

· 实验研究 ·

NADPH 氧化酶 4 在 1 型糖尿病模型小鼠角膜病变中的致病作用及其机制

赵文心¹ 张弦² 章亚周¹ 张明¹ 高宁¹ 秦莉¹ 李晶明¹

¹西安交通大学第一附属医院眼科,西安 710061;²南昌普瑞眼科医院,南昌 330029

通信作者:李晶明,Email:jingming_li@xjtufh.edu.cn

【摘要】 目的 探讨还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 4(Nox4)在 1 型 DM 模型小鼠角膜病变中的致病作用及其可能机制。方法 选择 Nox4 基因敲除(Nox4^{-/-})纯合子雄性小鼠 40 只,以鼠龄、性别匹配的野生型 C57BL/6(Nox4^{+/+})小鼠 120 只作为对照。采用随机数字表法分别将 2 种小鼠随机分为 DM 组和非 DM 组,DM 组小鼠采用链脲佐菌素腹腔内注射法构建 1 型 DM 模型。采用随机数字表法分别将 Nox4^{+/+}小鼠 DM 组和非 DM 组分为普通饲料喂养小鼠和添加 Nox4 抑制剂 GKT137831(GKT)饲料喂养小鼠。于 DM 造模后第 16 周采用酚红棉线法检测各组小鼠泪液分泌量;采用荧光素钠染色评分法评估角膜上皮完整性;采用激光扫描共聚焦显微镜观察角膜基质层神经纤维密度变化;采用 CellROX 荧光探针检测角膜上皮中活性氧簇(ROS)含量;采用免疫荧光染色法检测小鼠角膜上皮中 E-Cadherin 蛋白和核因子-κB(NF-κB)蛋白表达变化;采用角膜铺片 TUBB3 染色法检测角膜中央区神经纤维密度。结果 Nox4^{+/+}小鼠 DM 组和非 DM 组泪液分泌量分别为(2.40±1.18)和(5.30±1.02)mm/min,差异有统计学意义(P<0.01);Nox4^{-/-}小鼠 DM 组泪液分泌量为(4.19±0.63)mm/min,明显多于 Nox4^{+/+}小鼠 DM 组,差异有统计学意义(P<0.05);普通饲料喂养小鼠与 GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组泪液分泌量分别为(2.23±0.83)和(4.02±0.71)mm/min,差异有统计学意义(P<0.01)。与 Nox4^{+/+}小鼠非 DM 组比较,Nox4^{+/+}小鼠 DM 组角膜荧光素染色评分显著升高,角膜神经纤维密度显著降低,角膜上皮中 ROS 荧光强度明显增强,E-Cadherin 蛋白表达荧光强度减弱,NF-κB 蛋白表达荧光强度增强。Nox4^{-/-}或 GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组与非 DM 组比较角膜上皮中 ROS 荧光增强,E-Cadherin 蛋白表达荧光减弱。Nox4^{-/-}和 GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组角膜上皮细胞中 NF-κB 蛋白荧光强度均较弱,与非 DM 组强度一致。角膜铺片免疫荧光染色显示,Nox4^{+/+}小鼠 DM 组中 TUBB3 染色的神经纤维密度明显低于非 DM 组,Nox4^{-/-}或 GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组角膜基质层神经纤维与非 DM 组比较无明显减少。结论 Nox4 参与了糖尿病角膜病变的致病过程,其机制可能与氧化应激诱导 ROS 产物聚集,激活 NF-κB 介导的炎症反应有关。

【关键词】 糖尿病/并发症;角膜病变;还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶;氧化应激;酶抑制剂/治疗作用;疾病模型;近交系 C57BL 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金(81740158、81460163、81300786、82000862);陕西省重点研发计划一般项目(2024SF-YBXM-322、2021SF-156);陕西省青年科技新星项目(2016KJXX-12);陕西省自然科学基金(2016JM8029);西安交通大学第一附属医院科研发展基金(HX201970、2021ZXY-10、2022QN-25)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200320-00188

Pathogenic role and mechanism of NADPH oxidase 4 in type 1 diabetic keratopathy mouse

Zhao Wenxin¹, Zhang Xian², Qin Yazhou¹, Zhang Ming¹, Gao Ning¹, Qin Li¹, Li Jingming¹

¹Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; ²Nanchang Bright Eye Hospital, Nanchang 330029, China

Corresponding author: Li Jingming, Email:jingming_li@xjtufh.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the pathogenic role and possible mechanism of NADPH oxidase 4 (Nox4) in type 1 diabetic keratopathy mouse models. **Methods** Forty Nox4 knockout (Nox4^{-/-}) heterozygous male mice were selected and 120 age- and sex-matched wild-type C57BL/6 (Nox4^{+/+}) mice were selected as controls. Nox4^{-/-} and Nox4^{+/+} mice were randomized into diabetic group (DM group) and non-DM group by random number method. Type 1 DM model was established in DM groups by intraperitoneal injection of streptozotocin. The DM and non-DM groups of Nox4^{+/+} mice were randomized into regular feed group and Nox4 inhibitor GKT137831 (GKT)

supplementary feed group by random number method. At 16 weeks after modeling, tear secretion of mice in different groups was measured by the phenol red thread test. Corneal epithelial integrity was evaluated by fluorescent staining. Changes in corneal nerve fiber density were observed by the *in vivo* laser scanning confocal microscopy. Reactive oxygen species (ROS) products in corneal epithelium were assayed by CellROX staining. The expressions of E-Cadherin and nuclear factor- κ B (NF- κ B) proteins were detected by immunofluorescence staining. Central corneal nerve fiber density was examined by flatmount staining with TUBB3 antibody. The use and care of laboratory animals complied with ARVO statement. The study protocol was approved by Laboratory Animal Care Committee of Xi'an Jiaotong University (No. XJTULAC201301). **Results** In *Nox4^{+/+}* mice, the tear secretion was (2.40±1.18) mm/minute in DM group, which was significantly less than (5.30±1.02) mm/minute in non-DM group ($P<0.01$). The tear secretion was (4.19±0.63) mm/minute in DM group of *Nox4^{-/-}* mice, which was significantly more than that in DM group of *Nox4^{+/+}* mice ($P<0.05$). Significant difference was found between (2.23±0.83) mm/minute of regular feed group and (4.02±0.71) mm/minute of GKT supplementary feed group ($P<0.01$). In *Nox4^{+/+}* mice, the DM group showed significantly increased corneal staining score, reduced corneal nerve fiber density, increased fluorescence intensity of ROS in corneal epithelium, weakened fluorescence intensity of E-Cadherin protein expression, and enhanced fluorescence of NF- κ B protein expression compared with non-DM group. In *Nox4^{-/-}* mice and mice fed with GKT supplementary feed, the increased fluorescence of ROS and decreased fluorescence of E-Cadherin protein expression were seen in the corneal epithelium of the DM groups compared with non-DM groups. In *Nox4^{-/-}* mice and mice fed with GKT supplementary feed, NF- κ B protein fluorescence was weak in corneal epithelial cells in DM groups, which was similar to that in non-DM groups. Immunofluorescence staining of corneal flatmount showed that the density of TUBB3-stained nerve fibers in DM group of *Nox4^{+/+}* mice was significantly lower than that in non-DM group of *Nox4^{+/+}* mice, and there was no significant reduction of nerve fibers in the corneal stromal layer in DM group of *Nox4^{-/-}* mice or mice fed with GKT supplementary feed. **Conclusions** *Nox4* is involved in the pathogenic process of diabetic keratopathy, and its mechanism may be related to oxidative stress-induced aggregation of ROS products and activation of NF- κ B-mediated inflammatory responses.

[Key words] Diabetic mellitus/complication; Keratopathy; NADPH oxidases; Oxidative stress; Enzyme inhibitors/therapeutic use; Disease model; Mice, inbred C57BL

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81740158, 81460163, 81300786, 82000862); Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2024SF-YBXM-322, 2021SF-156); Young Talent Scholar Grant (2016KJXX-12); Research Grant from Shaanxi Science and Technology Department (2016JM8029); Institutional Foundation of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University (HX201970, 2021ZXY-10, 2022QN-25)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200320-00188

糖尿病角膜病变 (diabetic keratopathy, DK) 是糖尿病主要的眼部并发症, 临床表现主要包括干眼相关角膜病变、角膜上皮损伤、角膜知觉减退、角膜水肿、角膜溃疡、角膜炎等^[1]。目前 DK 的具体致病机制尚未完全阐明, 其相关研究主要聚焦于胰岛素缺乏及高糖环境导致的泪腺腺泡损害和晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 堆积引起的氧化应激反应及神经组织结构和功能异常^[2-6]。此外, 高糖环境下导致的相关基因、生长因子、神经营养因子、多肽蛋白的表达、结构和功能异常以及角膜神经结构损害等也被认为与 DK 的发生和发展有关^[7]。研究表明, 适量的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 可促进细胞增殖及组织更新, 介导细胞内信号转导并清除病原体, 而过量的 ROS 会破坏线粒体电子传递系统, 并引起脂质过氧化、DNA 断裂、蛋白质变性^[8]。多

