

· 实验研究 ·

α -黑素细胞刺激素对早期糖尿病大鼠视网膜血管渗漏的保护作用

韩倩 张琰 薄其玉 茹玉莎 杨伟 李筱荣

【摘要】 背景 糖尿病视网膜病变(DR)的主要病理基础是视网膜的微血管变化和炎性改变。研究认为 α -黑素细胞刺激素(α -MSH)玻璃体腔注射可对视网膜脉络膜组织发挥抗氧化应激和抗凋亡作用,从而改善血-视网膜屏障(BRB)功能,但缺乏组织学研究的验证。目的 研究 α -MSH 对视网膜血管渗漏的改善作用。方法 应用随机数字表法将清洁级 SD 大鼠 90 只随机分为正常对照组、糖尿病(DM)模型组和 α -MSH 组,DM 模型组和 α -MSH 组大鼠采用尾静脉注射链脲佐菌素(STZ)法制备模型,正常对照组大鼠同法注射枸橼酸钠缓冲液。 α -MSH 组大鼠分别于造模后 1 周和 3 周玻璃体腔注射 $3.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH $3 \mu\text{l}$,正常对照组大鼠同法注射生理盐水 $3 \mu\text{l}$,DM 模型组不行玻璃体腔注射。造模后第 5 周,按照 $45 \text{ mg}/\text{kg}$ 的剂量经鼠尾静脉注射 $30 \text{ mg}/\text{ml}$ 伊文思蓝溶液,注射后 2 h 每组取 2 只大鼠制备视网膜铺片,于荧光显微镜下观察视网膜血管形态;收集各组 8 只大鼠内眦部血液,检测 BRB 渗漏状况;用 37°C 枸橼酸钠缓冲液行左心室灌流,处死大鼠,分离大鼠视网膜,透射电子显微镜下观察脉络膜和视网膜血管超微结构的变化;采用实时定量 PCR 法检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、闭合蛋白(occludin)和血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 的相对表达水平。结果 DM 模型大鼠体质量明显降低,饮水量明显增多;造模后 3 d 和 5 周,DM 模型组大鼠的血糖分别为 $(29.69 \pm 4.77) \text{ mmol}/\text{L}$ 和 $(24.64 \pm 2.72) \text{ mmol}/\text{L}$,DM 模型成功建立。视网膜铺片显示,DM 模型组大鼠视网膜血管走行异常,血管壁大量伊文思蓝渗漏,而 α -MSH 组大鼠视网膜血管形态接近正常对照组。造模后 5 周,DM 模型组大鼠视网膜伊文思蓝的渗漏量为 $(10.04 \pm 8.18) \mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{h})$,明显多于 α -MSH 组的 $(2.62 \pm 3.73) \mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 和正常对照组的 $(3.10 \pm 1.13) \mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{h})$,差异均有统计学意义($P = 0.035, 0.041$)。 α -MSH 组大鼠脉络膜和视网膜血管的超微结构接近正常对照组,而 DM 模型组大鼠脉络膜血管内皮细胞肿胀,视网膜色素上皮(RPE)空泡样变性。此外,DM 模型组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 和 TNF- α mRNA 水平明显高于 α -MSH 组和正常对照组,而 occludin mRNA 的相对表达水平明显低于 α -MSH 组和正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。3 个组大鼠视网膜中 VEGF mRNA 相对表达量的整体比较,差异无统计学意义($F = 0.791, P = 0.466$)。结论 在 STZ 诱导的 DM 模型大鼠中,玻璃体腔注射 α -MSH 可通过减少视网膜血管的渗漏,改善脉络膜和视网膜血管的超微结构,下调视网膜中促炎因子的表达和上调细胞间紧密连接成分的表达发挥对视网膜的保护作用。

【关键词】 α -黑素细胞刺激素;糖尿病视网膜病变/治疗;细胞间黏附分子-1;肿瘤坏死因子- α ;闭合蛋白;血管内皮生长因子;血-视网膜屏障;SD 大鼠

Alleviating effects of α -melanocyte-stimulating hormone on retinal vessel leakage in diabetic rats Han Qian, Zhang Yan, Bo Qiyu, Ru Yusha, Yang Wei, Li Xiaorong. Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, College of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China
Corresponding authors: Zhang Yan, Email: yanzhang9927@163.com; Li Xiaorong, Email: xiaorli@163.com

[Abstract] **Background** The primary pathogenic basis of diabetic retinopathy (DR) is microangiopathy and inflammatory procedure. Studies showed that α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) can play anti-oxidative stress and anti-apoptosis effects on retina via intravitreal injection and therefore mend blood-retinal barrier (BRB). However, experiment has not yet proved its mechanism. **Objective** This study was to investigate the protective

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.006

基金项目:教育部博士点基金项目(20111202110008、20121202120005);教育部留学回国基金项目(第 45 批)

