

叔丁基对苯二酚对 2 型糖尿病大鼠视网膜细胞的保护作用及其机制

韩佩晏 张思远 李晶艳 黄祺 田敏 吕红彬

646000 泸州,西南医科大学附属第一医院眼科

通信作者:吕红彬,Email:oculistlvhongbin@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.004

【摘要】 背景 细胞凋亡是糖尿病视网膜病变(DR)中的重要机制之一,氧化应激、高糖等可启动细胞凋亡通路,从而造成细胞损伤。叔丁基对苯二酚(tBHQ)是一种抗氧化应激药物,但在DR的发生和发展过程中是否发挥视网膜细胞的保护作用尚不明确。目的 观察tBHQ对2型糖尿病大鼠视网膜血管内皮生长因子(VEGF)及Bcl-2表达的影响,探讨tBHQ通过核因子-E2相关因子2/抗氧化反应元件(Nrf2/ARE)信号通路对2型糖尿病大鼠视网膜可能的保护机制。方法 选取50只清洁级健康雄性SD大鼠。应用随机数字表法随机选取其中10只大鼠为正常对照组,以正常饲料喂养;其余40只大鼠采用高脂高糖饲料喂养4周后空腹12h,然后大鼠腹腔内注射链脲佐菌素(STZ)诱导2型糖尿病模型。造模成功大鼠均衡分组,模型对照组大鼠继续给予高脂高糖饮食,tBHQ干预组大鼠于造模后1周在高脂高糖饲料中添加质量分数1% tBHQ进行干预,各组大鼠分别于造模后4周和12周收集大鼠心脏全血,检测各组大鼠空腹血糖(FPG),血浆总胆固醇(TC)、总三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量;采用放射免疫分析法检测各组大鼠空腹血清胰岛素(FINs)含量。采用免疫组织化学法检测各组大鼠视网膜中VEGF、bcl-2蛋白的表达分布;采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法定量检测各组大鼠视网膜中Bcl-2 mRNA和VEGF mRNA的相对表达量。结果 35只大鼠成功建立2型糖尿病模型。各组大鼠造模后不同时间点FINs含量总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 22.480, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 7.636, P = 0.008$)。各组间大鼠血浆FPG、TC、TG和LDL-C含量总体比较差异均有统计学意义(FPG: $F_{\text{分组}} = 78.531, P = 0.000; TC: F_{\text{分组}} = 28.049, P = 0.000; TG: F_{\text{分组}} = 13.108, P = 0.000; LDL-C: F_{\text{分组}} = 6.804, P < 0.05$)。免疫组织化学检测显示,Bcl-2和VEGF蛋白主要表达于视网膜各层的血管、视网膜神经节细胞(RGCs)层、内核层和外核层。各组间大鼠视网膜中VEGF和bcl-2蛋白的相对表达量总体比较差异均有统计学意义(VEGF: $F_{\text{分组}} = 11.805, P = 0.000; bcl-2: F_{\text{分组}} = 22.943, P = 0.000$);tBHQ干预组大鼠造模后12周视网膜中bcl-2蛋白的相对表达量明显高于造模后4周,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠造模后不同时间点视网膜中VEGF和Bcl-2 mRNA相对表达量总体比较差异均有统计学意义(VEGF: $F_{\text{分组}} = 79.220, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 6.090, P < 0.05; Bcl-2: F_{\text{分组}} = 105.000, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 13.170, P = 0.001$)。其中造模后4周和12周模型对照组和tBHQ干预组大鼠视网膜中VEGF和Bcl-2 mRNA相对表达量明显高于正常对照组,tBHQ干预组大鼠视网膜中Bcl-2 mRNA相对表达量明显高于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);tBHQ干预组大鼠造模后12周视网膜中VEGF和Bcl-2 mRNA相对表达量明显高于造模后4周,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 tBHQ可通过下调视网膜中VEGF的表达和上调bcl-2的表达对DR发挥抗氧化损伤和抗凋亡作用。此外,tBHQ对糖尿病大鼠可能有降血糖、调节胰岛素、降血脂的作用。

【关键词】 糖尿病/并发症; 视网膜病变; 血管内皮生长因子; Bcl-2/代谢; 动物模型; SD大鼠; 叔丁基对苯二酚

基金项目:四川省科技厅项目(14JC01723-LH36、2015SZ0086)

Protecting effects and mechanism of tert-butyl hydroquinone on retinal cells in type 2 diabetic rats Han Peiyuan, Zhang Siyuan, Li Jingyan, Huang Qi, Tian Min, Lyu Hongbin
Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China
Corresponding author: Lyu Hongbin, Email: oculistlvhongbin@163.com

【Abstract】 **Background** Apoptosis is a primary clinical pathological mechanism of diabetic retinopathy (DR). Oxidative stress and high glucose can activate cell apoptosis pathway and thus leads to cellular damage. It is confirmed that tert-butyl hydroquinone (tBHQ) plays an antioxidation effect, however, whether it has a protective role on retinal cells in DR is still unelucidated. **Objective** This study was to investigate the effect of tBHQ on vascular endothelial growth factor (VEGF) and bcl-2 expressions in retina of type 2 diabetic rats and its possible mechanism via nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element (Nrf2/ARE) signal pathway. **Methods**

