

syndecan-1 在糖尿病视网膜中的表达

王静波,余欢龙

基金项目:国家自然科学基金(No. 81100684);首都卫生发展科研专项(No. 2011-5007-02)

作者单位:(100091)中国北京市,解放军第309医院眼科
作者简介:王静波,女,主治医师,研究方向:眼底病、眼内细胞的增生与调控。

通讯作者:王静波. jingbo.wang@yahoo.cn

收稿日期:2013-01-11 修回日期:2013-03-22

Expression of syndecan-1 in the retina of diabetes

Jing-Bo Wang, Huan-Long Yu

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81100684); Beijing Health Development Research Foundation, China (No. 2011-5007-02)

Department of Ophthalmology, the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100091, China

Correspondence to: Jing-Bo Wang. Department of Ophthalmology, the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100091, China. jingbo.wang@yahoo.cn

Received:2013-01-11 Accepted:2013-03-22

Abstract

• **AIM:** To observe the expression of syndecan-1 on epiretinal membranes obtained from patients with proliferative diabetic retinopathy and retina of diabetic rats.

• **METHODS:** SD rats were given intraperitoneal injection of streptozotocin to induce diabetes. Ink perfusion and stretched retina were used to observe the retinal blood vessels. Immunohistochemistry staining was used to detect syndecan-1 protein in the rat retina and epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy.

• **RESULTS:** In the diabetic rats of 9-week, peripheral retinal blood vessels shaped tortuously, capillary network was significantly reduced, and parts of the capillary perfusion was bad. In the control group, strong positive staining of syndecan-1 was detected in the nerve fiber layer and ganglion cells, moderate positive staining was observed in the inner plexiform layer and outer segments of photoreceptor, and weak positive staining was detected in the outer plexiform layer. In the retina of diabetic rats, syndecan-1 decreased. Moderate positive staining of syndecan-1 was observed in the nerve fiber layer, ganglion cells and outer segments of photoreceptor, weak positive staining was detected in the inner plexiform layer and outer plexiform layer. Among 13 specimens of epiretinal membranes, weak positive staining of syndecan-1 was detected in 8 cases (61.5%) and negative staining was observed in 5 cases (38.5%).

• **CONCLUSION:** Syndecan-1 is down-regulated in the retina of diabetic rats and epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy.

• **KEYWORDS:** syndecan-1; retina; diabetes

Citation: Wang JB, Yu HL. Expression of syndecan-1 in the retina of diabetes. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(4):660-662

摘要

目的:观察 syndecan-1 在增殖性糖尿病视网膜病变患者视网膜增殖膜及糖尿病大鼠视网膜中的表达变化。

方法:SD 大鼠行链脲佐菌素腹腔注射以诱导糖尿病。造模成功后,墨汁灌注及视网膜铺片观察视网膜的血管情况。免疫组织化学染色检测大鼠视网膜及人糖尿病视网膜增殖膜中 syndecan-1 蛋白的表达。

结果:糖尿病大鼠 9wk 时,视网膜周边血管走行迂曲,毛细血管网明显减少,部分毛细血管灌注不良。对照组大鼠的视网膜 syndecan-1 呈阳性表达,其中神经纤维层、节细胞层呈强阳性表达,内丛状层和光感受器外节呈中度阳性表达,外丛状层呈弱阳性表达。糖尿病大鼠视网膜中, syndecan-1 的表达减低,其中神经纤维层、神经节细胞层、光感受器外节呈中度阳性表达,内丛状层及外丛状层呈弱阳性表达。13 例人糖尿病视网膜病变视网膜增殖膜标本中, syndecan-1 弱阳性表达 8 例(61.5%),阴性表达 5 例(38.5%)。