作者单位:300384 天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院

通信作者:张琰,Email:yanzhang9927@163.com;李筱荣,Email:xiaorli@163.com

effects of α -MSH on retinal vessel in diabetic rats. **Methods** Ninety clean SD rats were assigned to the normal control group, diabetes mellitus (DM) model group and α -MSH group. DM models were established by streptozocin (STZ) injection via tail vein in the rats of the DM model group and the α -MSH group, and sodium citrate buffer was injected in the same way in the normal control group. α -MSH of $3 \mu\text{l}$ ($3.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) was intravitreally injected 1 week and 3 weeks after modeling in the rats of the α -MSH group, and normal saline solution was used in the same way in the normal control group; while no operation was performed in the DM model group. In the fifth week after modeling, Evans blue at the dose of 30 mg/ml (45 mg/kg) was injected via tail vein of rats, and retinal mount was prepared 2 hours later to examine the morphology of retinal vessels under the fluorescent microscope. The blood samples were collected from inner canthus vein for the assessment of leakage amount of Evans blue. The rat retinas were isolated after perfusion of sodium citrate buffer via the left ventricle for the observation of choroidal and retinal vessel ultrastructure by transmission electron microscopy (TEM). The relative expressions of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA, tumor necrosis factor- α (TNF- α), occludin mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA were detected by quantitative real-time PCR. **Results** The body weight was lighter and the water intake was higher in the DM rats than those in the normal control rats. The blood glucose levels in the DM model group were (29.69 ± 4.77) mmol/L at the third day and (24.64 ± 2.72) mmol/L in the fifth week following the injection of STZ, respectively. An amount of Evans blue leaked from vessels in the rat retina of DM model group, but the retinal vessels were intact in the rats of the α -MSH group and the normal control group. The leakage amount was (10.04 ± 8.18) $\mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{h})$ in the DM model group, which was significantly more than that of (2.62 ± 3.73) $\mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{h})$ in the α -MSH group and (3.10 ± 1.13) $\mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{h})$ in the normal control group at the fifth week after modeling ($P = 0.035, 0.041$). The ultrastructure of choroidal and retinal vessels was almost normal in the α -MSH group and the normal control group, but the swelling of choroidal vascular endothelial cells and vacuolar-like changes of the retinal pigment epithelium (RPE) were found in the DM model group. In addition, the relative expression levels of ICAM-1 mRNA and TNF- α mRNA were significantly elevated, but those of occludin mRNA were significantly declined in the DM model group compared with the α -MSH group and the normal control group (all at $P < 0.05$). No significant difference was found in the relative expression level of VEGF mRNA among the three groups ($F = 0.791, P = 0.466$). **Conclusions** α -MSH ameliorates retinal vascular leakage in STZ-induced diabetic rats after intravitreal injection by improving ultrastructure of choroid and retinal vessels, down-regulating the expression of proinflammatory factors and up-regulating tight junction component in retina.

[Key words] α -Melanocyte-stimulating hormone; Diabetic retinopathy/therapy; Intercellular adhesion molecule-1; Tumor necrosis factor- α ; Occludin; Vascular endothelial growth factor; Blood-retina barrier; Rats, Sprague Dawley

糖尿病性黄斑水肿 (diabetic macular edema, DME) 严重影响视功能, 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 的并发症之一, 主要由血-视网膜屏障 (blood-retina barrier, BRB) 破坏而导致的视网膜血管渗漏引起^[1]。研究表明, 在 DM 临床前期或早期, 高血糖、氧化应激和炎性微环境可导致视网膜中弥漫性的 BRB 破坏和血管渗漏^[2], 如果得不到有效干预和治疗, 晚期组织缺氧可导致血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达上调, 视网膜血管结构的病理性改变引起毛细血管内静水压升高, 血液中的大分子蛋白质、电解质伴随血清渗漏到视网膜组织间隙, 使得组织间隙渗透压增高, 继而加重视网膜血管渗漏^[3]。DME 的治疗方法包括黄斑周围视网膜激光光凝、糖皮质激素和/或抗 VEGF 药物的玻璃体腔注射^[4-5], 虽有一定的疗效, 但均存在长期疗效不稳定和

并发症等问题^[2,6]。因此, 在糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 渗漏的早期阶段寻求一种新型、有效的干预手段具有重要的临床意义。 α -黑素细胞刺激素 (α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH) 是阿片-促黑素细胞皮质素原的衍生肽, 在体内组织细胞中分布广泛^[7], 经末端修饰后具有生物活性, 可结合黑素细胞皮质素受体介导生物学功能^[8], 在眼部的功能包括调节免疫应答、维持眼部免疫豁免状态、抗炎等^[9-10]。动物实验表明, 玻璃体腔注射 α -MSH 可对视网膜血管和神经视网膜起到抗氧化应激和抗凋亡的作用, 同时还有效改善视网膜血管的超微结构和炎性微环境^[11], 而这 3 种因素正是 DR 早期引起渗漏的主要原因^[2], 由此推断, α -MSH 可能减轻早期 DR 引起的血管渗漏。本研究中探讨玻璃体腔注射 α -MSH 对早期 DM 大鼠视网膜渗漏的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 8~10 周龄雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 90 只(购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心),体质量 200~220 g,饲养于中国医学科学院放射研究所。对大鼠供给足够的食物和水,进行 12 h 暗/12 h 明循环光照,饲养环境温度为 22~25 °C,相对湿度为 40%~70%。所有实验动物的使用、饲养及处死均遵循美国视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范,且本研究经过天津医科大学实验动物伦理学委员会审核通过。