Fifty clean healthy male SD rats were included in this experimental study. Ten rats were fed with normal diet as the normal control group, and other rats were fed with high fatty and high sugar food for 4 weeks. After 12 hours of fasting, streptozotoin (STZ) (30 mg/kg) was intraperitoneally injected to induce the type 2 diabetic models. The model rats were randomly divided into the diabetic control group and tBHQ group and 1% tBHQ was added into the high fatty and sugar food 1 week after modeling in the tBHQ group. Fasting plasma glucose (FPG) level, blood total cholesterol (TC) level, blood triglyceride (TG) level, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and fasting serum insulin (FINs) were detected 4 and 12 weeks after modeling, respectively, and radio immunoassay was used to detect the FIN levels of the rats. The relative expression of VEGF and bcl-2 in retinas of the rats were assayed by immunohistochemistry and fluorescence real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The use of the animals complied with the Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State and Technology Commission. **Results** Type 2 diabetic models were successfully established in 35 rats with successful rate 92.1%. The FIN levels were significantly different among different groups and time points ($F_{\text{group}} = 22.480, P = 0.000; F_{\text{time}} = 7.636, P = 0.008$). The FPG, TC, TG and LDL-C levels were significantly different among the groups (FPG: $F_{\text{group}} = 78.531, P = 0.000$; TC: $F_{\text{group}} = 28.049, P = 0.000$; TG: $F_{\text{group}} = 13.108, P = 0.000$; LDL-C: $F_{\text{group}} = 6.804, P < 0.05$). Immunohistochemistry showed that VEGF and bcl-2 were mainly expressed in retinal ganglion cell layer, inner plexiform layer and outer plexiform layer. The expressions of VEGF and bcl-2 proteins were significantly different among different groups (VEGF: $F_{\text{group}} = 11.805, P = 0.000$; bcl-2: $F_{\text{group}} = 22.943, P = 0.000$); the expression level of bcl-2 protein was higher in 12 weeks after modeling than that in 4 weeks after modeling in the tBHQ group ($P < 0.05$). The expressions of VEGF and Bcl-2 mRNA in rat retinas were significantly different among different groups and time points (VEGF: $F_{\text{group}} = 79.220, P = 0.000; F_{\text{time}} = 6.090, P < 0.05$; Bcl-2: $F_{\text{group}} = 105.000, P = 0.000; F_{\text{time}} = 13.170, P = 0.001$). Four and eight weeks after modeling, the expressions of VEGF and Bcl-2 mRNA in the diabetic control group and tBHQ group were significantly higher than that in the normal control group, and the expressions of Bcl-2 mRNA in the tBHQ group were significantly higher than that in the model control group (all at $P < 0.05$); the expression of Bcl-2 mRNA was higher at 12 weeks after modeling than that at 4 weeks in the tBHQ group ($P < 0.05$). **Conclusions** tBHQ produces anti-oxidative-damage and anti-apoptosis effects on retinal cells by up-regulating VEGF expression and down-regulating bcl-2 expression in DR rats. In addition, tBHQ may have effects on lowering high blood sugar, regulating insulin and blood lipid levels.

[Key words] Diabetes mellitus/complication; Retinopathy; Vascular endothelial growth factor; Bcl-2/metabolism; Disease models, animal; SD rats; Tert-butyl hydroquinone

Fund program: Financial Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (14JC01723-LH36, 2015SZ0086)

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^[1], 其主要特点为血管外渗出、组织缺氧及新生血管生成。高糖环境可导致调节因子分泌失衡, 从而引起局部组织缺血、缺氧; 同时, 晚期糖基化终末产物的产生和堆积可诱导血管生成因子, 如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF)、色素上皮细胞衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF) 等的产生, 其中 VEGF 是最直接的眼内新生血管形成因子^[2]。VEGF 和 bcl-2 在组织中的表达量在一定程度上反映了机体组织抗氧化应激、抗凋亡及病理改变的程度^[3-4]。研究表明, 抗氧化剂可抑制 VEGF 的过度表达, 并减少视网膜细胞的凋亡^[5]。叔丁基对苯二酚 (tert-butyl hydroquinone, tBHQ) 是一种抗氧化剂, 可诱导核因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 和 Bcl-2 的表达上调, 从而起到抗氧化和抗凋亡的作用^[6], 但其在 DR 过程中的作用尚未证实。本研究观察 tBHQ 干预后 2 型糖尿病模型大鼠视网膜中 VEGF 和 bcl-2

的表达变化, 探讨 tBHQ 对 DR 视网膜细胞的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 4 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 180 ~ 200 g (购自四川医科大学城北实验动物中心)。动物适应性喂养 1 周后按随机数字表法随机抽取 10 只作为正常对照组, 其余 40 只大鼠诱导糖尿病模型, 造模成功后随机分为模型对照组和 tBHQ 组, 每组 20 只。实验动物的使用遵循国家科学技术委员会 1988 年颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂 链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) (美国 Sigma 公司); tBHQ (美国 Acros 公司); 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 试剂盒 (日本宝生物工程 (上海) 有限公司); VEGF、Bcl-2、GAPDH 引物序列 (上海生工生物有限公司); 兔抗大鼠 Bcl-2、VEGF 多克隆抗体 (美国 BioWorld 公司); 生物素化山羊抗兔 IgG 二抗

(武汉博士德生物工程公司);¹²⁵I 胰岛素放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 正常对照组大鼠始终给予标准大鼠饲料饲养。其余 40 只给予高脂高糖饲料饲养 4 周,空腹 12 h 后以 30 mg/kg 的剂量腹腔内注射质量分数 1% STZ 溶液建立 2 型糖尿病模型,正常对照组大鼠注射等容量枸橼酸钠缓冲液。于造模后 7 d 由大鼠尾尖取血测定空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG),以 FPG 含量 >16.7 mmol/L 为造模成功,tBHQ 干预组于成模后 1 周开始在高脂高糖饲料中添加质量分数 1% tBHQ。模型对照组大鼠继续给予高脂高糖饮食。每日观察大鼠一般情况。

