBS 组和糖尿病模型组明显减少。NGF 组凋亡指数较糖尿病模型组显著减少,免疫组织化学染色结果显示,与糖尿病模型组比较,NGF 组 bcl-2 蛋白含量增加,bax 蛋白含量降低,bcl-2/bax 比值升高。推测 NGF 可能通过调控 bcl-2 及 bax 的表达来抑制 RGC 凋亡,从而起到一定的神经保护作用。

综上所述,本研究结果表明在早期糖尿病大鼠眼底照相及苏木精-伊红染色尚未见明显视网膜微血管病变时在透射电子显微镜下便可观察到 RGC 的凋亡,玻璃体腔给予 NGF 后可能通过改变 bcl-2 蛋白及 bax 蛋白的表达来抑制 RGC 的凋亡,提示 NGF 具有一定的视网膜神经元保护作用,为 NGF 治疗 DR 的临床可行性提供了一定的实验基础。本研究中采用玻璃体腔注射的方式增加了药物的眼部利用率,并深入分析 NGF 可能通过抑制 RGC 凋亡来产生保护作用,但凋亡途径多样复杂,还应进行更深入的研究来证实。同时,除了对视网膜神经元有保护作用外,NGF 是否对视网膜微血管损害也具有一定的保护作用,还需进一步探索。在糖尿病病程不同时间点、不同浓度 NGF 产生的保护作用是否具有差异性还有待进一步研究。

利益冲突 本研究与所涉及药品生产商及销售商无任何利益关系

参考文献

- [1] Capitão M, Soares R. Angiogenesis and inflammation crosstalk in diabetic retinopathy[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(11): 2443-2453. DOI: 10.1002/jcb.25575.
- [2] Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(19): 2655-2664. DOI: 10.1073/pnas.1522014113.
- [3] Iwona BS. Growth factors in the pathogenesis of retinal neurodegeneration in diabetes mellitus[J]. Curr Neuropharmacol, 2016, 14(8): 792-804.