1.2 DM 大鼠模型的制备及实验分组

按照随机数字表法将大鼠分为 α -MSH 组、DM 模型组和正常对照组,每组 30 只。 α -MSH 组和 DM 模型组大鼠经尾静脉以 45 mg/kg 的剂量注射质量分数 2% 链脉佐菌素 (streptozocin, STZ) (美国 Amresco Chemical 公司) (溶于 pH 4.5 的枸橼酸钠缓冲液) 诱导 DM,正常对照组大鼠则用同样方法注射枸橼酸钠缓冲液。72 h 后检测血糖,血糖高于 20 mmol/L 为造模成功。每周监测 DM 模型组和正常对照组大鼠的体质量和饮水量。在造模后 3 d 和 5 周进行血糖监测。分别于造模后 1 周和 3 周进行玻璃体腔注射。 α -MSH 组 DM 大鼠用 33G 针头及 10 μ l 微量注射器,于角膜缘后 2 mm 处以 45° 进针,缓慢将 3.3 μ g/ μ l α -MSH 3 μ l 注入右眼玻璃体腔,静置 15 s 后缓慢撤针,正常对照组大鼠同法注射 3 μ l 生理盐水,注射结束后用氧氟沙星滴眼液点眼。DM 模型组大鼠不进行玻璃体腔注射。

1.3 伊文思蓝法检测视网膜血管渗漏情况

造模后 5 周,按照 45 mg/kg 的剂量经鼠尾静脉注射 30 mg/ml 伊文思蓝(美国 Sigma 公司,溶于生理盐水后过滤)溶液,注射后 2 h,每组取 2 只大鼠的眼球制备视网膜铺片,于荧光显微镜下观察视网膜血管形态;另各取 8 只大鼠,内眦部取血(≥ 1 ml),置于含肝素的采血管内。然后用 37 °C 枸橼酸钠缓冲液(pH 3.5)经左心室推注充分灌流,随后处死大鼠,分离大鼠视网膜,-80 °C 冻存。将采血管中的血液充分混匀,离心半径 10 cm,取出 1 ml 血液在室温下 12 000 r/min 离心 20 min。取上层血浆,用甲酰胺 1:100 稀释。将伊文思蓝粉末溶于甲酰胺中,配制以下标准曲线溶液:50 000 ng/ml、25 000 ng/ml、10 000 ng/ml、5 000 ng/ml、1 000 ng/ml、500 ng/ml、250 ng/ml、125 ng/ml、0 ng/ml。将标准曲线溶液和稀释的血液样本按顺序依次置于 96 孔板中,每孔 60 μ l。用 Infinite M200PRO 酶标仪

(瑞士 TECAN 公司)测定波长 620 nm 处的吸光度(A_{620})值,并以 A_{740} 值作为校正值。按标准曲线分析数据,计算血液中伊文思蓝的质量浓度。

取出视网膜标本,在 37 °C 烤箱内烘烤 5 h 后称质量,计算视网膜干质量。每个视网膜标本加入 150 μ l 甲酰胺,于 70 °C 烘烤 18 h。然后 4 °C 下 12 000 r/min 离心 2 min,取上清液,加入到 30 KD Amicon® Ultra 超滤离心管(爱尔兰 Millipore 公司)中,4 °C 条件下 3 000 \times g 离心 90 min,收集液体至预先标记的离心管中。按上述方法配制标准曲线溶液,将标准曲线溶液和视网膜样本按顺序依次置于 96 孔板中,如上用酶标仪测定 A 值,计算超滤液中伊文思蓝的含量及其通透性。伊文思蓝通透性 [μ l/(g·h)] = [伊文思蓝含量(μ g)/视网膜组织干质量(g)]/[时间平均性伊文思蓝质量浓度(μ g/ μ l) \times 循环时间(h)]。

1.4 透射电子显微镜下观察脉络膜和视网膜血管超微结构的变化

造模后第 5 周,摘除大鼠眼球,即刻投入预冷的戊二醛固定液中。眼球标本先后经质量分数 2.5% 戊二醛和质量分数 1% 四氧化锇固定;梯度乙醇脱水;环氧丙烷处理后包埋于 Epon812 树脂中,行 50 nm 超薄切片,用醋酸铀-枸橼酸铅双染后,透射电子显微镜下观察视网膜血管超微结构的变化并拍照。

1.5 实时定量 PCR 法检测大鼠视网膜中促炎因子、闭合蛋白和促血管生成因子的表达

造模后 5 周,取大鼠视网膜,按照 GeneJET RNA 提取试剂盒(天津 Thermo Fisher Scientific 公司)说明书提取总 RNA,用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(天津 Thermo Fisher Scientific 公司)测量 RNA 浓度和纯度。取 450 ng 总 RNA,用随机六聚体引物,按 RevertAid cDNA 合成试剂盒(北京 Thermo Fisher Scientific 公司)说明书进行逆转录。以 3 μ l cDNA 为模板,加入细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、闭合蛋白(occludin)、VEGF、18 S 靶基因序列上下游引物(表 1),以及 5 μ l 2 倍通用性 Master Mix(天津 Roche 公司),再加入无核酸酶的 H₂O 补足 10 μ l 反应体系,在 384 孔板中进行 Cyber Green 实时 PCR 扩增。实时 PCR 扩增参数:50 °C 预孵育 2 min,95 °C 变性 10 min,40 次循环:95 °C 15 s,60 °C 1 min,并加入解离阶段,95 °C 15 s,60 °C 15 s,95 °C 15 s,以检测扩增产物的特异性。然后以 18 S rRNA 为内参照,用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}} 法分析所得数据。 Δ Ct = 目的基因 Ct - 内参照 Ct, $\Delta\Delta$ Ct = 目的基因 Δ Ct - 参照因子 Δ Ct。