1.2.2 大鼠眼球组织标本的制备 将正常对照组、模型对照组和 tBHQ 干预组大鼠任意平均分为 2 个组,分别于成模后 4 周和 12 周空腹过夜,采用质量分数 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射行全身麻醉。以穿刺法收集大鼠心脏血液备用。随即摘取双侧眼球,各时间点分别任取 6 只眼球制作标本,先用 19G 穿刺刀于角膜缘处穿刺前房,然后于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 以上,常规石蜡包埋,分别 2 μm 和 5 μm 厚连续切片。各时间点另用 6 只眼球迅速沿锯齿缘环形剪除眼前节,将视网膜剥离并在 PBS 中漂洗,清除残存的玻璃体,最后将视网膜置入去 RNA 酶的 1.5 ml EP 管中,迅速置于液氮中并于 -80 °C 保存备用。

1.2.3 各组大鼠糖尿病相关生物化学指标的检测 收集大鼠心脏全血,采用 7180 全自动生化分析仪(日本日立公司)测定大鼠 FPG、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)含量。采用¹²⁵I 胰岛素放射免疫分析药盒检测大鼠空腹血清胰岛素(fasting serum insulins, FINs)含量。

1.2.4 免疫组织化学法检测各组大鼠视网膜中 bcl-2 和 VEGF 蛋白的表达 取各组眼球 2 μm 石蜡切片,行常规苏木精-伊红染色,中性树胶封片后于光学显微镜下观察视网膜结构。取各组眼球 5 μm 石蜡切片,常规脱蜡入水,PBS 漂洗 6 min,0.1 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液预热至 92~98 °C,放入载玻片,微波炉内 92~98 °C 加热 5 min,自然冷却至室温进行抗原修复,分别滴加兔抗大鼠 bcl-2(1:100)、VEGF(1:100)一抗,4 °C 孵育过夜,PBS 洗涤;加二抗(1:200),室温孵育 40 min, DAB 显色,用 BX53 数字显微镜(日本 OLYMPUS 公

司)及 Image-Pro Plus 图像分析软件分析 bcl-2 和 VEGF 蛋白在大鼠视网膜中的表达分布。每组任取 6 张切片,分别于高倍镜下选择 5 个不同视野光学显微镜下观察,棕黄色或棕褐色着色者为阳性反应细胞,测定单位面积平均吸光度(A),实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 qRT-PCR 法检测大鼠视网膜中 Bcl-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的表达 Bcl-2、VEGF 的引物分别为 174 bp 和 182 bp。3 个组大鼠分别于干预 4 周、12 周时各取 6 份视网膜。将各组冻存视网膜标本机械匀浆后,用总 RNA 提取试剂盒提取视网膜总 RNA,测得 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.9~2.2,参照逆转录试剂盒说明书以 RNA 为模板逆转录合成 cDNA,反应体系为 10 μl;反应条件:37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 保存。采用 CFX96 real-time PCR Detection System 对 cDNA 进行 PCR 扩增,总反应体系为 25 μl;扩增条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火及延伸 30 s,共 39 个循环。以 GAPDH 作为内参照,计算 Bcl-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的相对表达值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组两因素干预多水平分组实验设计,各组大鼠干预不同时间检测指标的总差异比较采用两因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后各组大鼠的一般情况

5 只大鼠血糖值不符合标准被剔除,成功造模 35 只,模型对照组和 tBHQ 干预组分别为 17 只和 18 只,饲养过程中模型对照组死亡 2 只,其中 1 只大鼠因血糖过高(>33 mmol/L),出现鼻充血、前肢肿胀坏疽、食欲不振、精神极度萎靡而死亡,另 1 只为寄生虫感染;tBHQ 干预组 1 只因颈部脓肿死亡。最终模型对照组、tBHQ 干预组 4 周和 12 周各 6 只大鼠完成实验。

2.2 各组大鼠糖尿病相关生物化学指标的改变

各组间大鼠 FPG 含量明显不同,总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 78.531, P = 0.000$)。其中与正常对照组比较,模型对照组及 tBHQ 干预组大鼠 FPG 含量明显升高,且模型对照组造模后 12 周大鼠 FPG 含量明显高于造模后 4 周,而 tBHQ 干预组造模后 12 周大鼠 FPG 含量明显低于造模后 4 周,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。正常对照组、模型对照组及 tBHQ 干预组造模后不同时间大鼠 FINs 总体比较差异均有

统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 22.480, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 7.636, P = 0.008$), 其中模型对照组及 tBHQ 干预组大鼠各时间点的血清 FINs 均明显高于正常对照组, tBHQ 干预组造模后 12 周大鼠 FINs 值明显高于干预 4 周值, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。模型对照组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 均明显高于正常对照组和 tBHQ 干预组, 各组间总体比较差异均有统计学意义 (TC: $F_{\text{分组}} = 28.049, P = 0.000; TG: F_{\text{分组}} = 13.108, P = 0.000; LDL-C: F_{\text{分组}} = 6.804, P < 0.05$), 各指标不同时间点的总体比较差异均无统计学意义 (均 $P \geq 0.05$) (表 2)。