项动物及细胞实验证实, 氧化应激在干眼及角膜病变的致病过程中发挥着重要作用^[9-12]。高糖环境可加速细胞线粒体的氧化代谢, 增强还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 (NADPH oxidase, Nox) 活性, 导致 ROS 堆积, 引起细胞的氧化应激损害。糖尿病大鼠角膜组织中 AGEs、8-羟基脱氧葡萄糖和核转录因子 κ B (nuclear factor, NF- κ B) 呈高表达, 提示高糖引起的氧化应激反应参与 DK 的发生^[13]。研究表明, DNase I、 α -硫辛酸、促分解脂质介质 Resolvin D1、外源性血管内皮生长因子 B 等可抑制角膜组织氧化应激反应, 减少 ROS 积累, 从而对 DK 发挥防治作用, 并促进糖尿病模型动物的角膜创伤愈合及神经再生^[14-17]。Nox 介导的细胞氧化应激损伤参与多种糖尿病并发症的发生和发展。多种 Nox 异构体参与角膜组织细胞的增生、迁移、黏附及损伤修复^[18-19]。糖基化修饰

的牛血清白蛋白通过增强 Nox 活性及提高其亚基 p22phox 和 Nox4 蛋白的表达而促进 ROS 生成,导致体外培养的猪角膜创伤愈合延迟^[20]。Nox 介导的氧化应激反应参与了多种糖尿病并发症的致病过程,但 Nox4 在 DK 中的直接致病作用尚未完全阐明。本研究拟探讨 Nox4 在 1 型糖尿病模型小鼠角膜病变发病中的作用及可能机制,为 DK 的防治提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 6~8 周龄雄性野生型 C57BL/6 (*Nox4*^{+/+}) 小鼠 120 只(西安交通大学动物实验中心提供);*Nox4* 基因缺陷 (*Nox4*^{-/-}) 小鼠(货号:022996)1 对(美国杰克逊实验室,实验小鼠为 *Nox4*^{-/-} 雌雄繁育的 *Nox4*^{-/-} 纯合子雄性后代)。实验小鼠均于西安交通大学动物实验中心饲养,湿度为 40%~70%,室温 18~25 °C,12 h 光照昼夜循环,通风良好,饮食洁净。实验小鼠的使用和喂养遵循 ARVO 制定的科研动物使用规范,本研究方案经西安交通大学实验动物伦理委员会批准(批文号:XJTULAC201301)。

1.1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、TUNEL 检测试剂盒(11684809910)(美国 Sigma-Aldrich 公司);*Nox4* 抑制剂 GKT137831(美国 Selleck 公司);小鼠抗 TUBB3 多克隆抗体(B233555)(美国 Biologend 公司);CellROX 探针(C10444)、兔抗 NF-κB 多克隆抗体(PA516545)、驴抗兔荧光二抗 Alexa Fluor® 594(A21207)、驴抗小鼠荧光二抗 Alexa Fluor® 488(A21202)(美国 Thermo 公司);兔抗 E-Cadherin 抗体(3195)(美国 Cell Signaling 公司);兔抗 Nox4 抗体(H300,美国 Santa Cruz 公司);DAPI(美国 Vector Laboratories 公司);TRITON X-100(美国 MP Biomedicals 公司);DEPC(上海碧云天生物技术有限公司);8% 多聚甲醛(美国 Electronic Microscope Sciences 公司);水合氯醛(上海山浦化工有限公司);OCT 包埋剂(美国 Tissue-Tek 公司);荧光素钠注射液(美国 Alcon 公司)。1 ml 胰岛素注射针(舒锐 U40,美国 BD 公司);HEA-STP30 血糖试纸、HEA230 快速血糖仪[欧姆龙(中国)有限公司];泪液检测酚红棉线(天津晶明新技术开发有限公司);冰冻切片(德国 Leica 公司);正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Konska 外科显微镜(宿迁市爱眼夫医疗器械有限公司);角膜激光扫描共聚焦显微镜(德国海德堡公司)。

1.2 方法

1.2.1 1 型 DM 模型建立 采用碱裂解法经鼠尾静脉血提取 DNA 行 PCR 基因验证后,*Nox4*^{+/+} 小鼠和 *Nox4*^{-/-} 小鼠在 SPF 级动物房饲养,普通饮食喂养 1 周后禁食 12 h,采集鼠尾静脉血测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),同时称取体重。采用随机数字表法分别将 *Nox4*^{+/+} 小鼠和 *Nox4*^{-/-} 小鼠随机分成 DM 组和非 DM 组,每组 20 只。DM 组小鼠每日腹腔内注射用柠檬酸缓冲液新鲜配制的 STZ 50 mg/kg,连续注射 5 d,每次注射前禁食 4 h;注射后 3 周血糖水平高于 13.8 mmol/L 者为造模成功,否则继续注射 STZ 5 d,注射后 1 周测定鼠尾血糖,确保造模成功。非 DM 组注射等量柠檬酸盐。

1.2.2 *Nox4*^{+/+} 小鼠饮食干预分组 采用随机数字表法分别将非 DM 组和 DM 组 *Nox4*^{+/+} 小鼠细分为 GKT 饮食组和普通饮食组,每组 20 只。GKT 饮食组小鼠给予含 GKT137831 药物的饲料,普通饮食组小鼠仅给予普通饲料;其中 GKT 饮食 DM 组小鼠先普通饮食饲养 2 个月再添加 GKT137831 药物喂养 2 个月。

1.2.3 眼表病变相关指标检查 于造模成功后第 16 周对各组小鼠进行眼表相关检测。(1)泪液分泌试验 非麻醉状态下将酚红棉线放置于小鼠外眦角结膜囊 1 min,记录泪液润湿棉线由黄变红的长度。(2)角膜荧光素钠染色 小鼠全身麻醉后结膜囊内滴入 1% 荧光素钠 2 μl,2 min 后用生理盐水冲洗眼表并蘸干水分,裂隙灯显微镜钴蓝光下观察并拍照,采用 ImageJ 软件根据角膜荧光素染色面积进行评分。0 分为无点状染色;1 分为染色面积 ≤ 1/8;2 分为染色面积占角膜总面积的 >1/8~1/4 染色面积;3 分为染色面积 >1/4~1/2;4 分为染色面积 >1/2。(3)角膜基质神经纤维分布检查 7% 水合氯醛按照 6 ml/kg 的剂量腹腔注射麻醉小鼠,采用激光扫描共聚焦显微镜评估角膜基质神经纤维分布及其走行,GenTeal 凝胶滴于物镜尖端,手动模式下扫描中央角膜,每 20 μm 采集 1 次并拍摄。

1.2.4 免疫荧光染色法检测 Nox4、E-Cadherin 及 NF-κB 蛋白在角膜上皮的表达 于造模成功后第 16 周处死各组 6 只小鼠,摘取眼球,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 8 min,剪取完整角膜,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min,梯度蔗糖溶液脱水,OCT 包埋,冰冻切片(沿垂直角膜表面方向),切片厚度为 7 μm。将冰冻切片置于载玻片上,室温晾干,PBS 洗去包埋剂;免疫组织化学笔圈标本,加入封闭液,于湿盒中室温静置 1 h;分别滴加 Nox4、NF-κB 或 E-Cadherin 一抗(均 1:100 稀释),湿盒中 4°C 孵育过夜;

PBST(PBS+0.05% Tween20)漂洗 3 次,滴加 AF-594 标记的驴抗兔 Alexa Fluor 594 二抗(1:200 稀释),室温避光孵育 1 h;PBST 洗 3 次,DAPI 染核并封片后于荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 CellROX 荧光探针检测细胞中 ROS 含量 造模成功后第 16 周处死各组 6 只小鼠,摘取眼球,直接 OCT 包埋,冰冻切片连续切片(沿垂直角膜表面方向 7 μm 厚切片)。将冰冻切片置于载玻片上,室温晾干后 PBS 洗 3 次,免疫组织化学笔圈标本,滴加 20 μl 含有 CellROX 探针的溶液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次,滴加含有 DAPI 的封片液封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 TUNEL 染色检测角膜上皮细胞凋亡情况 取 1.2.5 部分眼球冰冻切片, PBS 漂洗 3 次,用含 0.5% Triton X-100 的 0.1% 柠檬酸盐缓冲液冰浴 5 min; PBS 冲洗 3 次,室温下晾干后用免疫组化笔圈标本,滴加 20 μl TUNEL 反应混合物,湿盒中室温下避光孵育 1 h; PBS 避光清洗 3 次, DAPI 染核并封片,凋亡细胞呈红色荧光,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.7 角膜铺片法检测角膜神经分布 造模成功后第 16 周,分别处死各组 6 只小鼠。摘取眼球,置于 2% 多聚甲醛固定 30 min。沿角巩缘剪取角膜,放入含 PBST 的 6 孔板,清洗 3 次,取出角膜,放入含 1% Triton X-100 PBS 的 96 孔板室温孵育 1 h,滴加 TUBB3 抗体(1:100 稀释)并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBST 洗 6 次,滴加 Alexa Fluor 488 荧光标记二抗,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 24 h; PBST 洗 6 次,从角膜缘向中央放射状剪开角膜后铺片,甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件及 R 软件(4.0.0)进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验行正态性分布评估,小鼠体质量、血糖水平、泪液分泌量均满足正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,角膜荧光素钠染色评分不符合正态分布,以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。不同干预小鼠 DM 组与非 DM 组计量资料采用 Levene 检验评估方差齐性,满足方差齐性的计量资料差异比较采用单因素方差分析,事后比较采用 Bonferroni 检验;方差不齐的计量资料差异比较采用 Welch 方差分析,事后比较采用