表 1 大鼠基因引物序列

引物	序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
ICAM-1	F:CGGGAGATGAATGGTACCTACAA	68
	R:TGCAGTCCCTGGTGATACTC	
TNF- α	F:TGATCGGTCCCAACAAGGA	67
	R:GGTCTGGCCATGGAA	
occludin	F:GGCGGAGAGATGCACGTT	70
	R:GAATTTCTGCTTCCGGGTAATAA	
VEGF	F:GGGCCTCTGAAACCATGAACT	73
	R:TGGTGGAGGTACAGCAGTAAAGC	
18 S	F:TGATTAAGTCCTGCCTTTGT	75
	R:GATCCGAGGGCTCACTAAAC	

注:ICAM:细胞间黏附分子;TNF:肿瘤坏死因子;occludin:闭合蛋白;VEGF:血管内皮生长因子

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(IBM SPSS Statistics; Armonk, NY, USA) 进行统计分析。各组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,经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机分组多水平实验设计,DM 模型组与正常对照组大鼠体质量、血糖水平和饮水量的总体差异比较采用重复测量两因素方差分析,多重比较采用 Scheffé post hoc 检验。DM 模型组、 α -MSH 组和正常对照组大鼠视网膜血管中伊文思蓝渗漏量、视网膜中 ICAM-1、TNF- α 、occludin 和 VEGF mRNA 相对表达水平的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Scheffé post hoc 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 各组大鼠造模情况

造模后 3 d 和 1、2、3、4、5 周 DM 模型组大鼠的体质量分别为 (285.30 \pm 12.00)、(300.30 \pm 24.98)、(307.07 \pm 31.13)、(296.04 \pm 40.76)、(309.67 \pm 43.65) 和 (323.52 \pm 51.57) g,正常对照组大鼠的体质量分别为 (317.82 \pm 14.78)、(365.55 \pm 24.86)、(404.45 \pm 34.23)、(426.18 \pm 37.94)、(444.18 \pm 35.33) 和 (471.00 \pm 43.86) g,DM 模型组大鼠体质量在造模后呈缓慢上升趋势,而正常对照组大鼠体质量呈接近直线上升趋势 ($F_{\text{分组}} = 189.210, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 12.930, P = 0.000$),且在每一时点均显著高于 DM 模型组大鼠 (3 d: $t = 7.230, P = 0.000; 1$ 周: $t = 7.450, P = 0.000; 2$ 周: $t = 8.640, P = 0.000, 3$ 周: $t = 8.850, P = 0.000, 4$ 周: $t = 8.960, P = 0.000; 5$ 周: $t = 9.210, P = 0.000$) (图 1A)。

造模后 3 d 和 5 周,DM 模型组大鼠的血糖分别为

(29.69 \pm 4.77) mmol/L 和 (24.64 \pm 2.72) mmol/L,正常对照组大鼠的血糖分别为 (6.93 \pm 1.12) mmol/L 和 (5.08 \pm 1.13) mmol/L。正常对照组和 DM 模型组之间比较,差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 300.343, P = 0.000$),而不同时间点间比较差异无统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 2.395, P = 0.128$);在造模后 3 d 及 5 周,DM 模型组大鼠血糖均显著高于正常对照组,差异均有统计学意义 ($t = 15.550, 13.550$, 均 $P = 0.000$) (图 1B)。正常对照组大鼠日平均饮水量约为 50 ml,造模后第 4 周,DM 模型组大鼠日平均饮水量为 200 ~ 300 ml,为正常大鼠的 4 ~ 5 倍(图 1C)。尿蛋白检测结果显示,造模后 5 周 DM 模型组大鼠尿蛋白检测结果为阳性,而正常对照组为阴性。

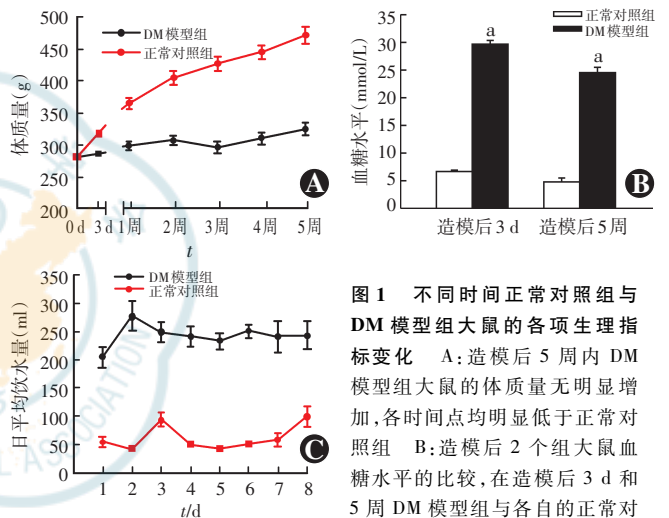


图 1 不同时间正常对照组与 DM 模型组大鼠的各项生理指标变化 A:造模后 5 周内 DM 模型组大鼠的体质量无明显增加,各时间点均明显低于正常对照组 B:造模后 2 个组大鼠血糖水平的比较,在造模后 3 d 和 5 周 DM 模型组与各自的正常对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验) C:造模后 DM 模型组大鼠日平均饮水量均明显多于正常对照组大鼠 DM:糖尿病

2.2 各组大鼠视网膜血管渗漏情况

视网膜铺片中可见正常对照组大鼠视网膜血管分布和管径粗细均匀,走行正常,血管壁平滑,未见伊文思蓝染料渗漏(图 2A)。DM 模型组大鼠视网膜血管管径粗细不均,管壁不完整,可见伊文思蓝染料渗漏(图 2B),而 α -MSH 组大鼠视网膜血管的形态接近正常,在视网膜中的分布与正常对照组相似(图 2C)。