表 1 正常对照组、模型对照组和 tBHQ 干预组大鼠不同时间点 FPG 浓度和 FINs 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	FPG (mmol/L)		FINs ($\mu\text{U/ml}$)	
		造模后 4 周	造模后 12 周	造模后 4 周	造模后 12 周
正常对照组	5	6.059 \pm 1.270	7.789 \pm 0.449	20.139 \pm 2.249	21.298 \pm 2.801
模型对照组	6	25.623 \pm 3.810 ^a	32.176 \pm 5.119 ^{ac}	27.834 \pm 3.727 ^a	28.496 \pm 3.536 ^a
tBHQ 干预组	6	19.945 \pm 4.150 ^{ab}	12.844 \pm 6.405 ^{abc}	24.484 \pm 3.699 ^a	31.146 \pm 3.652 ^{ac}

注: FPG: $F_{\text{分组}} = 78.531, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 0.075, P > 0.05$ 。FINs: $F_{\text{分组}} = 22.480, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 7.636, P = 0.008$ 。与同时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时间点模型对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与组内造模后 4 周值比较, ^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) tBHQ: 叔丁基对苯二酚; FPG: 空腹血糖; FINs: 空腹血清胰岛素

表 2 各组大鼠不同时间点血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

组别	样本量	不同时间 TC 值		不同时间 TG 值	
		造模后 4 周	造模后 12 周	造模后 4 周	造模后 12 周
正常对照组	5	1.225 \pm 0.332	1.264 \pm 0.151	0.734 \pm 0.160	0.716 \pm 0.251
模型对照组	6	2.106 \pm 0.318 ^a	3.165 \pm 0.732 ^{ac}	2.573 \pm 0.807 ^a	3.491 \pm 1.091 ^a
tBHQ 干预组	6	1.759 \pm 0.410 ^{ab}	1.546 \pm 0.615 ^{ab}	1.708 \pm 0.705 ^a	3.161 \pm 2.729 ^a

组别	样本量	不同时间 LDL-C 值		不同时间 HDL-C 值	
		造模后 4 周	造模后 12 周	造模后 4 周	造模后 12 周
正常对照组	5	0.329 \pm 0.073	0.377 \pm 0.307	0.732 \pm 0.239	0.933 \pm 0.061
模型对照组	6	0.676 \pm 0.546	1.011 \pm 0.572 ^a	0.720 \pm 0.384	0.710 \pm 0.210
tBHQ 干预组	6	0.616 \pm 0.276	0.455 \pm 0.193 ^b	0.704 \pm 0.223	0.909 \pm 0.377

注: TC: $F_{\text{分组}} = 28.049, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 3.580, P > 0.05$ 。TG: $F_{\text{分组}} = 13.108, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 1.277, P > 0.05$ 。LDL-C: $F_{\text{分组}} = 6.804, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 0.546, P = 0.50$ 。HDL-C: $F_{\text{分组}} = 0.993, P > 0.05; F_{\text{时间}} = 2.272, P > 0.05$ 。与同时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时间点模型对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与各自组内造模后 4 周值比较, ^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) TC: 总胆固醇; TG: 三酰甘油; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇

2.3 各组大鼠视网膜组织病理学变化

光学显微镜下可见正常对照组造模后 4 周和 12 周大鼠视网膜各层结构完整, 细胞排列整齐、形态正常, 视网膜内外界膜清晰, 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 层完整; 模型对照组造模后 4

周大鼠视网膜增厚, 细胞间质水肿, 神经纤维层水肿增厚, 部分视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 出现空泡变性, 视网膜内核层和外核层细胞结构紊乱, 排列疏松, 内核层与外丛状层间视网膜微血管增生, 可见血管扩张、充血, 内外界膜结构不清晰; 模型对照组造模后 12 周可见大鼠视网膜明显增厚, 结构紊乱, 神经纤维层明显增厚和肿胀, 大量 RGCs 空泡变性, 细胞核边聚, 内丛状层神经纤维排列疏松, 内核层和外核层细胞结构更加疏松, 排列紊乱, 内外界膜结构模糊; tBHQ 干预组造模后 4 周、12 周大鼠视网膜稍增厚, 细胞间质呈轻微水肿, 视网膜各层组织结构较疏松, 排列紊乱, 神经纤维层肿胀增厚, 部分 RGCs 空泡样变性, 内核层和外核层细胞排列稍疏松, 内外界膜较清晰, 较同时时间点的模型对照组均明显改善 (图 1)。