Games-Howell 检验。角膜荧光素钠染色评分组间差异比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。采用双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血糖水平及体质量比较

与非 DM 组小鼠相比, DM 组小鼠 FBG 浓度明显升高、体质量降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。在 DM 组中, $Nox4^{-/-}$ 小鼠与 $Nox4^{+/+}$ 小鼠 FBG 浓度及体质量比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(表 1)。

2.2 DM 组与非 DM 组不同饮食干预后 $Nox4^{+/+}$ 小鼠 FBG 浓度和体质量比较

与非 DM 组小鼠相比, DM 组小鼠各饮食干预条件下 FBG 浓度明显升高、体质量降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。各组内不同饮食干预下小鼠体质量及 FBG 组间比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(表 2)。

2.3 DM 组与非 DM 组 $Nox4^{+/+}$ 小鼠角膜上皮细胞中 Nox4 表达比较

造模成功后第 16 周, DM 组小鼠角膜上皮细胞中 Nox4 表达呈红色强荧光, Nox4 荧光表达分布均匀,角膜基质层中可见少量红色荧光。非 DM 组小鼠角膜上皮细胞中 Nox4 荧光表达微弱(图 1)。

2.4 不同基因小鼠 DM 组与非 DM 组泪液分泌量比较

$Nox4^{+/+}$ 小鼠中, DM 组较非 DM 组泪液分泌减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。与 DM 组 $Nox4^{+/+}$ 小鼠相比, DM 组 $Nox4^{-/-}$ 小鼠泪液分泌量明显更多,差异有统计学意义($P<0.05$)(表 3)。

表 1 不同基因小鼠 DM 组与非 DM 组 FBG 浓度和体质量比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of FBG level and body weight between DM and non-DM groups of $Nox4^{+/+}$ and $Nox4^{-/-}$ mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	体质量(g) [#]	FBG 浓度(mmol/L) [*]
非 DM- $Nox4^{+/+}$ 组	7	28.67 \pm 2.04	9.62 \pm 1.69
DM- $Nox4^{+/+}$ 组	7	21.77 \pm 2.28 ^a	29.13 \pm 6.70 ^a
非 DM- $Nox4^{-/-}$ 组	6	31.12 \pm 1.02	7.73 \pm 1.71
DM- $Nox4^{-/-}$ 组	6	23.02 \pm 2.34 ^b	31.10 \pm 4.38 ^b
F/Welch 值		23.790	38.610
P 值		<0.001	<0.001

注:与非 DM- $Nox4^{+/+}$ 组比较,^a校正 $P<0.01$;与非 DM- $Nox4^{-/-}$ 组比较,^b校正 $P<0.01$ (#:单因素方差分析, Bonferroni 检验; *: Welch 方差分析, Games-Howell 检验) DM:糖尿病; Nox: NADPH 氧化酶; FBG:空腹血糖

Note: Compared with non-DM- $Nox4^{+/+}$ group, ^aadjusted $P<0.01$; compared with non-DM- $Nox4^{-/-}$ group, ^badjusted $P<0.01$ (#: One-way ANOVA, Bonferroni test; *: Welch ANOVA, Games-Howell test) DM: diabetes mellitus; Nox: NADPH oxidase; FBG: fasting blood glucose

表 2 不同饲料干预 DM 组与非 DM 组 *Nox4*^{+/+} 小鼠 FBG 浓度和体质量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of FBG level and body weight between DM and non-DM groups of *Nox4*^{+/+} mice fed with different diets ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	体质量 (g)	FBG 浓度 (mmol/L)
普通饲料+非 DM 组	6	28.50±1.20	8.52±2.31
普通饲料+DM 组	6	24.12±0.81 ^a	30.68±2.57 ^a
GKT 添加饲料+非 DM 组	8	29.03±1.14	8.50±2.30
GKT 添加饲料+DM 组	8	24.23±2.46 ^b	27.06±7.00 ^b
Welch 值		34.29	106.62
P 值		<0.001	<0.001

注:与普通饲料+非 DM 组比较,^a校正 $P < 0.01$;与 GKT 添加饲料+非 DM 组比较,^b校正 $P < 0.01$ (Welch 方差分析, Games-Howell 检验) DM:糖尿病; FBG:空腹血糖

Note: Compared with regular diet + non-DM group, ^aadjusted $P < 0.01$; compared with GKT + non-DM group, ^badjusted $P < 0.01$ (Welch ANOVA, Games-Howell test) DM: diabetes mellitus; FBG: fasting blood glucose

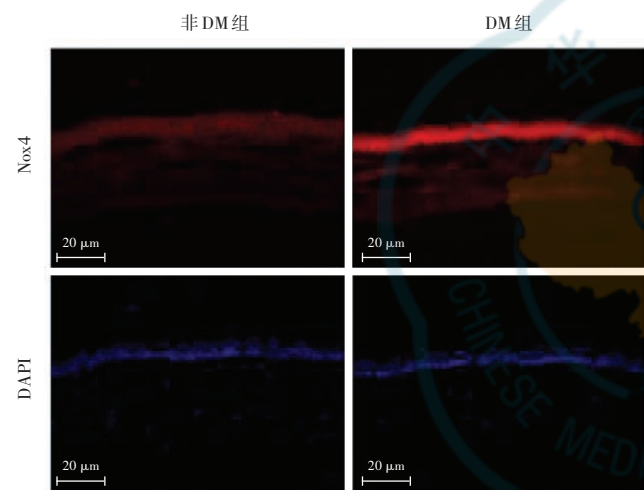


图 1 *Nox4*^{+/+} 小鼠 DM 组与非 DM 组角膜上皮细胞中 *Nox4* 免疫荧光表达 ($\times 400$, 标尺 = 20 μm) *Nox4* 蛋白呈红色荧光, 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI); DM 组小鼠角膜上皮细胞中 *Nox4* 荧光明显强于非 DM 组 DM:糖尿病; Nox: NADPH 氧化酶

Figure 1 Immunofluorescence expression of *Nox4* in corneal epithelial cells of DM and non-DM *Nox4*^{+/+} mice ($\times 400$, scale bar = 20 μm) *Nox4* protein appeared red fluorescence and nuclei showed blue fluorescence (DAPI). The fluorescence of *Nox4* was obviously stronger in DM group than in non-DM group DM: diabetes mellitus; Nox: NADPH oxidase

2.5 不同饮食干预 DM 组与非 DM 组 *Nox4*^{+/+} 小鼠泪液分泌量比较

普通饲料干预后, DM 组小鼠泪液分泌量较非 DM 组小鼠减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。与普通饲料干预后 DM 组小鼠相比, GKT 添加饲料喂养后 DM 组小鼠泪液分泌量较多, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (表 4)。

2.6 不同基因小鼠 DM 组与非 DM 组角膜荧光素染色评分比较

Nox4^{+/+} 小鼠 DM 组角膜荧光素染色约占角膜面积的 1/4, *Nox4*^{-/-} 小鼠 DM 组仅见少量点片状荧光素着

染, 不同基因小鼠非 DM 组均未见明显角膜荧光素染色 (图 2)。*Nox4*^{+/+} 小鼠 DM 组角膜荧光素染色评分显著高于非 DM 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); DM 组内, 与 *Nox4*^{+/+} 小鼠相比, *Nox4*^{-/-} 小鼠角膜荧光素染色评分明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 5)。

2.7 不同饮食干预 DM 组与非 DM 组 *Nox4*^{+/+} 小鼠角膜荧光素染色比较

不同饮食干预小鼠角膜荧光素染色面积明显不同, DM 组普通饲料喂养小鼠角膜荧光素面积约占角膜面积的 1/2,

表 3 不同基因小鼠 DM 组与非 DM 组泪液分泌量比较 ($\bar{x} \pm s$, mm/min)

Table 3 Comparison of tear secretion between DM and non-DM groups of *Nox4*^{+/+} and *Nox4*^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s$, mm/min)

组别	样本量	泪液分泌量
非 DM- <i>Nox4</i> ^{+/+} 组	5	5.30±1.02
DM- <i>Nox4</i> ^{+/+} 组	5	2.40±1.18 ^a
非 DM- <i>Nox4</i> ^{-/-} 组	5	5.85±0.91
DM- <i>Nox4</i> ^{-/-} 组	5	4.19±0.63 ^b
F 值		12.178
P 值		<0.001