造模后 5 周,依据血液、视网膜中伊文思蓝含量的标准曲线(图 3A, B),经统计后得出正常对照组、DM 模型组、 α -MSH 组大鼠视网膜中伊文思蓝的渗漏量分别为 (3.10 \pm 1.13)、(10.04 \pm 8.18) 和 (2.62 \pm 3.73) $\mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{h})$,3 个组总体比较差异有统计学意义 ($F = 4.800, P = 0.020$),其中 DM 模型组伊文思蓝的渗漏量明显多于正常对照组, α -MSH 组大鼠视网膜伊文思蓝的通透性较 DM 模型组显著下降,差异均有统计学意义 ($P = 0.041, 0.035$), α -MSH 组水平接近正常对照组,差异无统计学意义 ($P = 0.983$) (图 3C)。

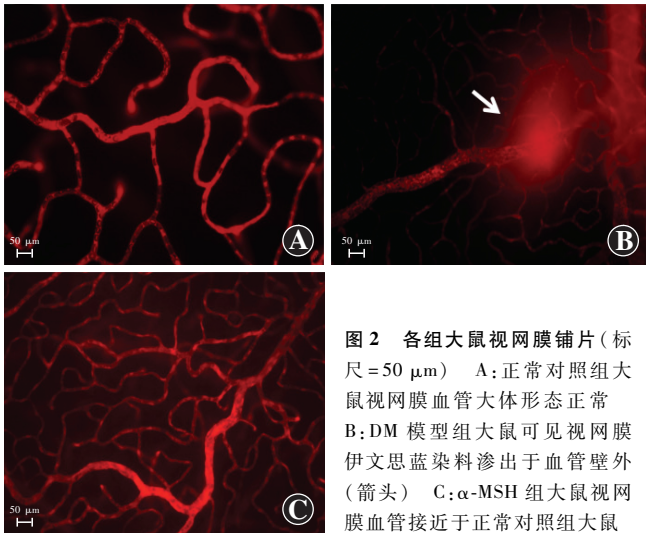


图 2 各组大鼠视网膜铺片 (标尺=50 μm) A: 正常对照组大鼠视网膜血管大体形态正常 B: DM 模型组大鼠可见视网膜伊文思蓝染料渗出于血管壁外 (箭头) C: α-MSH 组大鼠视网膜血管接近于正常对照组大鼠

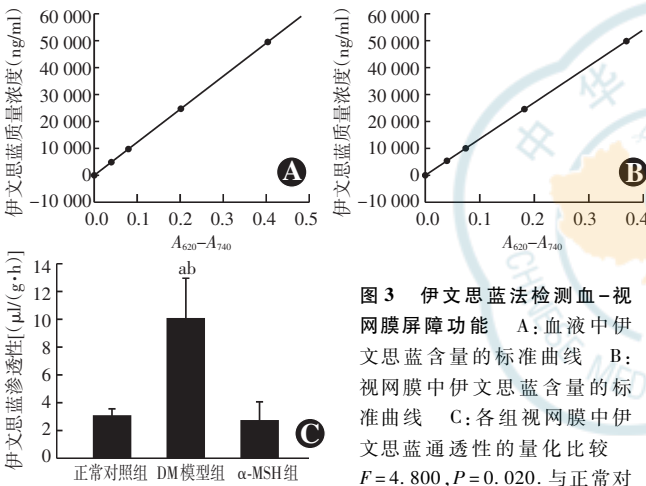


图 3 伊文思蓝法检测血-视网膜屏障功能 A: 血液中伊文思蓝含量的标准曲线 B: 视网膜中伊文思蓝含量的标准曲线 C: 各组视网膜中伊文思蓝通透性的量化比较 $F=4.800, P=0.020$. 与正常对照组比较, $^a P<0.05$; 与 α-MSH 组比较, $^b P<0.05$ (单因素方差分析, Scheffé post hoc 检验) DM: 糖尿病; MSH: 黑素细胞刺激素

2.3 各组大鼠神经视网膜和视网膜血管超微结构变化

正常对照组大鼠视网膜造模后 5 周, DM 模型组脉络膜毛细血管基底膜呈复层化, 如洋葱皮样; 在脉络膜毛细血管管腔的一侧可见略微肿胀的血管内皮细胞; 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞间隙扩张, 呈空泡样改变。接近内界膜的视网膜毛细血管内皮细胞肿胀、变形, 红细胞呈泥沙样淤积, 与内皮细胞黏附, 视网膜毛细血管管腔狭窄; α-MSH 组大鼠脉络膜和视网膜血管超微结构、形态接近于正常对照组 (图 4)。

2.4 各组大鼠视网膜中相关基因的表达变化

正常对照组、DM 模型组、α-MSH 组视网膜中 ICAM-1 mRNA 的相对表达水平分别为 0.38 ± 0.28 、 1.03 ± 0.45 和 0.30 ± 0.31 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=11.480, P=0.000$), 与正常对照组比较, DM 模型组 ICAM-1 mRNA 的相对表达量明显升高, 差异有统