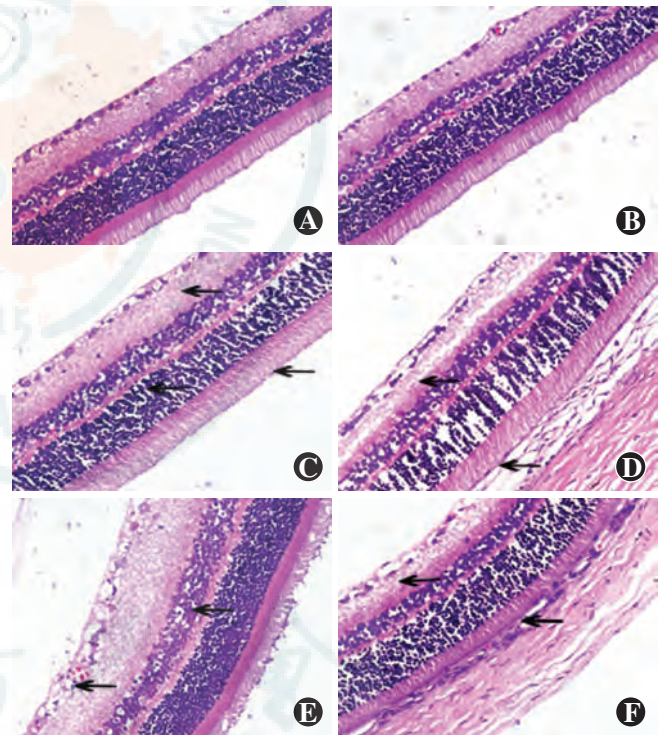


图 1 各组大鼠视网膜组织病理学检查 (HE $\times 400$) A: 造模后 4 周正常对照组大鼠视网膜结构清晰 B: 造模后 12 周正常对照组大鼠视网膜结构正常 C: 造模后 4 周模型对照组大鼠视网膜神经纤维层水肿, 可见 RGCs 空泡变性 (箭头), 内核层和外核层细胞排列紊乱 (箭头) D: 造模后 12 周模型对照组大鼠视网膜可见 RGCs 空泡变性 (箭头), 内核层和外核层细胞排列疏松 (箭头) E: 造模后 4 周 tBHQ 干预组大鼠视网膜稍增厚, 细胞间质轻微水肿 (箭头), 内核层和外核层细胞排列稍疏松 (黑箭), 内外界膜基本清晰 F: 造模后 12 周 tBHQ 干预组大鼠视网膜细胞排列较整齐, 视网膜稍增厚, 细胞间质轻微水肿 (箭头), 内核层和外核层细胞排列稍疏松 (箭头)

2.4 各组大鼠视网膜中 bcl-2、VEGF 蛋白的表达

各组大鼠视网膜中 bcl-2 蛋白的相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 22.943, P = 0.000$)。正常对照组造模后 4 周和 12 周大鼠视网膜中均可见

bcl-2 蛋白呈阳性表达,主要表达于视网膜各层毛细血管、RGCs 层、内核层和外核层;造模后 4 周和 12 周模型对照组大鼠视网膜中阳性细胞数显著增多,其中造模后 12 周模型对照组大鼠视网膜中 bcl-2 蛋白相对表达量较正常对照组大鼠明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);造模后 4 周和 12 周 tBHQ 干预组大鼠视网膜中 bcl-2、VEGF 蛋白表达较模型对照组明显增强,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);tBHQ 干预组大鼠造模后 12 周视网膜中 bcl-2 蛋白的相对表达量明显高于造模后 4 周,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2,表 3)。

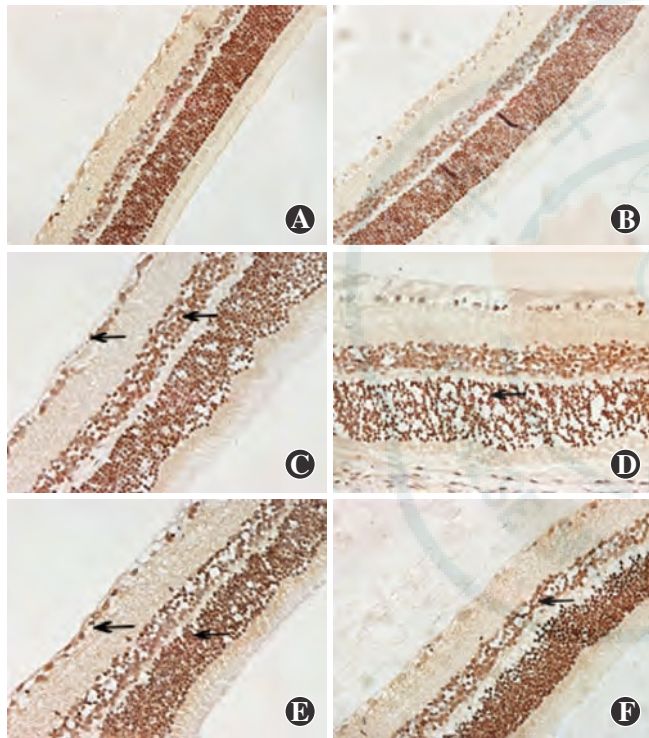


图 2 各组大鼠视网膜组织 bcl-2 免疫组织化学染色结果 (DAB ×400) A:造模后 4 周正常对照组大鼠可见 bcl-2 蛋白表达于视网膜各层,呈棕色或深棕色染色 B:造模后 12 周正常对照组大鼠 bcl-2 蛋白表达接近于造模后 4 周 C:造模后 4 周模型对照组大鼠视网膜中 bcl-2 蛋白表达较正常对照组增强(箭头) D:造模后 12 周模型对照组大鼠视网膜中 bcl-2 蛋白表达较正常对照组增强(箭头) E:造模后 4 周 tBHQ 干预组大鼠视网膜中 bcl-2 蛋白表达较模型对照组明显增强,呈深棕色染色(箭头) F:造模后 12 周 tBHQ 干预组大鼠视网膜中 bcl-2 蛋白表达强度较正常对照组和模型对照组明显增强

表 3 各组大鼠不同时间 bcl-2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 bcl-2 表达量	
		造模后 4 周	造模后 12 周
正常对照组	5	0.062 ± 0.011	0.061 ± 0.013
模型对照组	6	0.071 ± 0.013	0.084 ± 0.015 ^a
tBHQ 干预组	6	0.089 ± 0.020 ^{ab}	0.119 ± 0.021 ^{abc}

注: $F_{\text{分组}} = 22.943, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 7.170, P = 0.080$ 。与同时时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$;与同时时间点模型对照组比较, ^b $P < 0.05$;与 tBHQ 干预组造模后 4 周值比较, ^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) tBHQ:叔丁基对苯二酚