注:与非 DM-*Nox4*^{+/+} 组比较,^a校正 $P < 0.01$;与 DM-*Nox4*^{+/+} 组比较,^b校正 $P < 0.05$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验) Nox: NADPH 氧化酶; DM:糖尿病

Note: Compared with non-DM-*Nox4*^{+/+} group, ^aadjusted $P < 0.01$; compared with DM-*Nox4*^{+/+} group, ^badjusted $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Bonferroni test) Nox: NADPH oxidase; DM: diabetes mellitus

表 4 不同饲料干预 DM 组与非 DM 组 *Nox4*^{+/+} 小鼠泪液分泌量比较 ($\bar{x} \pm s$, mm/min)

Table 4 Comparison of tear secretion between DM and non-DM groups of *Nox4*^{+/+} mice fed with different diets ($\bar{x} \pm s$, mm/min)

组别	样本量	泪液分泌量
普通饲料+非 DM 组	6	4.63±1.25
普通饲料+DM 组	6	2.23±0.83 ^a
GKT 添加饲料+非 DM 组	6	5.13±1.12
GKT 添加饲料+DM 组	6	4.02±0.71 ^b
F 值		16.710
P 值		<0.001

注:与普通饲料+非 DM 组比较,^a校正 $P < 0.01$;与普通饲料+DM 组比较,^b校正 $P < 0.01$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验) DM:糖尿病

Note: Compared with regular diet + non-DM group, ^aadjusted $P < 0.01$; compared with regular diet + DM group, ^badjusted $P < 0.01$ (One-way ANOVA, Bonferroni test) DM: diabetes mellitus

GKT 添加饲料喂养小鼠可见少量片状角膜荧光素染色;非 DM 组不同饮食小鼠角膜荧光素染色轻微(图 3)。普通饲料喂养小鼠中,与非 DM 组相比,DM 组角膜荧光素染色评分明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),DM 组内,GKT 添加饲料喂养小鼠较普通饲料喂养角膜荧光素染色评分明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 6)。

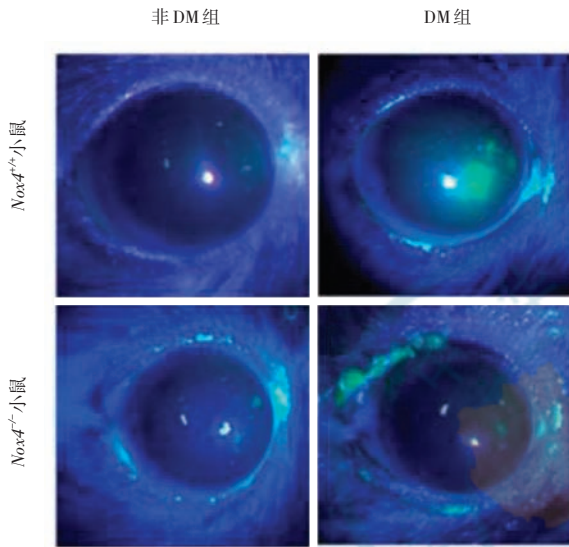


图 2 不同基因小鼠 DM 组与非 DM 组角膜荧光素染色 与 $Nox4^{+/+}$ 小鼠 DM 组比较, $Nox4^{-/-}$ 小鼠 DM 组角膜荧光素染色程度明显减轻 DM:糖尿病;Nox:NADPH 氧化酶
Figure 2 Corneal fluorescein staining of DM and non-DM groups of $Nox4^{+/+}$ and $Nox4^{-/-}$ mice Compared with the DM group of $Nox4^{+/+}$ mice, the corneal fluorescein staining was weaker in DM group of $Nox4^{-/-}$ mice DM: diabetes mellitus; Nox: NADPH oxidase

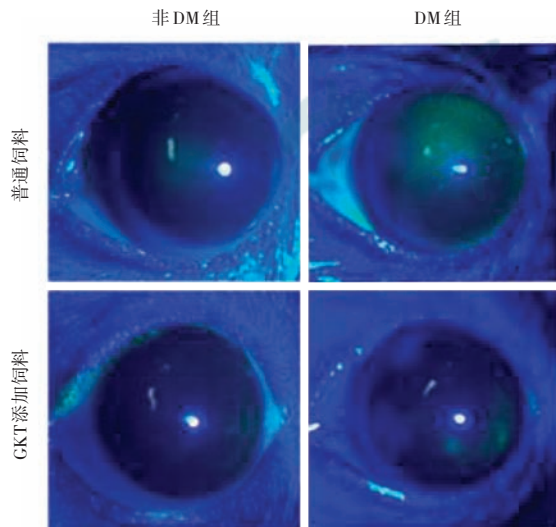


图 3 $Nox4^{+/+}$ 小鼠不同饮食干预后 DM 组与非 DM 组角膜荧光素染色 与 DM 组普通饲料喂养小鼠比较,DM 组 GKT 添加饲料喂养小鼠角膜荧光素染色程度明显减轻 DM:糖尿病
Figure 3 Corneal fluorescence staining between DM and non-DM groups of $Nox4^{+/+}$ mice fed with different diets Compared with DM group fed with regular diet, the corneal fluorescence staining was weaker in DM mice fed with GKT+regular diet DM: diabetes mellitus

表 5 不同基因小鼠 DM 组与非 DM 组角膜荧光素染色评分比较 [$M(Q_1, Q_3)$, 分]

Table 5 Comparison of corneal fluorescein staining score between DM and non-DM groups of $Nox4^{+/+}$ and $Nox4^{-/-}$ mice [$M(Q_1, Q_3)$, score]

组别	样本量	角膜荧光素染色评分
非 DM- $Nox4^{+/+}$ 组	4	1.0(0.3, 1.0)
DM- $Nox4^{+/+}$ 组	4	2.0(2.0, 2.0) ^a
非 DM- $Nox4^{-/-}$ 组	4	1.0(0.3, 1.0)
DM- $Nox4^{-/-}$ 组	4	1.0(1.0, 1.0) ^b
H 值		12.300
P 值		0.006

注:与非 DM- $Nox4^{+/+}$ 组比较,^a $P < 0.01$;与 DM- $Nox4^{+/+}$ 组比较,^b $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis 秩和检验) DM:糖尿病;Nox:NADPH 氧化酶

Note: Compared with non-DM- $Nox4^{+/+}$ group, ^a $P < 0.01$; compared with DM- $Nox4^{+/+}$ group, ^b $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis test) DM: diabetes mellitus; Nox: NADPH oxidase

表 6 不同饲料干预 DM 组与非 DM 组 $Nox4^{+/+}$ 小鼠角膜荧光素染色评分比较 [$M(Q_1, Q_3)$, 分]

Table 6 Comparisons of corneal fluorescence staining score between DM group and Non-DM group in $Nox4^{+/+}$ mice fed with different diets [$M(Q_1, Q_3)$, score]

组别	样本量	角膜荧光素染色评分
普通饲料+非 DM 组	4	1.0(0.3, 1.0)
普通饲料+DM 组	4	3.0(2.3, 3.0) ^a
GKT 添加饲料+非 DM 组	4	1.0(0.3, 1.0)
GKT 添加饲料+DM 组	4	1.0(1.0, 1.0) ^b
H 值		12.178
P 值		0.007

注:与普通饲料+非 DM 组比较,^a $P < 0.01$;与普通饲料+DM 组比较,^b $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis 秩和检验) DM:糖尿病

Note: Compared with regular diet+non-DM group, ^a $P < 0.01$; compared with regular diet+DM group, ^b $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis test) DM: diabetes mellitus

2.8 DM 组与非 DM 组角膜神经纤维密度比较

与 $Nox4^{+/+}$ 小鼠非 DM 组比较, $Nox4^{+/+}$ 小鼠 DM 组角膜基质层神经纤维排列稀疏,分支减少,密度明显降低;与 $Nox4^{-/-}$ 小鼠非 DM 组比较, $Nox4^{-/-}$ 小鼠 DM 组角膜基质神经纤维密度及形态无明显改变(图 4A)。普通饲料喂养条件下,与非 DM 组比较,DM 组小鼠角膜基质层神经纤维及其分支减少,密度降低;GKT 添加饲料喂养条件下,与非 DM 组比较,DM 组小鼠角膜基质神经纤维密度及形态无明显变化(图 4B)。

2.9 DM 组与非 DM 组角膜上皮细胞中 E-Cadherin 蛋白表达比较

$Nox4^{+/+}$ 小鼠非 DM 组角膜上皮中 E-Cadherin 蛋白呈强荧光,分布均匀,DM 组小鼠角膜上皮中 E-Cadherin 表达明显减弱; $Nox4^{-/-}$ 小鼠 DM 组角膜上