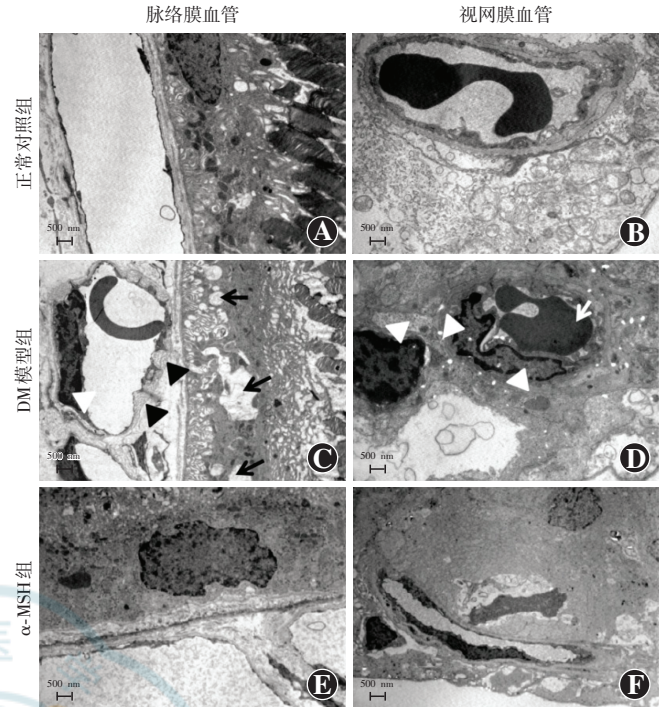


图 4 透射电子显微镜下观察脉络膜和视网膜血管超微结构的变化 (标尺=500 nm) A: 正常对照组脉络膜毛细血管管腔通畅, 基底膜完整, 呈串珠样 B: 正常对照组视网膜毛细血管基底膜正常, 胶原纤维排列整齐, 管腔通畅, 其内可见通过的红细胞 C: DM 模型组脉络膜毛细血管基底膜复层化 (黑三角), 脉络膜毛细血管内皮细胞肿胀 (白三角), RPE 层空泡化 (箭头) D: DM 模型组视网膜毛细血管中可见肿胀、变形的血管内皮细胞 (白三角), 视网膜毛细血管中的红细胞呈泥沙状淤积 (白箭头) E: α-MSH 组脉络膜毛细血管通畅 F: α-MSH 组视网膜小血管管腔通畅, 血管内可见少量红细胞及血小板 DM: 糖尿病; MSH: 黑素细胞刺激素

计学意义 ($P=0.004$), α-MSH 组的相对表达量接近正常对照组, 差异无统计学意义 ($P=0.873$); α-MSH 组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 相对表达水平明显低于 DM 模型组, 差异有统计学意义 ($P=0.001$) (图 5A)。

正常对照组、DM 模型组和 α-MSH 组大鼠视网膜中 TNF-α mRNA 的相对表达水平分别为 1.56 ± 1.69 、 13.71 ± 5.71 和 4.11 ± 2.36 , 3 个组总体比较差异有统计学意义 ($F=24.030, P=0.000$), DM 模型组 TNF-α mRNA 相对表达水平明显高于正常对照组和 α-MSH 组, 差异均有统计学意义 (均 $P=0.000$), α-MSH 组与正常对照组 ICAM-1 mRNA 相对表达水平接近, 差异无统计学意义 ($P=0.873$) (图 5B)。

正常对照组、DM 模型组、α-MSH 组视网膜中的 occludin mRNA 相对表达水平分别为 0.90 ± 0.34 、 0.41 ± 0.18 和 0.86 ± 0.34 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=11.480, P=0.009$), DM 模型组大鼠的 occludin mRNA 相对表达水平明显低于正常对照组和 α-MSH 组, 差异均有统计学意义 ($P=0.022, 0.024$), α-MSH 组与正常对照组 occludin mRNA 相对表达水平接近, 差异无统

计学意义($P=0.960$)(图 5C)。

正常对照组、DM 模型组和 α -MSH 组 VEGF mRNA 相对表达水平分别为 0.58 ± 0.24 、 0.46 ± 0.16 和 0.50 ± 0.15 , 3 个组间总体比较差异无统计学意义($F=0.791, P=0.466$)(图 5D)。