VEGF 主要表达于视网膜神经纤维层和 RGCs 层,在内核层呈弱表达。各组大鼠视网膜中 VEGF 蛋白相对表达量的总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 11.805, P = 0.000$)。正常对照组大鼠视网膜中 VEGF 的表达较弱,呈浅棕色染色;模型对照组大鼠视网膜中 VEGF 主要表达于 RGCs 层和内外核层,呈棕黄色染色,造模后 4 周和 12 周模型对照组大鼠视网膜中 VEGF 蛋白相对表达量较正常对照组明显增强,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$);tBHQ 干预组大鼠视网膜中 VEGF 主要表达于 RGCs 层和内核层,其中 tBHQ 干预组大鼠视网膜中 VEGF 蛋白相对表达量较模型对照组显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3,表 4)。

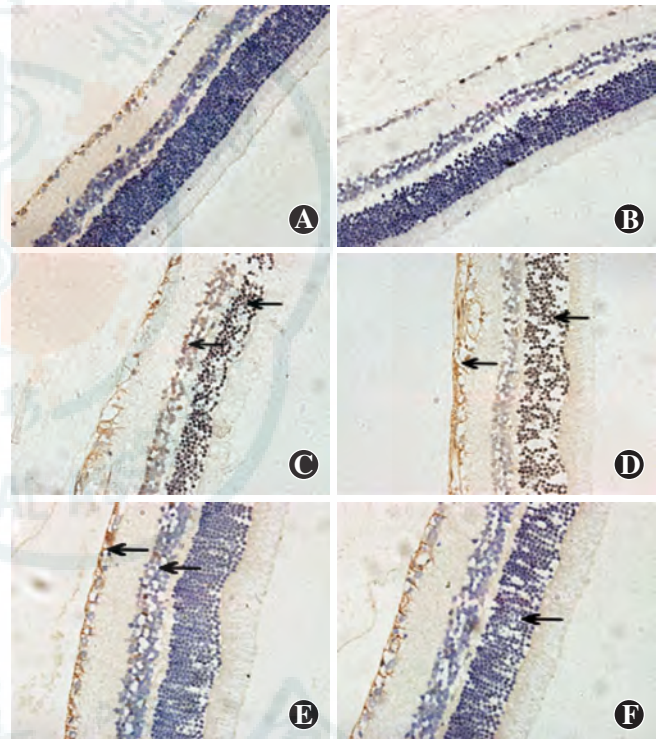


图 3 各组大鼠视网膜中 VEGF 蛋白的表达 (DAB ×400) A:正常对照组大鼠造模后 4 周 VEGF 主要表达于视网膜神经纤维层与 RGCs 层,内核层可见少量表达,呈浅棕色染色 B:正常对照组大鼠造模后 12 周 VEGF 表达与 4 周鼠接近 C:模型对照组大鼠造模后 4 周 VEGF 主要表达于 RGCs 层和内外核层,表达强度强于正常对照组,呈棕黄色染色(箭头) D:模型对照组大鼠造模后 12 周 VEGF 表达强于造模后 4 周 E:tBHQ 干预组大鼠造模后 4 周 VEGF 主要表达于 RGCs 层和内核层,表达强度弱于模型对照组(箭头) F:tBHQ 干预组大鼠造模后 12 周 VEGF 表达与造模后 4 周时接近

表 4 各组大鼠干预不同时间视网膜中 VEGF 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间 VEGF 蛋白表达	
		造模后 4 周	造模后 12 周
正常对照组	5	0.012 ± 0.001	0.011 ± 0.001
模型对照组	6	0.020 ± 0.002 ^a	0.026 ± 0.002 ^a
tBHQ 干预组	6	0.015 ± 0.001	0.014 ± 0.001 ^b

注: $F_{\text{分组}} = 11.805, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 0.370, P > 0.05$ 。与同时时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$;与同时时间点模型对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) VEGF:血管内皮生长因子;tBHQ:叔丁基对苯二酚

2.5 各组大鼠视网膜中 Bcl-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的相对表达量

各组大鼠在造模后不同时间点视网膜中 Bcl-2 mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 105.000, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 13.170, P = 0.001$), 其中造模后 4 周和 12 周, 模型对照组与 tBHQ 干预组大鼠视网膜中 Bcl-2 mRNA 相对表达量明显高于正常对照组, tBHQ 干预组大鼠视网膜中 Bcl-2 mRNA 相对表达量明显高于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); tBHQ 干预组大鼠造模后 12 周视网膜中 Bcl-2 mRNA 相对表达量明显高于造模后 4 周, 差异有统计学意义 ($t = -7.047, P < 0.05$) (表 5)。

各组大鼠在造模后不同时间点视网膜中 VEGF mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 79.220, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 6.090, P < 0.05$), 其中造模后 12 周模型对照组视网膜中 VEGF mRNA 相对表达量明显高于 tBHQ 干预组和正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 造模后 12 周模型对照组视网膜中 VEGF mRNA 相对表达量明显高于造模后 4 周, 差异有统计学意义 ($t = 3.503, P < 0.05$) (表 5)。

表 5 各组大鼠造模后不同时间点视网膜中 Bcl-2 和 VEGF mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 Bcl-2 mRNA 表达量		不同时间点 VEGF mRNA 表达量	
		造模后 4 周	造模后 12 周	造模后 4 周	造模后 12 周
正常对照组	5	0.45±0.03	0.45±0.02	0.37±0.02	0.34±0.04
模型对照组	6	0.66±0.05 ^a	0.79±0.05 ^a	0.79±0.09 ^a	1.10±0.05 ^{ac}
tBHQ 干预组	6	0.99±0.05 ^{ab}	1.29±0.07 ^{abd}	0.55±0.03 ^{ab}	0.57±0.03 ^{ab}