结论:临床和动物实验共同表明,糖尿病状态下,视网膜中 syndecan-1 的表达降低。

关键词: syndecan-1; 视网膜; 糖尿病

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.04.04

引用:王静波,余欢龙. syndecan-1 在糖尿病视网膜中的表达. 国际眼科杂志 2013;13(4):660-662

0 引言

黏附分子在糖尿病视网膜病变的发生发展中起重要作用。syndecan-1 是一种重要的黏附分子,是硫酸肝素蛋白多糖家族成员,参与细胞的分化、黏附和移行,在炎症、组织损伤和修复、脂质代谢等病理生理过程中起重要作用^[1-4]。我们既往的研究表明, syndecan-1 参与糖尿病及其并发症的发生发展^[1,4,5],且 syndecan-1 参与视网膜的病理生理过程^[6-9]。但 syndecan-1 在糖尿病视网膜病变中的作用尚不明确。本研究中,我们观察增殖性糖尿病视网膜病变患者视网膜增殖膜和糖尿病大鼠视网膜中 syndecan-1 蛋白的表达变化。

1 材料和方法

1.1 材料 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma 公司,美国),兔抗人和鼠 syndecan-1 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),枸橼酸盐粉剂、磷酸盐缓冲液(PBS)粉剂、二步

法免疫组化检测试剂盒(含3%过氧化氢溶液和通用型IgG抗体-辣根过氧化物酶多聚体)、DAB试剂盒(含DAB浓缩液及缓冲液,北京中杉金桥生物技术有限公司),安稳血糖仪及血糖测试条(长沙三诺有限公司),冷冻包埋剂(樱花,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及动物模型的制备 雄性SD大鼠60只,SPF级,体质量 $120\pm 20\text{g}$,由军事医学科学院动物中心提供。大鼠在SPF级动物中心饲养,室内温度保持在 25°C 左右,湿度约50%。明暗周期12h,自由饮水和进食。适应性喂养1wk后,进行动物造模。造模前,禁食12h(不禁水)。随机选取50只大鼠,STZ 65mg/kg 腹腔注射;对照组10只大鼠,腹腔注射等量的枸橼酸盐溶液。72h后测血糖,随机血糖 $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 即为造模成功,每周监测血糖。

1.2.2 冰冻切片标本的取材及制备 糖尿病大鼠造模成功后,分别在第3,6,9和12wk,每个时间点随机选取10只大鼠,分别采用过量氯胺酮麻醉致死动物,迅速摘除单侧眼球, -80°C 保存。切片前,取出眼球,去除角膜和晶状体。选取2011-01/2012-06于我科行玻璃体视网膜手术的13例增殖性糖尿病视网膜病变患者,术者进行常规的玻璃体切除术和视网膜增殖膜剥除术,剥除的增殖膜用于实验。已去除前节的大鼠眼球和人视网膜增殖膜标本,用冷冻包埋剂包埋,冰冻切片连续切片,切片厚 $5\mu\text{m}$,贴于免疫组化专用防脱载玻片上,晾干后甲醇固定, -80°C 保存。

1.2.3 大鼠墨汁灌注及视网膜铺片 大鼠采用氯胺酮麻醉后,暴露心脏,纯墨汁行左心室灌注。处死大鼠后,迅速摘除眼球,4%多聚甲醛 4°C 过夜。去除角膜和晶状体,自视神经处剪开视网膜,以软毛刷轻轻刷去视网膜前表面的玻璃体及后表面的色素,将视网膜铺于多聚赖氨酸包被的载玻片上,甘油封片,照相。