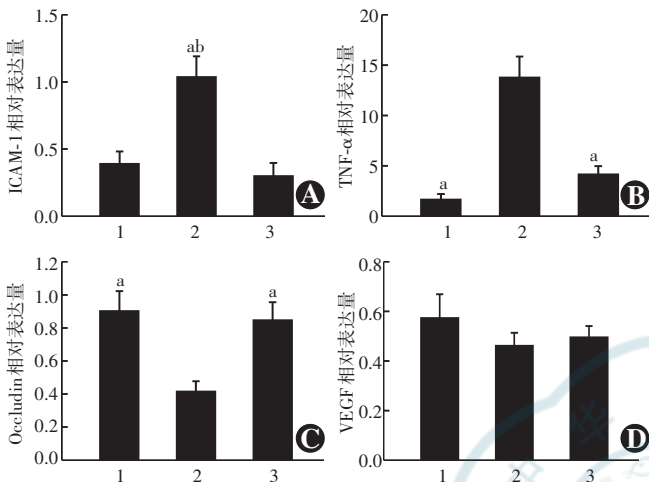


图 5 各组大鼠视网膜中血管渗漏相关基因的表达比较 A: 各组大鼠视网膜中 ICAM-1 mRNA 相对表达比较 $F=11.480, P=0.000$. 与正常对照组比较, $^a P<0.01$; 与 α -MSH 组比较, $^b P<0.01$ (单因素方差分析, Scheffé post hoc 检验) B: 各组大鼠视网膜中 TNF- α mRNA 相对表达比较 $F=24.030, P=0.000$. 与 DM 模型组比较, $^a P<0.01$ (单因素方差分析, Scheffé post hoc 检验) C: 各组大鼠视网膜中 occludin mRNA 相对表达比较 $F=11.480, P=0.009$. 与 DM 模型组比较, $^a P<0.01$ (单因素方差分析, Scheffé post hoc 检验) D: 各组大鼠视网膜中 VEGF mRNA 相对表达比较 $F=0.791, P=0.466$ (单因素方差分析) 1: 正常对照组; 2: DM 模型组; 3: α -MSH 组 ICAM: 细胞间黏附分子; TNF: 肿瘤坏死因子; occludin: 闭合蛋白; VEGF: 血管内皮生长因子

3 讨论

鼠尾静脉注射 STZ 可导致胰岛 β 细胞的选择性死亡, 引起胰岛素分泌量绝对不足而致出现高血糖症状, 大鼠可出现体质量减轻, 多饮、多尿、多食等与 1 型 DM 相似的代谢综合征。因为胰岛 β 细胞的损伤是永久性的, 所以 STZ 诱导的 1 型 DM 模型不会随时间的延长自行减轻或恢复^[12]。本研究中注射 STZ 后发现, DM 模型组大鼠体质量显著低于正常对照组, 且血糖与日饮水量均显著高于正常对照组, 提示 DM 模型组大鼠出现典型的 DM 代谢症状, 造模成功。另外, α -MSH 为玻璃体腔注射, 对注射 α -MSH 的 DM 大鼠生理指标的检测提示, α -MSH 对 DM 引起的全身代谢指标影响不明显。

在 STZ 诱导的 DM 大鼠模型中, 视网膜血管损伤的早期表现之一即为 BRB 破坏和血管渗漏, 与人 DR 的初始阶段相似^[2]。本研究伊文思蓝实验结果显示,

STZ 诱导的 DM 大鼠在造模后 5 周可出现功能性的 BRB 破坏和血管渗漏。同时透射电子显微镜观察结果也显示, DM 大鼠脉络膜毛细血管基底膜复层化, RPE 层有空泡样变; 而视网膜毛细血管出现管腔狭窄, 内皮细胞肿胀和血细胞的泥沙样淤积, 这些超微结构的变化提示在 DM 大鼠造模后 5 周, 外层 BRB(主要由 RPE 细胞组成) 和内层 BRB(主要由视网膜毛细血管内皮细胞组成) 均出现一定程度的损伤, 从而形成 DM 视网膜血管渗漏的形态学基础。玻璃体腔注射 α -MSH 后, DM 视网膜血管的功能性渗漏和形态明显改善, 与正常对照组接近, 这一结果提示, 继我们先前证实的 α -MSH 在 STZ 诱导的 DM 大鼠视网膜中的抗凋亡、抗氧化应激作用之后^[11], 这一肽类物质还对 BRB 破坏引起的视网膜血管渗漏起到保护作用。

另一方面, 本研究还对 α -MSH 在 DM 视网膜中渗漏保护作用的机制进行了探讨。首先, α -MSH 可以显著降低 DM 大鼠视网膜中促炎因子 ICAM-1 和 TNF- α 的表达, 这与我们先前的研究结果^[11] 一致, 提示 α -MSH 可以改善高血糖和氧化应激造成的视网膜炎性微环境。其次, α -MSH 显著上调 DM 大鼠视网膜中 occludin mRNA 的表达水平。Occludin 基因编码的蛋白是视网膜血管内皮细胞之间紧密连接的重要组成部分, 是构成 BRB 的关键蛋白之一^[13]。据文献报道, 在 DM 大鼠模型以及高糖刺激的视网膜血管内皮细胞中 occludin 的表达可显著降低^[14-15], 进而引起 BRB 破坏和血管渗漏。本研究结果也显示, occludin 在 DM 视网膜中的表达降低, 而 α -MSH 对 occludin 表达的促进作用提示其可以通过加强视网膜血管内皮细胞之间的紧密连接而增强 BRB 的功能。最后, VEGF mRNA 水平在各组之间差异无统计学意义。这与我们先前的研究结果^[16] 以及文献报道^[17-18] 相一致, VEGF mRNA 水平在 STZ 诱导的 DM 大鼠成模后 10 周和 12 周才会出现显著上调, 而在成模早期(8 周以前) 并无显著变化; 但这并不排除 VEGF 在蛋白水平的表达上调, 或 VEGF/VEGFR2 介导的信号传导通路的活性增高。

总之, 玻璃体腔注射 α -MSH 可以在早期 DM 大鼠视网膜中起到减轻视网膜血管渗漏和改善 BRB 超微结构的保护作用, 而这种保护作用可能是由于 α -MSH 改善 DM 视网膜中促炎因子上调引起的炎性微环境, 以及加强血管内皮细胞间的紧密连接引起的。 α -MSH 在早期 DM 大鼠视网膜中具有抗氧化应激、抗凋亡、抗渗漏的保护作用, 提示其可以开发成为一种新型、有效的针对早期 DR 的干预手段。