皮中 E-Cadherin 呈强表达(图 5A)。普通饲料喂养条件下,DM 组角膜上皮中 E-Cadherin 蛋白表达明显弱于非 DM 组;GKT 添加饲料喂养条件下,DM 组与非 DM 组角膜上皮中 E-Cadherin 蛋白表达强度接近(图 5B)。

2.10 DM 组与非 DM 组角膜上皮中 NF-κB 表达比较

Nox4^{+/+} 小鼠 DM 组角膜上皮中 NF-κB 表达明显强于非 DM 组;*Nox4^{-/-}* 小鼠 DM 组角膜上皮内 NF-κB 表达强度微弱,与非 DM 组比较未见明显差别(图 6A)。普通饲料喂养条件下,DM 组角膜上皮中 NF-κB 表达明显强于非 DM 组,GKT 添加饲料喂养条件下,DM 组与非 DM 相比角膜上皮细胞 NF-κB 表达强度接近(图 6B)。

2.11 DM 组与非 DM 组角膜上皮细胞 ROS 荧光强度比较

Nox4^{+/+} 小鼠非 DM 组角膜上皮内 ROS 水平较低,CellROX 标记细胞很少;*Nox4^{+/+}* 小鼠 DM 组角膜上皮中 CellROX 标记细胞数量明显多于非 DM 组;*Nox4^{-/-}* 小鼠 DM 组角膜上皮中 ROS 荧光强度显著减弱,CellROX 标记细胞较少,与非 DM 组相比未见显著增加(图 7A)。普通饲料喂养条件下,DM 组角膜上皮细胞 ROS 荧光强度强于非 DM 组;GKT 添加饲料喂养条件下,DM 组与非 DM 组相比角膜上皮细胞 ROS 荧光强度未见显著变化(图 7B)。

2.12 DM 组与非 DM 组角膜上皮细胞凋亡情况比较

Nox4^{+/+} 小鼠 DM 组角膜上皮 TUNEL 阳性细胞荧

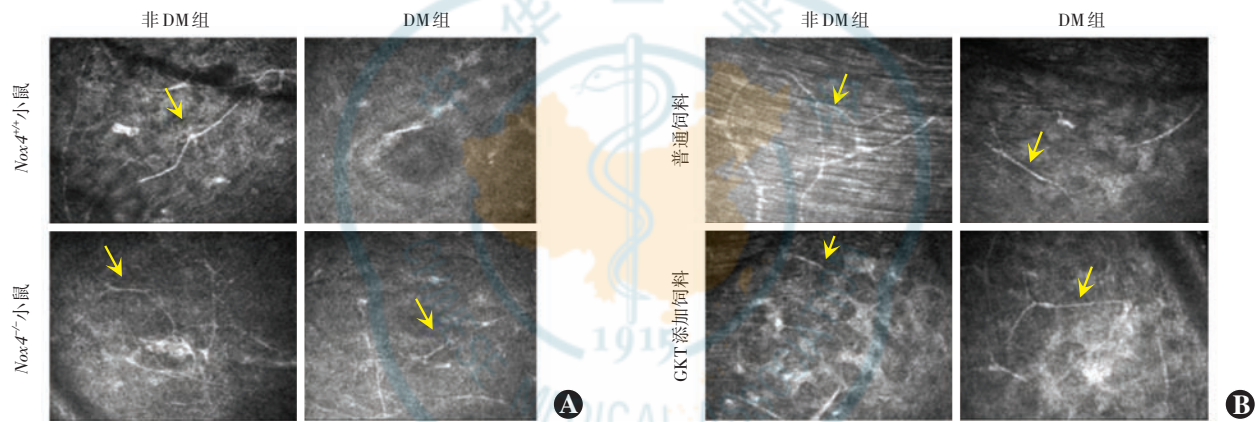


图 4 激光扫描共聚焦显微镜下角膜基质神经纤维分布(×800) 角膜基质神经纤维呈白色分支样条纹(箭头) A:*Nox4^{+/+}* DM 组小鼠角膜基质神经纤维丢失,密度低于非 DM 组小鼠;*Nox4^{-/-}* DM 组小鼠角膜基质神经纤维密度和走行与非 DM 组小鼠接近 B:DM 组普通饲料喂养小鼠角膜基质神经纤维密度明显较非 DM 组小鼠减少;DM 组 GKT 添加饲料喂养小鼠角膜基质神经纤维密度与非 DM 组小鼠接近 DM:糖尿病;Nox:NADPH 氧化酶

Figure 4 Corneal stromal innervation by laser scanning confocal microscopy(×800) The stromal nerve fibers of cornea appeared stripe-like with branches (yellow arrow) A:In *Nox4^{+/+}* mice, loss of innervations was seen in DM group and the density of corneal stromal nerve fibers was lower in DM group than in non-DM group. In *Nox4^{-/-}* mice, the density and alignment of corneal stromal nerve fibers was similar between DM and non-DM groups B: The density of corneal nerve fibers were similar between DM and non-DM groups mice fed with GKT+regular diet DM:diabetes mellitus;Nox:NADPH oxidase

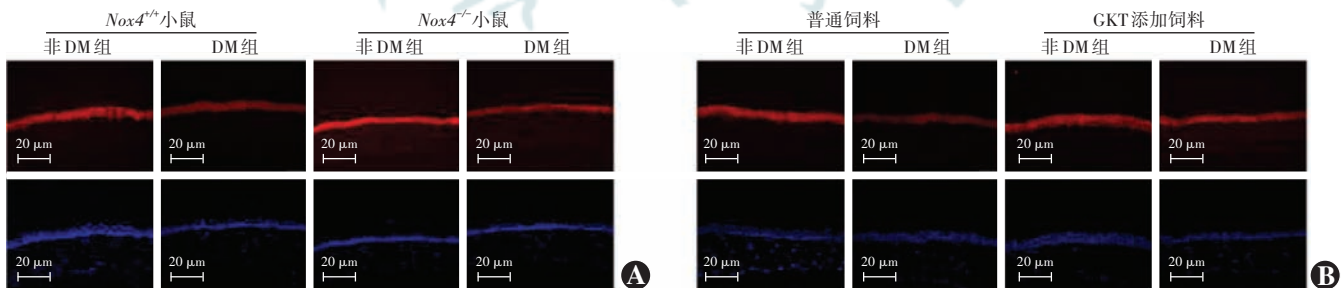


图 5 各组小鼠角膜上皮中 E-Cadherin 蛋白免疫荧光表达(×400, 标尺 = 20 μm) 角膜上皮中 E-Cadherin 蛋白表达呈红色荧光(Alexa Fluor® 594),细胞核呈蓝色荧光(DAPI) A:*Nox4^{+/+}* 小鼠 DM 组角膜上皮中 E-Cadherin 表达较非 DM 组明显减弱,*Nox4^{-/-}* 小鼠 DM 组角膜上皮中 E-Cadherin 表达较非 DM 组轻度减弱 B:普通饲料喂养小鼠 DM 组角膜上皮中 E-Cadherin 表达较非 DM 组明显减弱,GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组角膜上皮中 E-Cadherin 表达较非 DM 组稍弱 DM:糖尿病;Nox:NADPH 氧化酶

Figure 5 Immunofluorescence expression of E-Cadherin in corneal epithelium in different groups(×400, scale bar = 20 μm) The expression of E-Cadherin showed a red fluorescence (Alexa Fluor® 594), and the cell nuclei appeared a blue fluorescence (DAPI) A:In *Nox4^{+/+}* mice, the expression of E-Cadherin was obviously weakened in DM group than in non-DM group. In *Nox4^{-/-}* mice, the expression of E-Cadherin was slightly weakened in DM group than in non-DM group B: In mice fed with regular diet, the expression of E-Cadherin was obviously weakened in DM group than in non-DM group. In mice fed with GKT+regular diet, the expression of E-Cadherin was slightly weakened in DM group than in non-DM group DM:diabetes mellitus;Nox:NADPH oxidase

光较非 DM 组明显增强, *Nox4*^{-/-} 小鼠 DM 组角膜上皮中 TUNEL 阳性细胞荧光强度与非 DM 组相比无明显增强(图 8A)。普通饲料喂养条件下, DM 组角膜上皮中 TUNEL 阳性细胞荧光强度强于非 DM 组; GKT 添加饲料喂养条件下, DM 组与非 DM 组角膜上皮中 TUNEL 阳性细胞荧光强度未见显著变化(图 8B)。

2.13 DM 组与非 DM 组角膜中央神经纤维分布比较

角膜铺片 TUBB3 免疫荧光染色结果显示, *Nox4*^{+/+} 小鼠 DM 组角膜中央神经纤维分布密度较非 DM 组显著下降, 神经纤维走行模糊, 部分角膜神经纤维分支消失; *Nox4*^{-/-} 小鼠 DM 组与非 DM 组比较角膜中央区神经纤维密度无明显下降(图 9A)。普通饲料喂养条件下, DM 组角膜中央神经纤维密度较非 DM 组显著下降, 部分角膜神经纤维分支减少或消失; GKT 添加饲料