- [4] Garcia TB, Hollborn M, Bringmann A. Expression and signaling of NGF in the healthy and injured retina [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 34: 43–57. DOI:10.1016/j.cytogfr.2016.11.005.
- [5] Minnone G, De Benedetti F, Bracci-Laudiero L. NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response [J/OL]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1028 [2018-09-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28492466>. DOI:10.3390/ijms18051028.
- [6] Lu L, Lu Q, Chen W, et al. Vitamin D3 protects against diabetic retinopathy by inhibiting high-glucose-induced activation of the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway [J/OL]. J Diabetes Res, 2018, 2018: 8193523 [2018-10-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29682582>. DOI:10.1155/2018/8193523.
- [7] Dorfman D, Aranda ml, Rosenstein RE. Enriched environment protects the optic nerve from early diabetes-induced damage in adult rats [J/OL]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136637 [2018-09-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26312758>. DOI:10.1371/journal.pone.0136637.
- [8] 陈大年, 王钰娇. 重视不同糖尿病视网膜病变动物实验模型的差异及应用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(6): 404–409. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.06.002.
- Chen DN, Wang YJ. Paying attention to the differences and applications of animal models of diabetic retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(6): 404–409. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.06.002.
- [9] Parisi V, Uccioli L. Visual electrophysiological responses in persons with type 1 diabetes [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2001, 17(1): 12–18.
- [10] Aizu Y, Oyanagi K, Hu J, et al. Degeneration of retinal neuronal processes and pigment epithelium in the early stage of the streptozotocin-diabetic rats [J]. Neuropathology, 2002, 22(3): 161–170.
- [11] Barber AJ, Lieth E, Khin SA, et al. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin [J]. J Clin Invest, 1998, 102(4): 783–791. DOI:10.1172/JCI2425.
- [12] Park SH, Park JW, Park SJ, et al. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina [J]. Diabetologia, 2003, 46(9): 1260–1268. DOI:10.1007/s00125-003-1177-6.
- [13] Liao WL, Lin JM, Liu SP, et al. Loss of response gene to complement 32 (RGC-32) in diabetic mouse retina is involved in retinopathy development [J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3629 [2018-10-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30453650>. DOI:10.3390/ijms19113629.
- [14] Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins [J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(2): a008722 [2018-09-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23378584>. DOI:10.1101/cshperspect.a008722.
- [15] Al-Dosari DI, Ahmed MM, Al-Rejaie SS, et al. Flavonoid naringenin attenuates oxidative stress, apoptosis and improves neurotrophic effects in the diabetic rat retina [J/OL]. Nutrients, 2017, 9(10): 1161 [2018-10-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29064407>. DOI:10.3390/nu9101161.
- [16] Ola MS, Ahmed MM, Shams S, et al. Neuroprotective effects of quercetin in diabetic rat retina [J]. Saudi J Biol Sci, 2017, 24(6): 1186–1194. DOI:10.1016/j.sjbs.2016.11.017.
- [17] Mahmoud AM, Abd El-Twab SM, Abdel-Reheim ES. Consumption of polyphenol-rich Morus alba leaves extract attenuates early diabetic retinopathy: the underlying mechanism [J]. Eur J Nutr, 2017, 56(4): 1671–1684. DOI:10.1007/s00394-016-1214-0.
- [18] Levine B, Sinha SC, Kroemer G. bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy [J]. Autophagy, 2008, 4(5): 600–606. DOI:10.4161/auto.6260.
- [19] Al-Gayyar MM, Matragoon S, Pillai BA, et al. Epicatechin blocks pro-nerve growth factor (proNGF)-mediated retinal neurodegeneration via inhibition of p75 neurotrophin receptor expression in a rat model of diabetes [corrected] [J]. Diabetologia, 2011, 54(3): 669–680. DOI:10.1007/s00125-010-1994-3.
- [20] Ali TK, Al-Gayyar MM, Matragoon S, et al. Diabetes-induced peroxynitrite impairs the balance of pro-nerve growth factor and nerve growth factor, and causes neurovascular injury [J]. Diabetologia, 2011, 54(3): 657–668. DOI:10.1007/s00125-010-1935-1.
- [21] Ola MS, Ahmed MM, Ahmad R, et al. Neuroprotective effects of rutin in streptozotocin-induced diabetic rat retina [J]. J Mol Neurosci, 2015, 56(2): 440–448. DOI:10.1007/s12031-015-0561-2.
- [22] Colafrancesco V, Coassin M, Rossi S, et al. Effect of eye NGF administration on two animal models of retinal ganglion cells degeneration [J]. Ann Ist Super Sanita, 2011, 47(3): 284–289. DOI:10.4415/ANN_11_03_08.
- [23] Hammes HP, Federoff HJ, Brownlee M. Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes [J]. Mol Med, 1995, 1(5): 527–534.

(收稿日期:2018-10-24 修回日期:2019-05-02)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

本刊对论文题目的要求

论文题目力求简洁、特异、明确、能准确反映文章主题和特定内容,具有可检索性。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜,一般不设副标题,尽量不用标点符号,文题中避免使用不为同行熟知的符号、简称、缩略语和商品名。论著文章和综述须有与中文文题含意一致的英文文题。

本刊对论文发表过程中利益冲突问题的处理和要求

本刊严格遵守《国际医学期刊编辑委员会》关于“生物医学期刊投稿的统一要求”,恪守公正、客观、科学性对待作者研究论文的原则,最大限度规避在稿件发表的各个环节中存在的潜在利益关系或冲突,尽量减少发表偏倚。作者投稿过程中应注明存在利益关系或冲突的审稿人姓名或机构,同时提供该研究获得的资助机构并提供相应的证明或文件的复印件。稿件在同行评审过程中实行三级审理制,同行评审专家至少要在不同医疗机构的 3 人中进行,审稿过程严格遵守保密原则,编辑部在综合评价多位同行评审专家的意见后确定稿件的录用与否。作者还应在文后致谢对该研究提供资助和帮助的人员并申明理由,或就该研究与文中涉及的医疗机构、生产厂家和药商之间有无利益关系进行声明。

(本刊编辑部)