1.2.4 免疫组化染色及结果判断 冰冻切片用PBS冲洗,30mL/L过氧化氢溶液室温10min,PBS洗,稀释的syndecan-1抗体(1:200)室温孵育2h,通用型IgG抗体-辣根过氧化物酶多聚体 37°C 孵育20min,PBS洗,DAB显色,PBS洗,苏木素复染,自然水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,照相。所有切片均由同一有经验的病理科医师盲法阅片做出判定。以组织切片背景清晰、细胞膜、细胞浆染为淡黄至棕黄色为阳性细胞标志。将阳性细胞按显示程度分为3级:弱阳性,即显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色;强阳性,即多数细胞呈黄至棕黄色染色;中度阳性,即显示强度介于弱阳性与强阳性之间。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠造模情况及大鼠一般情况观察 50只大鼠中,STZ腹腔注射成功诱导糖尿病47只(94.0%),造模成功的大鼠中死亡5只(10.6%)。对照组:大鼠体质量增加明显,精神状况良好,毛皮有光泽,动作自如,反应灵敏。糖尿病大鼠:建模成功后,大鼠出现了典型的“三多一少”症状,多饮、多食、多尿,明显消瘦,精神逐渐萎靡,早期多动,后期反应迟钝,动作缓慢,毛竖而无光泽。12wk时,部分大鼠出现白内障。

2.2 大鼠视网膜墨汁灌注 对照组大鼠的视网膜毛细血管分布均匀(图1A)。糖尿病大鼠9wk时,视网膜周边血管走行迂曲,毛细血管网明显减少,部分毛细血管灌注不良(图1B)。

2.3 大鼠视网膜 syndecan-1 蛋白的表达 在对照组,视网膜各层排列整齐。在实验组,视网膜水肿明显,视网膜厚度明显增加。syndecan-1表达于细胞膜和细胞浆。对照组的视网膜 syndecan-1呈阳性表达,其中神经纤维层、节细胞层呈强阳性表达,内丛状层、光感受器外节呈中度阳性表达,外丛状层呈弱阳性表达(图2A)。糖尿病大鼠7wk时,syndecan-1的表达开始减低。12wk糖尿病大鼠视网膜中,syndecan-1在神经纤维层、节细胞层、光感受器外节呈中度阳性表达,在内丛状层及外丛状层呈弱阳性表达(图2B)。

2.4 人视网膜增殖膜标本 syndecan-1 蛋白的表达 糖尿病视网膜病变患者13例视网膜增殖膜标本中,syndecan-1阴性表达5例(38.5%,图3A),弱阳性表达8例(61.5%,图3B)。

3 讨论

STZ诱导糖尿病大鼠是目前公认的经典糖尿病动物模型。但由于动物种属差异等因素,饲养12mo的糖尿病大鼠仍未出现增殖性糖尿病视网膜病变的改变^[10,11]。但STZ诱导的糖尿病大鼠可表现出视网膜水肿、周细胞丧失、毛细血管无灌注等病理改变^[10],与人类的糖尿病视网膜病变的背景相近。因而,STZ诱导的糖尿病大鼠模型可用于观察糖尿病视网膜病变背景期的改变,与相关研究一致。我们观察到,糖尿病大鼠成功建模第9wk,视网膜周边血管走行迂曲,毛细血管网明显减少,部分毛细血管灌注不良。

既往,我们多采用视网膜血管消化铺片^[10]和视网膜铺片ADP酶血管染色^[12]来观察视网膜的血管形态。我们此研究中采用了墨汁左心室灌注来观察视网膜的血管形态。与既往的两种方法相比,墨汁灌注法同样可清晰地观察视网膜中央和周边的血管,毛细血管也能清晰可见。但墨汁灌注法较其他两种方法的操作更简便、价格更低廉。

syndecan-1主要在上皮细胞、血管内皮细胞和浆细胞表达^[1,6]。syndecan-1在细胞的分化、细胞间及细胞与基质间的黏附起着重要的作用。syndecan-1的减低可导致细胞间及细胞与基质间的黏附减低,细胞构成的屏障功能破坏,细胞的移行增加。在肝癌、头颈部鳞癌等多种肿瘤,syndecan-1的表达减低,且这种减低与预后相关^[6]。糖尿病视网膜病变中,血管内皮细胞等多种细胞的过度增生形成视网膜前增殖膜,牵拉视网膜,导致视网膜脱离。我们的研究表明,syndecan-1在糖尿病视网膜病变的视网膜增殖膜的表达减低。我们推测,syndecan-1的减低可促使构成增殖膜的多种细胞移行和增生加速,从而加速糖尿病视网膜病变的进展,使病情进一步恶化。