喂养小鼠 DM 组角膜中央区域神经纤维密度较非 DM 组明显减少, 但较普通饲料喂养小鼠 DM 组角膜神经纤维密度高(图 9B)。

3 讨论

DK 是 DM 眼部病变的另一重要并发症, 近年来得到越来越多的关注。DM 患者常因糖代谢异常而引起泪腺功能受损, 表现为泪液分泌不足, 其睑板腺及结膜、角膜的结构破坏会引起睑脂、黏蛋白质量改变而导致泪膜不稳定, 疾病进展至晚期则会出现角膜神经凋亡、角膜敏感性下降, 导致患眼瞬目减少和主观感觉迟钝。DK 多呈慢性起病并逐渐进展。既往动物实验表明, DM 小鼠造模后 2 周即可出现角膜荧光素染色, 至造模后 16 周角膜上皮全部着染, 角膜神经密度显著降

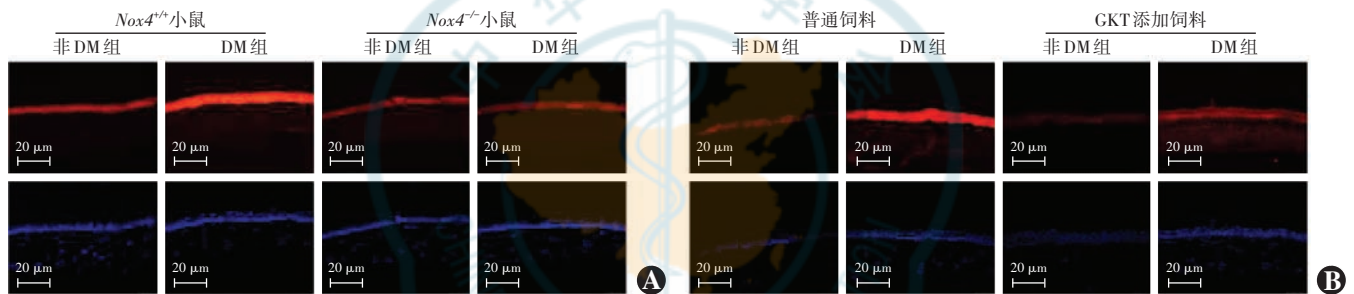


图 6 各组小鼠角膜上皮中 NF-κB 免疫荧光表达(×400, 标尺=20 μm) 角膜上皮中 NF-κB 蛋白表达呈红色荧光(Alexa Fluor® 488), 细胞核呈蓝色荧光(DAPI) A: *Nox4*^{+/+} 小鼠 DM 组角膜上皮中 NF-κB 表达较非 DM 组明显增强, *Nox4*^{-/-} 小鼠 DM 组角膜上皮中 NF-κB 表达强度与非 DM 组接近 B: 普通饲料喂养小鼠 DM 组角膜上皮中 NF-κB 表达较非 DM 组明显增强, GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组角膜上皮中 NF-κB 表达强度与非 DM 组接近 DM: 糖尿病; Nox: NADPH 氧化酶

Figure 6 Immunofluorescence expression of NF-κB in corneal epithelium in different groups (×400, scale bar=20 μm) The expression of NF-κB in corneal epithelium was red (Alexa Fluor® 488) and the cell nuclei were blue (DAPI) A: In *Nox4*^{+/+} mice, the expression of NF-κB was obviously enhanced in DM group compared with non-DM group. In *Nox4*^{-/-} mice, the expression of NF-κB was similar between DM group and Non-DM group B: In mice fed with regular diet, the expression of NF-κB was obviously enhanced in DM group in comparison with non-DM group. In mice fed with GKT+regular diet, the expression was similar between DM group and non-DM group DM: diabetes mellitus; Nox: NADPH oxidase

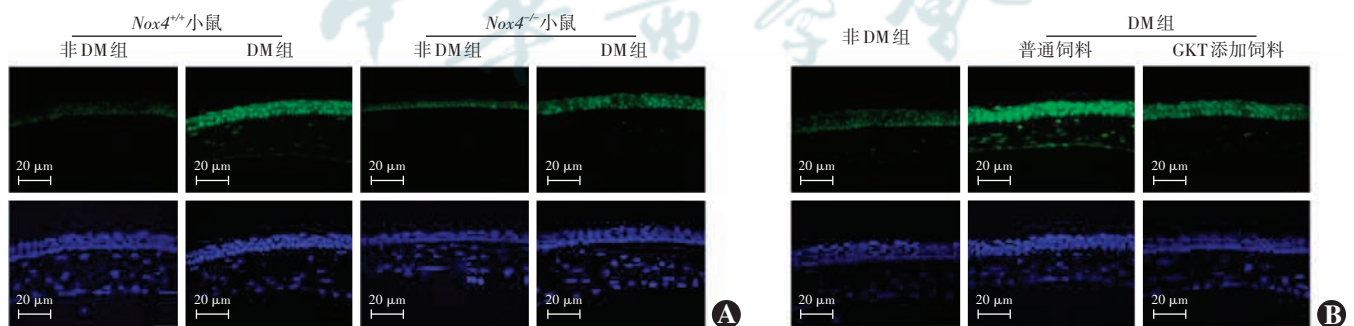


图 7 各组小鼠角膜上皮中 ROS 表达(×400, 标尺=20 μm) 角膜上皮细胞中 ROS 呈绿色荧光(CellROX), 细胞核呈蓝色荧光(DAPI) A: *Nox4*^{+/+} 小鼠 DM 组角膜上皮细胞中 ROS 荧光明显强于非 DM 组, *Nox4*^{-/-} 小鼠 DM 组角膜上皮细胞 ROS 荧光强度与非 DM 组接近 B: 普通饲料喂养小鼠 DM 组角膜上皮细胞中 ROS 荧光较非 DM 组明显增强, GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组角膜上皮细胞中 ROS 荧光强度与非 DM 组接近 DM: 糖尿病; Nox: NADPH 氧化酶

Figure 7 ROS expressions in corneal epithelium among different groups (×400, scale bar=20 μm) ROS production in corneal epithelial cells showed green (CellROX) and cell nuclei presented blue (DAPI) A: In *Nox4*^{+/+} mice, the fluorescence was enhanced in DM group compared with non-DM group. In *Nox4*^{-/-} mice, the ROS fluorescence intensity was similar between DM group and non-DM group B: In mice fed with regular diet, the fluorescence was enhanced in DM group compared with non-DM group, and the intensity was similar between DM group and non-DM group in the mice fed with GKT+regular diet DM: diabetes mellitus; Nox: NADPH oxidase

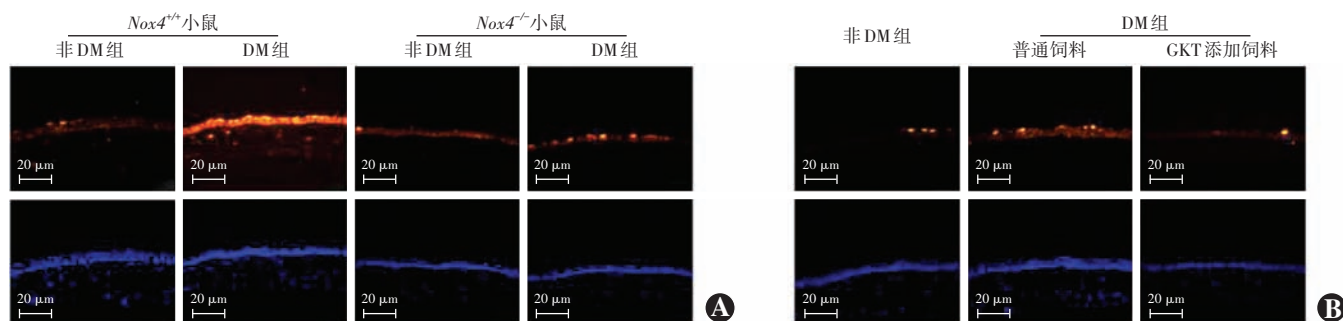


图 8 各组小鼠角膜上皮中 TUNEL 阳性细胞表达情况 (×400, 标尺 = 20 μm) 角膜上皮凋亡细胞 (TUNEL 阳性细胞) 呈红色荧光 (DAB), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) A: *Nox4*^{+/+} 小鼠 DM 组角膜上皮中 TUNEL 阳性细胞荧光强度明显强于非 DM 组, *Nox4*^{-/-} 小鼠 DM 组 TUNEL 阳性细胞荧光强度与非 DM 组接近 B: 普通饲料喂养小鼠 DM 组角膜上皮中 TUNEL 阳性细胞较非 DM 组荧光明显增强, GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组荧光强度与非 DM 组接近 DM: 糖尿病; Nox: NADPH 氧化酶