参考文献

- [1] Zhang X, Zeng H, Bao S, et al. Diabetic macular edema: new concepts in patho-physiology and treatment [J/OL]. Cell Biosci, 2014, 4 : 27 [2014-06-23]. <http://www.cellandbioscience.com/content/4//27>. doi:10.1186/2045-3701-4-27.
- [2] Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions [J]. Prog Retin Eye Res, 2013, 34 : 19-48. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.02.001.
- [3] Ehrlich R, Harris A, Ciulla TA, et al. Diabetic macular oedema: physical, physiological and molecular factors contribute to this pathological process [J]. Acta Ophthalmol, 2010, 88 (3) : 279-291. doi:10.1111/j.1755-3768.2008.01501.x.
- [4] Meyer CH. Current treatment approaches in diabetic macular edema [J]. Ophthalmologica, 2007, 221 (2) : 118-131.
- [5] Bandello F, Casalino G, Loewenstein A, et al. Pharmacological approach to diabetic macular edema [J]. Ophthalmic Res, 2014, 51 (2) : 88-95. doi:10.1159/000356693.
- [6] Owen LA, Hartnett ME. Soluble mediators of diabetic macular edema: the diagnostic role of aqueous VEGF and cytokine levels in diabetic macular edema [J]. Curr Diab Rep, 2013, 13 (4) : 476-480. doi:10.1007/s11892-013-0382-z.
- [7] Wardlaw SL. Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 660 (1) : 213-219. doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.107.
- [8] Yang Y. Structure, function and regulation of the melanocortin receptors [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 660 (1) : 125-130. doi:10.1016/j.ejphar.2010.12.020.
- [9] Taylor AW, Lee D. Applications of the role of alpha-MSH in ocular immune privilege [J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 681 : 143-149. doi:10.1007/978-1-4419-6354-3_12.
- [10] Lee DJ, Biros DJ, Taylor AW. Injection of an alpha-melanocyte stimulating hormone expression plasmid is effective in suppressing experimental autoimmune uveitis [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9 (9) : 1079-1086. doi:10.1016/j.intimp.2009.05.001.
- [11] Zhang L, Dong L, Liu X, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects retinal vascular endothelial cells from oxidative stress and apoptosis in a rat model of diabetes [J/OL]. PLoS One, 2014, 9 (4) : e93433 [2014-08-16]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093433>. doi:10.1371/journal.pone.0093433.
- [12] Lai AK, Lo AC. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison [J/OL]. J Diabetes Res, 2013, 2013 : 106594 [2014-08-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286086>. doi:10.1155/2013/106594.
- [13] Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA. Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions [J]. Angiogenesis, 2007, 10 (2) : 103-117.
- [14] Fan Y, Liu K, Wang Q, et al. Exendin-4 alleviates retinal vascular leakage by protecting the blood-retinal barrier and reducing retinal vascular permeability in diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. Exp Eye Res, 2014, 127 : 104-116. doi:10.1016/j.exer.2014.05.004.
- [15] Tien T, Barrette KF, Chronopoulos A, et al. Effects of high glucose-induced Cx43 downregulation on occludin and ZO-1 expression and tight junction barrier function in retinal endothelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54 (10) : 6518-6525. doi:10.1167/iov.13-11763.
- [16] Hu B, Zhang Y, Zeng Q, et al. Intravitreal injection of ranibizumab and CTGF shRNA improves retinal gene expression and microvessel ultrastructure in a rodent model of diabetes [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15 (1) : 1606-1624. doi:10.3390/ijms15011606.
- [17] Gong CY, Lu B, Hu QW, et al. Streptozotocin induced diabetic retinopathy in rat and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptor [J]. Int J Ophthalmol, 2013, 6 (5) : 573-577. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2013.05.03.
- [18] Yang H, Huang Y, Chen X, et al. The role of CTGF in the diabetic rat retina and its relationship with VEGF and TGF-beta(2), elucidated by treatment with CTGFsiRNA [J]. Acta Ophthalmol, 2010, 88 (6) : 652-659. doi:10.1111/j.1755-3768.2009.01641.x.

(收稿日期:2014-12-10)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

投稿请登陆中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>), 登录后点击“业务中心”, 经中华医学会远程稿件处理系统 (<http://www.cma.org.cn/ywzx/index.html>) 或中华医学会杂志社网站 (<http://www.medline.org.cn/>), 根据提示进行注册后投稿。投稿时请使用 Word 格式 (.doc 文件类型), 投稿后请注意自留原稿, 并保留论文相关的原始资料, 以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”, 填写有关项目并请每位作者亲笔签字, 加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中著录的相一致, 如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意: (1) 在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2) 作者须告知与该研究有关的利益冲突, 如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

本刊对一稿两投的处理

作者投稿请勿一稿两投或一稿多投。本刊编辑部发现一稿两投并经证实后, 稿件将不予审理并对作者进行告知。如果发现一稿两用, 本刊将做出如下处理: (1) 在本刊杂志及网站上刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明, 并在中华医学会系列杂志上通报。(2) 向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。(3) 2 年内拒绝发表其作为第一作者或通信作者的任何来稿。

文章未在公开发表物上发表者、以不同文字分别投往国外期刊和国内期刊以供不同受众者阅读者不属于一稿两投的行为, 但本刊严格遵照国际医学期刊编辑委员会《国际生物医学期刊投稿统一要求》(http://www.icmje.org/urm_main.html), 属于以不同语言文字二次发表者, 请作者在首次接受稿件的期刊发表 1 周后再另行投稿, 并请提供首次期刊同意以不同语言发表的同意函。

(本刊编辑部)