慢性炎症在糖尿病及其并发症的发生发展中起重要的作用^[1,4,5,13]。syndecan-1参与炎症过程^[1,4]。肿瘤坏死因子等细胞因子可下调syndecan-1的表达^[14]。在炎症性肠病,肠上皮细胞syndecan-1的表达减低^[14],而且这种减低可导致肠上皮细胞的屏障功能破坏。我们既往的研究表明,syndecan-1参与糖尿病的炎症过程,并可能在糖尿病的血管并发症中起一定的作用^[1,4,5]。syndecan-1是血管内皮细胞与白细胞的负性调控剂^[5]。在syndecan-1基因敲除的小鼠,视网膜血管内皮细胞与白细胞的黏附增加^[5,15]。我们的动物实验表明,糖尿病建模成功后7wk,视网膜中syndecan-1的表达即有减低。我们推测,视网膜中syndecan-1表达的下调可使血管内皮细胞与白细胞的黏附发生改变,可促进视网膜病变的发展。

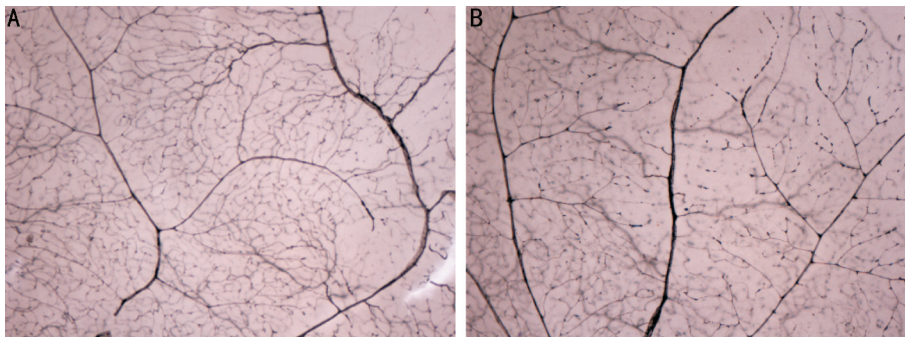


图1 大鼠视网膜墨汁灌注图片(×400) A:对照组;B:糖尿病9wk。

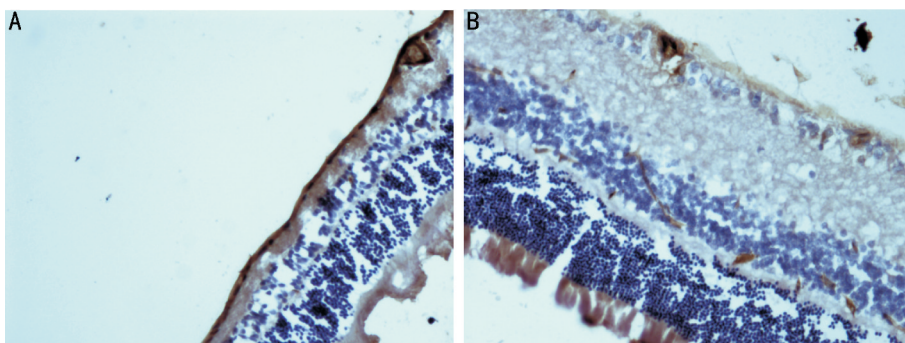


图2 大鼠视网膜 syndecan-1 免疫组化染色(×200) A:对照组;B:糖尿病12wk。

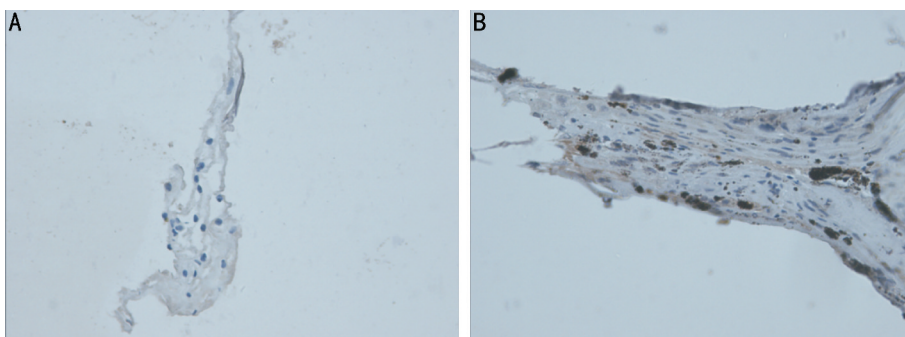


图3 糖尿病视网膜病变患者视网膜增殖膜 syndecan-1 表达的免疫组化染色(×200) A:阴性表达;B:弱阳性表达。

我们的研究表明,与正常的视网膜相比,糖尿病大鼠视网膜及增殖性糖尿病视网膜病变视网膜增殖膜中 syndecan-1 的表达减低。动物实验结果进一步验证了临床标本的结果。syndecan-1 的减低虽然可能加速糖尿病视网膜病变的发展,但该分子在该病变中的具体作用机制尚不清楚,我们需进行更深入的研究,以期待为糖尿病视网膜病变的防治提供新的靶点。

参考文献

- 1 Wang JB, Zhang YJ, Guan J, et al. Enhanced syndecan-1 expression on neutrophils in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2012;49(1):41-46
- 2 Bernfield M, Gotte M, Park PW, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999;68:729-777
- 3 Cortes V, Amigo L, Donoso K, et al. Adenovirus-mediated hepatic syndecan-1 overexpression induces hepatocyte proliferation and hyperlipidaemia in mice. *Liver Int* 2007;27(4):569-581
- 4 Wang JB, Zhang YJ, Zhang Y, et al. Negative correlation between serum syndecan-1 and apolipoprotein A1 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2010 [Epub ahead of print]