Figure 8 Comparison of corneal epithelial apoptosis among different groups (×400, scale bar = 20 μm) TUNEL-positive cells showed red in corneal epithelium (DAB) and cell nuclei presented blue (DAPI) A: In *Nox4*^{+/+} mice, the fluorescence was enhanced in DM group compared with non-DM group. In *Nox4*^{-/-} mice, the fluorescence intensity was similar between DM group and non-DM group B: In mice fed with regular diet, the fluorescence was enhanced in DM group compared with non-DM group, and the intensity was similar between DM group and non-DM group in the mice fed with GKT+regular diet DM: diabetes mellitus; Nox: NADPH oxidase

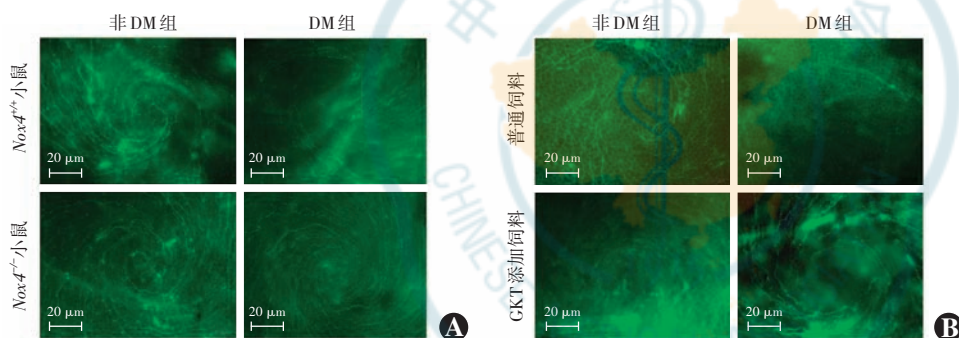


图 9 各组小鼠角膜神经纤维密度变化 (×400, 标尺 = 20 μm) 全角膜铺片中角膜神经纤维中 TUBB3 蛋白呈绿色荧光, 角膜中央旋涡状的绿色荧光纹理即为角膜中央区域的神经纤维 A: *Nox4*^{+/+} 小鼠 DM 组角膜中央区神经纤维密度较非 DM 组明显下降, *Nox4*^{-/-} 小鼠 DM 组角膜中央区神经纤维密度较非 DM 组轻度降低 B: 普通饲料喂养小鼠 DM 组角膜神经纤维密度明显低于非 DM 组, GKT 添加饲料喂养小鼠 DM 组角膜神经纤维与非 DM 组相比无显著改变

Figure 9 Changes in corneal nerve fiber density and morphology among different groups (×400, scale bar = 20 μm) TUBB3 protein was expressed in corneal nerve fiber on flatmount with a green fluorescence A: In *Nox4*^{+/+} mice, the corneal nerve fiber density was obviously reduced in DM group compared with non-DM group. In *Nox4*^{-/-} mice, the density was slightly reduced in DM group compared with non-DM group B: In mice fed with regular diet, the corneal nerve fiber density was obviously reduced in DM group compared with non-DM group, and no significant change in corneal nerve fiber density was seen between DM group and non-DM group in the mice fed with GKT+regular diet

低, 角膜上皮组织结构疏松, 角膜创伤愈合延迟^[21]。本研究中, DM 小鼠造模后第 16 周开始对各组小鼠进行眼表病变检测, 此时高血糖对角膜的损害更显著, 同时 DM 小鼠存活率较高, 因此有利于实验观察, 尤其是眼表改变的检测。

Nox4 在 DM 导致的眼表病变中发挥了重要作用, *Nox4* 活性增强与 DM 小鼠泪液分泌减少、角膜上皮完整性损害、角膜上皮细胞连接破坏和角膜基质神经损伤有密切关联。本研究发现, *Nox4*^{+/+} DM 小鼠泪液分泌量较 *Nox4*^{+/+} 非 DM 小鼠显著减少, 说明 DM 可导致

泪腺功能损害, 这与 Dogru 等^[22]关于 DK 的研究结果一致。对 *Nox4* 基因敲除或 *Nox4* 活性抑制剂 GKT 喂养的小鼠进行研究发现, *Nox4*^{-/-} DM 小鼠和 GKT 干预后的 DM 组小鼠泪液分泌量较 *Nox4*^{+/+} DM 小鼠增多, 提示 *Nox4* 在 DM 性泪腺损害过程中发挥了重要作用。角膜荧光素钠染色是活体评估角膜上皮完整性的重要指标, Yin 等^[23]研究表明, DM 大鼠角膜未发现明显荧光素钠染色, 闭锁连接蛋白 1、闭合蛋白和黏附连接蛋白均为评估细胞间紧密连接情况的指标,

在 DM 与非 DM 大鼠角膜中分布类似。然而本研究中角膜荧光素染色结果显示, *Nox4*^{+/+} DM 小鼠角膜上皮荧光染色更为明显, 而 *Nox4*^{-/-} 及 GKT 添加饲料喂养的 DM 组小鼠角膜仅有轻度着色或无着色。本研究还采用免疫荧光染色法观察角膜上皮中 E-Cadherin 蛋白表达, 发现其结果与角膜荧光素染色结果吻合, 提示 *Nox4* 基因敲除和 GKT 干预均可保护角膜上皮完整性和防御功能。

本研究与 Yin 等^[23]的实验结果存在一定差异, 可能与 2 个研究中角膜荧光素染色时间、选择的连接蛋

白指标及实验所用的动物种类不同有关。(1)本研究对实验动物的检测为 DM 造模后第 16 周,DM 导致的角膜上皮病变可能更重,而 Yin 等^[23]实验于造模后第 8 周进行检测,角膜上皮病变可能较轻。此外,本研究的观察时间是染色后 2 min, Yin 等^[23]研究中未注明观察时间。(2)本实验中检测的细胞间连接蛋白为 E-Cadherin,而 Yin 等^[23]检测的是紧密连接蛋白、闭合蛋白和 β -catenin 黏附蛋白。(3)本实验选用的动物是小鼠,而 Yin 等^[23]选用动物为大鼠。尽管 Yin 等^[23]发现 DM 大鼠角膜荧光素染色及细胞连接蛋白结果与非 DM 相比无明显差异,但其角膜创伤实验中发现细胞连接蛋白重塑较对照组延迟。关于上述角膜荧光素染色时间及相关影响因素有待后续实验进一步研究。DM 角膜创伤愈合延迟与神经细胞凋亡、神经营养因子分泌不足等密切相关。既往研究表明,DM 角膜基质层神经纤维密度降低,神经纤维长度缩短,神经纤维分支减少。本研究采用角膜激光扫描共聚焦显微镜进行观察,发现 DM 小鼠角膜基质层神经纤维密度降低甚至消失,相应地角膜上皮细胞凋亡也更显著,而 *Nox4* 基因敲除及 GKT 干预的 DM 小鼠角膜基质层神经纤维未见明显改变,角膜上皮细胞凋亡并不显著。这些结果均提示, *Nox4* 参与 DM 引起的角膜神经损害及角膜上皮细胞凋亡过程。本研究采用角膜铺片测定 TUBB3 蛋白在角膜中的表达,发现角膜中央螺旋状的神经纤维密度变化与激光扫描共聚焦显微镜检查结果基本一致。以上结果均提示 *Nox4* 在 DM 引起的角膜神经病变中发挥了关键作用。

NF- κ B 通路是炎症和凋亡相关病理过程的启动机制,目前认为其与 DK 中的角膜慢性炎症、角膜上皮细胞凋亡及炎症引起的 DM 周围神经病变有密切关联^[24]。*Nox4* 可能通过参与组织的过氧化反应而产生过量 ROS,进而激活 NF- κ B 炎症通路,介导 DK 的发生和发展。既往多项动物在体研究及离体细胞学实验均证实,氧化应激是干眼及角膜病变的主要病理机制,大鼠的瞬目抑制型干眼模型发现,氧化应激关键分子可诱导干眼角膜上皮病变^[9];下调氧化应激反应和募集内源性上皮细胞均可增强大鼠角膜碱烧伤后的修复功能,加速角膜上皮创伤愈合^[11]。有研究表明, *Nox* 介导的氧化应激在 NF- κ B 炎症反应信号通路和基质金属蛋白酶的激活中发挥重要作用^[25]。*Nox4* 是介导氧化应激反应的关键酶,参与视网膜新生血管形成、角膜碱烧伤等眼部病变过程^[26-27]。Wang 等^[28]关于 DM 小鼠角膜神经病变的相关研究中利用计算机预测和荧光素酶促反应技术进行 *Cg-m^{+/+} Leprdb/J (db/db)* 小鼠

模型的角膜创伤修复实验及角膜三叉神经感觉神经元体外培养,发现 miR-182 可能通过靶向 *Nox4* 成为 DM 角膜神经再生中的关键调节因子。本实验研究了 *Nox4* 在小鼠 DK 中的致病作用,发现 *Nox4* 基因敲除及其活性进行抑制对 DK 具有显著的保护作用。这些结果与 Wang 等^[28]的研究结果一致。目前对于 DK 的治疗主要为对症治疗且效果有限。本研究发现 GKT137831 可通过抑制 *Nox4* 活性而减少角膜中 ROS 产物及炎症因子的产生,有效保护 1 型 DM 小鼠眼表组织结构和功能,或可为 DK 的新药研发提供参考依据。