注: Bcl-2 mRNA: $F_{\text{分组}} = 105.000, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 13.170, P = 0.001$ 。
 VEGF mRNA: $F_{\text{分组}} = 79.220, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 6.090, P < 0.05$ 。与同时
 时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点模型对照组比较, ^b $P < 0.05$;
 与各自的模型对照组造模后 4 周值比较, ^c $P < 0.05$; 与各自的 tBHQ 干预
 组造模后 4 周值比较, ^d $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验)
 VEGF: 血管内皮生长因子; tBHQ: 叔丁基对苯二酚

3 讨论

胰岛素抵抗和胰岛分泌功能障碍是 2 型糖尿病发生的病理生理基础, 本研究模拟人类 2 型糖尿病的自然病程, 采用高脂高糖饮食诱导大鼠产生胰岛素抵抗, 然后再通过小剂量 STZ 腹腔内注射法选择性破坏大鼠胰岛 β 细胞, 建立 2 型糖尿病模型^[7-8], 证实造模成功。研究已证实 Nrf2 可以调节多种细胞保护基因的转录^[9], 在正常状态下, Nrf2 与 Keap1 (INrf2) 紧密结合, 将该转录因子隔离于细胞质中, 并通过泛素化和蛋白酶体途径将其降解, 抑制 Nrf2 诱导的 II 相酶诱导的抗氧化反

应元件 (antioxidant response element, ARE), 从而抑制其激活下游内源性的细胞保护基因的表达^[4]。当受到来源于活性氧或亲核信号攻击后, Nrf2 从 Keap1 中解离, 以稳定状态转位至细胞核, 与亮氨酸拉链蛋白结合成异二聚体, 最终与 II 相酶基因的 ARE 结合, 进而激活靶基因的表达, 调节抗氧化酶/蛋白的转录^[10]。Niture 等^[6]研究表明, 在 Bcl-2 基因的启动子上存在 ARE, 且 Nrf2 可结合于 Bcl-2 启动子上的 AREr3, 在抗氧化剂的作用下 Nrf2 与 Keap1 解离, Nrf2 进入细胞核, 结合于 AREr3, 从而介导 Bcl-2 基因的表达, 减少细胞凋亡。Nrf2 进入细胞核是 Nrf2 蛋白激活并发挥转录活性的关键步骤, 而 tBHQ 作为 Nrf2 蛋白的激活剂, 可增强此作用^[11]。tBHQ 可以选择性地作用于 Nrf2/ARE 信号通路, 诱导抗氧化蛋白的产生, 从而抑制视网膜的氧化应激损伤^[11-12]。此外, Nrf2 可介导并上调 bcl-2 的表达^[5, 13], 后者在调节血管内稳态和血管生成中起着重要作用^[14]。高血糖及缺血、缺氧是 DR 发生和发展的关键环节, 高血糖除了会引起产生过多的自由基外, 还能抑制抗氧化因子^[15]。VEGF 是由于缺血缺氧而产生的促进新生血管生成的重要因子^[16], 来源于眼内的许多细胞。研究证明, 增生性 DR 患者玻璃体和房水中 VEGF 的含量显著升高, 促进 DR 的发展^[17], 此外, VEGF 可通过诱导 Bcl-2 的表达来减少细胞凋亡^[3, 18], 因此 VEGF 的表达量在一定程度上体现了 DR 的进展情况。本研究中结果发现, tBHQ 干预组大鼠血糖水平较模型对照组降低, 以造模后 12 周更为显著, tBHQ 干预组大鼠造模后 4 周 FINs 水平较同时期模型对照组稍有降低, 提示 tBHQ 有抗高血糖作用, 可能与胰岛细胞对抗自由基的能力增强, 从而减少胰岛素抵抗有关^[19]。此外, tBHQ 干预组大鼠 TC 和 TG 水平明显低于模型对照组, 表明 tBHQ 能调节血脂水平。模型对照组大鼠视网膜中 VEGF mRNA、Bcl-2 mRNA 表达量均高于正常对照组, 而 tBHQ 干预组大鼠视网膜中 VEGF mRNA 相对表达量低于模型对照组, Bcl-2 mRNA 的相对表达量明显高于模型对照组, 表明高血糖可造成视网膜缺血缺氧环境, 从而引起氧化应激反应, 并诱导 VEGF 及抗凋亡因子 bcl-2 的产生, 而 tBHQ 抑制 VEGF 的产生, 并诱导 bcl-2 进一步增多, 从而减少视网膜的氧化应激损伤, 抑制视网膜血管病变和细胞凋亡, 这些结果与 Niture 等^[6]和 Cai 等^[13]的实验结果一致, 其机制可能是抗氧化剂 tBHQ 促进 Nrf2 与 INrf2 (Keap1) 的解离, 使 Nrf2 磷酸化并转移至细胞核内, 并与 Bcl-2 基因启动子区域上的 AREr3 结合, 诱导 Bcl-2 基因的转录, 下调 Bax 蛋白表达和细胞色素 C 的释放, 激活半胱天冬酶 3/7^[6], 从而减少视网膜

细胞的凋亡。本研究中免疫组织化学染色结果显示, VEGF 主要表达于神经纤维层和 RGCs 层, bcl-2 主要表达于毛细血管、RGCs 层、内核层和外核层, 模型对照组大鼠视网膜中 bcl-2 的表达量均高于正常对照组, tBHQ 干预组视网膜形态较模型对照组显著改善, 且 VEGF 的表达减弱, Bcl-2 的表达却继续升高, 说明 tBHQ 能改善高糖对视网膜造成的氧化应激损害, 并诱导抗凋亡蛋白, 从而减少细胞凋亡。