- 5 Wang JB, Guan J, Shen J, et al. Insulin increases shedding of syndecan-1 in the serum of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;86(2):83-88
- 6 Wang JB, Tian CW, Guo CM, et al. Increased levels of soluble

- syndecan-1 in the subretinal fluid and the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment. *Curr Eye Res* 2008;33(1):101-107
- 7 王静波, 惠延年, 韩泉洪, 等. 细胞因子对人视网膜色素上皮细胞 syndecan-1 的影响. *中华眼底病杂志* 2006; 22(2):113-116
- 8 王静波, 惠延年. 剪切力对视网膜色素上皮细胞 syndecan-1, 血管细胞黏附分子-1, E-选择素蛋白表达和肌动蛋白的影响. *国际眼科杂志* 2006; 6(6):1305-1308
- 9 王静波, 惠延年, 马吉献, 等. syndecan-1 在增生性玻璃体视网膜病变增殖膜中的表达. *眼科研究* 2004;22(5):474
- 10 宋鄂, 董宇, 隋东明, 等. 血管内皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子与糖尿病大鼠视网膜早期血管病变的关系. *中华医学杂志* 2003;83(11):996-999
- 11 Murata T, Nakagawa K, Khalil A, et al. The relation between expression of vascular endothelial growth factor breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest* 1996;74(4):819-825
- 12 李游, 张玉强, 史少阳, 等. Cyclin D1 在氧诱导视网膜病变大鼠视网膜中的表达. *眼科新进展* 2011;31(11):1012-1015
- 13 Meigs JB, Hu FB, Rifai N, et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004; 291(16):1978-1986
- 14 Day RM, Mitchell TJ, Knight SC, et al. Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine* 2003; 21(5):224-233
- 15 Götte M, Jousen AM, Klein C, et al. Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1135-1141