本实验仅通过酚红棉线测定泪液分泌功能,未检测泪液的成分及眼表炎症因子改变,此外仅采用荧光素钠染色评分和角膜冰冻切片染色对角膜 ROS 水平、NF- κ B 水平、E-Cadherin 表达和细胞凋亡情况进行定性评估而未进行定量评价,仅通过激光扫描共聚焦显微镜观察及角膜铺片免疫荧光染色法检测了角膜神经分布改变,未检测神经营养因子和神经生长因子水平等指标,因此存在一定的局限性,有待进一步开展相关研究以验证本研究结果。

本研究对 1 型 DM 小鼠进行 *Nox4* 基因敲除和 *Nox4* 活性抑制剂干预,探讨了 *Nox4* 在 DK 中的作用及可能的致病机制,发现成模后第 16 周 DM 小鼠泪液分泌减少,角膜上皮完整性破坏,角膜基质层神经密度减少,同时角膜组织细胞发生凋亡,角膜中 ROS 产物生成量增加,NF- κ B 介导的炎症反应被激活,而这些病变在 *Nox4* 基因敲除小鼠或活性抑制剂干预小鼠中均不明显,推测 *Nox4* 可能通过氧化应激反应损害 DM 小鼠眼表组织,诱发 ROS 产物生成,激活 NF- κ B 介导的炎症反应,从而参与 1 型 DM 小鼠角膜病变的发生和发展。进一步的研究应探讨 *Nox4* 表达的确切调控机制,为 DK 新的药物靶点的发现提供更为精准、客观的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 赵文心:参与实验设计、研究实施、数据采集、统计分析、数据解释、文章撰写及修改;张弦:参与实验设计、研究实施及数据采集;覃亚周:参与研究实施、数据采集和结果分析解读;张明:参与研究实施;高宁:参与数据分析和解释、对文章内容的批评性审阅和指导;秦莉:参与实验设计、指导实验、对文章知识性内容的批评性审阅;李晶明:参与实验设计、方案指导、分析/解释数据、文章撰写及批评性审阅

参考文献

- [1] 李永浩,刘祖国,吕林. 糖尿病性角膜病变[J]. 中山大学研究生学刊(自然科学与医学版),2002,(2):58-63.
Li YH, Liu ZG, Lyu L. Diabetic keratopathy DK[J]. J Graduates Sun Yat-Sen Univ (Natural Sciences, Medicine), 2002, (2): 58-63.
- [2] Dias AC, Batista TM, Roma LP, et al. Insulin replacement restores the

- vesicular secretory apparatus in the diabetic rat lacrimal gland[J]. *Arq Bras Oftalmol*, 2015, 78(3): 158-163. DOI: 10. 5935/0004-2749. 20150041.
- [3] 但婧, 周庆军, 谢立信. 晚期糖基化终末产物与糖尿病角膜病变关系的研究进展[J]. *中华眼科杂志*, 2018, 54(6): 475-480. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2018. 06. 018.
- Dan J, Zhou QJ, Xie LX. The research progress of relationship between advanced glycation end products and diabetic keratopathy[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2018, 54(6): 475-480. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2018. 06. 018.
- [4] Aubert CE, Michel PL, Gillery P, et al. Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2014, 30(8): 679-685. DOI: 10. 1002/dmrr. 2529.
- [5] Bejarano E, Taylor A. Too sweet; problems of protein glycation in the eye[J]. *Exp Eye Res*, 2019, 178: 255-262. DOI: 10. 1016/j. exer. 2018. 08. 017.
- [6] Han SB, Yang HK, Hyon JY. Influence of diabetes mellitus on anterior segment of the eye[J]. *Clin Interv Aging*, 2019, 14: 53-63. DOI: 10. 2147/CIA. S190713.
- [7] 罗荣莹, 邓应平. 糖尿病性角膜病变研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(6): 472-476. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 06. 015.
- Luo RY, Deng YP. Research progress of diabetic keratopathy[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(6): 472-476. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 06. 015.
- [8] Babizhayev MA, Stokrov IA, Nosikov VV, et al. The role of oxidative stress in diabetic neuropathy: generation of free radical species in the glycation reaction and gene polymorphisms encoding antioxidant enzymes to genetic susceptibility to diabetic neuropathy in population of type I diabetic patients[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(3): 1425-1443. DOI: 10. 1007/s12013-014-0365-y.
- [9] Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, et al. Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink-suppressed dry eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(4): 1552-1558. DOI: 10. 1167/iovs. 06-1027.
- [10] Tangvarasittichai O, Tangvarasittichai S. Oxidative stress, ocular disease and diabetes retinopathy[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(40): 4726-4741. DOI: 10. 2174/1381612825666190115121531.
- [11] Chien Y, Liao YW, Liu DM, et al. Corneal repair by human corneal keratocyte-reprogrammed iPSCs and amphiphatic carboxymethyl-hexanoyl chitosan hydrogel[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(32): 8003-8016. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2012. 07. 029.
- [12] Nita M, Grzybowski A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 3164734 [2023-11-08]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/26881021>. DOI: 10. 1155/2016/3164734.
- [13] Kim J, Kim CS, Sohn E, et al. Involvement of advanced glycation end products, oxidative stress and nuclear factor-kappaB in the development of diabetic keratopathy[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249(4): 529-536. DOI: 10. 1007/s00417-010-1573-9.
- [14] Zhang J, Dai Y, Wei C, et al. DNase I improves corneal epithelial and nerve regeneration in diabetic mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(8): 4547-4556. DOI: 10. 1111/jcmm. 15112.
- [15] Ajith TA. Alpha-lipoic acid: a possible pharmacological agent for treating dry eye disease and retinopathy in diabetes[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(12): 1883-1890. DOI: 10. 1111/1440-1681. 13373.
- [16] Zhang Z, Hu X, Qi X, et al. Resolvin D1 promotes corneal epithelial wound healing and restoration of mechanical sensation in diabetic mice[J]. *Mol Vis*, 2018, 24: 274-285.
- [17] Di G, Zhao X, Qi X, et al. VEGF-B promotes recovery of corneal innervations and trophic functions in diabetic mice[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40582 [2023-11-08]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/28091556>. DOI: 10. 1038/srep40582.
- [18] O'Brien WJ, Heimann T, Rizvi F. NADPH oxidase expression and production of superoxide by human corneal stromal cells[J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 2535-2543.
- [19] Huo Y, Qiu WY, Pan Q, et al. Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing[J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(6): 876-886. DOI: 10. 1016/j. exer. 2009. 07. 012.
- [20] Shi L, Chen H, Yu X, et al. Advanced glycation end products delay corneal epithelial wound healing through reactive oxygen species generation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 383(1-2): 253-259. DOI: 10. 1007/s11010-013-1773-9.
- [21] Sun H, Mi X, Gao N, et al. Hyperglycemia-suppressed expression of Serpine1 contributes to delayed epithelial wound healing in diabetic mouse corneas[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(5): 3383-3392. DOI: 10. 1167/iovs. 15-16606.
- [22] Dogru M. Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics[J/OL]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 84(10): 1210 [2023-11-12]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/11004112>. DOI: 10. 1136/bjo. 84. 10. 1210.
- [23] Yin J, Huang J, Chen C, et al. Corneal complications in streptozocin-induced type I diabetic rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(9): 6589-6596. DOI: 10. 1167/iovs. 11-7709.
- [24] Zagon IS, Sassani JW, Immonen JA, et al. Ocular surface abnormalities related to type 2 diabetes are reversed by the opioid antagonist naltrexone[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 42(2): 159-168. DOI: 10. 1111/ceo. 12144.
- [25] 李维纳, 杨玲玲, 谢立信. 核因子 κ B 信号通路在糖尿病角膜病变发生和发展中的作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(3): 224-228. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2020. 03. 012.
- Li WN, Yang LL, Xie LX. Role of the nuclear factor kappa B signaling pathway in the pathogenesis and development of diabetic keratopathy[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(3): 224-228. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2020. 03. 012.
- [26] Li J, Wang JJ, Yu Q, et al. Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice: role of NADPH oxidase 4[J]. *Diabetes*, 2010, 59(6): 1528-1538. DOI: 10. 2337/db09-1057.
- [27] Gu XJ, Liu X, Chen YY, et al. Involvement of NADPH oxidases in alkali burn-induced corneal injury[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(1): 75-82. DOI: 10. 3892/ijmm. 2016. 2594.
- [28] Wang Y, Zhao X, Wu X, et al. microRNA-182 mediates sirt1-induced diabetic corneal nerve regeneration[J]. *Diabetes*, 2016, 65(7): 2020-2031. DOI: 10. 2337/db15-1283.

(收稿日期: 2023-11-22 修回日期: 2024-05-22)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)

读者 · 作者 · 编者

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省立眼科医院承办的眼科专业学术期刊,月刊,每月10日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果,主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等,学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章,欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

(本刊编辑部)