本研究结果提示, tBHQ 可在一定程度上降低 2 型糖尿病模型大鼠的血糖和血脂水平, 改善胰岛素抵抗, 发挥抗高血糖作用, 并可改善视网膜缺血缺氧状态, 同时激活 Nrf2, 诱导 bcl-2 在视网膜中的表达, 保护视网膜对抗氧化应激损伤, 减少细胞凋亡, 此外本研究中还提示 tBHQ 可减少 VEGF 的表达, 抑制 DR 的进展。但本研究中存在干预药物浓度较单一、检测指标较少的问题, 因此采用不同剂量的 tBHQ 并延长干预时间, 综合观察更多相关抗氧化抗凋亡指标, 增加不同药物对照组, 从多个方面证明 tBHQ 对 DR 视网膜组织的影响是进一步的研究方向, 同时 tBHQ 长期应用后的毒性作用和不良反应也值得关注和研究。

参考文献

[1] Wang CC, Reusch JE. Diabetes and cardiovascular disease: changing the focus from glycemic control to improving long-term survival[J]. Am J Cardiol, 2012, 110(9 Suppl): 58B-68B. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.08.036.
 [2] Warren CM, Iruela-Arispe ML. Signaling circuitry in vascular morphogenesis[J]. Curr Opin Hematol, 2010, 17(3): 213-218. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32833865d1.
 [3] Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2001, 85(2): 273-278. DOI: 10.1054/bjoc.2001.1876.
 [4] Tian H, Zhang B, Di J, et al. Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKKβ and Bel-2/Bcl-xL[J]. Cancer Lett, 2012, 325(1): 26-34. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.06.007.
 [5] Rota R, Chiavaroli C, Garay RP, et al. Reduction of retinal albumin leakage by the antioxidant calcium dobesilate in streptozotocin-diabetic rats[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 495(2-3): 217-224. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.05.019.
 [6] Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(13):

9873-9886. DOI: 10.1074/jbc.M111.312694.
 [7] 田敏, 周琦, 吕红彬, 等. 5, 6-二氢环戊烯并 1, 2-二硫杂环戊烯-3-硫酮对 2 型糖尿病大鼠视网膜核因子 NF-E2 相关因子及血红素氧合酶-1 表达的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2014, 30(2): 187-192. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2014.02.016.
 Tian M, Zhou Q, Lyu HB, et al. Effect of 5, 6-dihydrocyclopenta-1, 2-dithiole-3-thione on the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and hemeoxygenase-1 in retina of type 2 diabetic rats[J]. Chin J Ocular Fundus Dis, 2014, 30(2): 187-192. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2014.02.016.
 [8] Davidson EP, Holmes A, Coppey LJ, et al. Effect of combination therapy consisting of enalapril, α-lipoic acid, and menhaden oil on diabetic neuropathy in a high fat/low dose streptozotocin treated rat[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 765: 258-267. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.08.015.
 [9] Wang C, Li C, Peng H, et al. Activation of the Nrf2-ARE pathway attenuates hyperglycemia-mediated injuries in mouse podocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(3): 891-902. DOI: 10.1159/000366307.
 [10] Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(19): 8477-8486. DOI: 10.1128/MCB.24.19.8477-8486.2004.
 [11] Gharavi N, Haggarty S, El-Kadi AO. Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites[J]. Curr Drug Metab, 2007, 8(1): 1-7. DOI: 10.2174/138920007779315035.
 [12] Koh K, Cha Y, Kim S, et al. tBHQ inhibits LPS-induced microglial activation via Nrf2-mediated suppression of p38 phosphorylation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(3): 449-453. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.082.
 [13] Cai J, Ahmad S, Jiang WG, et al. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells[J]. Diabetes, 2003, 52(12): 2959-2968. DOI: 10.2337/diabetes.52.12.2959.
 [14] Zheng JH, Viacava FA, Kriwacki RW, et al. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis[J]. FEBS J, 2015, 52(12): 2959-2968. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13527/pdf. DOI: 10.1111/febs.13527.
 [15] Wang C, Li C, Peng H, et al. Activation of the Nrf2-ARE pathway attenuates hyperglycemia-mediated injuries in mouse podocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(3): 891-902. DOI: 10.1159/000366307.
 [16] Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox[J]. Diabetes, 1999, 48(10): 1899-1906. DOI: 10.2337/diabetes.48.10.1899.
 [17] Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(5): 1635-1639. DOI: 10.2337/diabetes.51.5.1635.
 [18] Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression[J]. Am J Pathol, 1999, 154(2): 375-384. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65284-4.
 [19] Nishizono S, Hayami T, Ikeda I, et al. Protection against the diabetogenic effect of feeding tert-butylhydroquinone to rats prior to the administration of streptozotocin[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(6): 1153-1158. DOI: 10.1271/bbb.64.1153.

(收稿日期: 2016-01-12)

(本文编辑: 刘艳 张宇)

· 病例报告 ·

Leber 特发性星芒状视神经视网膜炎一例

孙则红 戴冬妹 王志学 杨远

061001 河北省沧州市中心医院眼科

通信作者: 戴冬妹, Email: hbczszh@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.005

患儿, 女, 12 岁, 因左眼眼前黑影伴阵发性视物模糊 2 个月于 2013 年 2 月 23 日至沧州市中心医院眼科就诊。患儿自幼皮

疹常年反复发作, 春季多发, 面部及肢体暴露处明显, 一般迁延数月。否认猫抓咬伤史, 有与犬密切接触史。父母非近亲结