

# 血糖波动对糖尿病大鼠视网膜组织 DNA 损伤的影响

盖春柳<sup>1</sup>, 赵静如<sup>2</sup>, 陈晓隆<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(110004)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属盛京医院眼科;<sup>2</sup>(100700)中国北京市,北京中医药大学东直门医院眼科

作者简介:盖春柳,毕业于中国医科大学,博士,副主任医师,研究方向:眼底病、眼外伤。

通讯作者:盖春柳. 1579840567@qq.com

收稿日期:2014-03-06 修回日期:2014-05-14

## Effects of high blood glucose fluctuation on DNA damage of diabetic rat retinal tissues

Chun-Liu Gai<sup>1</sup>, Jing-Ru Zhao<sup>2</sup>, Xiao-Long Chen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

**Correspondence to:** Chun-Liu Gai. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. 1579840567@qq.com

Received:2014-03-06 Accepted:2014-05-14

### Abstract

• **AIM:** To observe the situation of rat retinal tissue DNA damage at early diabetic period, discuss the role of the blood glucose fluctuations, and provide a new method for studying the pathogenesis of diabetic retinopathy (DR).

• **METHODS:** SD rats were randomly divided into four groups: normal control group (NC), normal fluctuation group (NF), diabetes group (DM) and diabetes fluctuation group (DF). Diabetic models were established through intraperitoneal injection of STZ. A certain amount of glucose was injected in the rats of group NF and DF in an intraperitoneal mode three times a day after the model was established, thereby causing blood glucose fluctuations. Rats were killed and the retinal tissues were taken in the 8th week. Single cell gel electrophoresis (SCGE) technique was adopted for detecting DNA injury extent in the retina tissue.

• **RESULTS:** Groups NF and DF showed significant and regular fluctuations. The curve of blood glucose fluctuations was relatively stable. All values of MBG, SDBG, LAGE and M were significantly increased compared with group NC. Group DF was increased more significantly. It was statistically significant ( $P < 0.01$ ). SCGE showed that there were DNA damages in different levels in the cells of group NF, DM and DF. Indicators of

cells such as TL, TDNA %, TM, OTM were higher than that in group NC. It was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The comparison difference between two groups was also significant ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** Rat retinal tissues have DNA injury during early diabetic period. DNA injury is gradually aggravated with blood glucose fluctuation. It indicates that high blood glucose and blood glucose fluctuation are involved in the mechanism of cell DNA injury, and they may be one of DR early event, have played a certain role in the incidence of DR.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; blood glucose fluctuation; DNA damage; single cell gel electrophoresis

**Citation:** Gai CL, Zhao JR, Chen XL. Effects of high blood glucose fluctuation on DNA damage of diabetic rat retinal tissues. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(6):992-995

### 摘要

**目的:**观察糖尿病大鼠视网膜组织 DNA 损伤的程度,探讨血糖波动对其的影响,为研究糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的发病机制提供新的思路。

**方法:**SD 大鼠随机分为正常对照组(NC)、正常波动组(NF)、糖尿病模型组(DM)和糖尿病波动组(DF)。腹腔注射 STZ 诱导糖尿病, NF 和 DF 两组大鼠每天三次腹腔注射葡萄糖造成血糖波动,第 8wk 取视网膜,采用单细胞凝胶电泳(SCGE)技术检测 DNA 损伤程度。

**结果:**NF 和 DF 两组大鼠血糖变化明显而且规律,波动曲线稳定,评价血糖稳定性的各项指标较 NC 组均有明显的增高,DF 组升高更显著,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。SCGE 显示 NF, DM 和 DF 三组细胞均有不同程度的 DNA 损伤,彗星尾长(TL)、尾部 DNA 含量(TDNA%)、尾矩(TM)和 Olive 尾矩(OTM)四指标均高于 NC 组,多组及两组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**结论:**糖尿病大鼠视网膜组织存在 DNA 损伤,血糖波动可加重损伤,表明高血糖和血糖波动可能参与了视网膜组织 DNA 损伤的机制,可能是 DR 发生的早期事件之一,在 DR 的发生发展中起了重要的作用。

**关键词:**糖尿病视网膜病变;血糖波动;DNA 损伤;单细胞凝胶电泳

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.06.03

**引用:**盖春柳,赵静如,陈晓隆.血糖波动对糖尿病大鼠视网膜组织 DNA 损伤的影响.国际眼科杂志 2014;14(6):992-995

### 0 引言

目前普遍认为,整体血糖水平和血糖波动情况共同决定了糖尿病慢性并发症的发生和发展<sup>[1,2]</sup>,血糖波动幅

度越大,慢性并发症的发生率越高、预后越差。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的严重并发症之一,是导致视力丧失的主要原因<sup>[3]</sup>,但发病机制至今尚未完全明确,有研究证实糖尿病视网膜神经组织的变性要早于血管组织的异常。所以本实验建立血糖波动模型,观察糖尿病早期视网膜组织 DNA 损伤的情况,分析血糖波动所起的作用,为研究 DR 的发病机制提供新的思路,为科学预防和临床治疗提供参考资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组及实验材料

**1.1.1 实验动物与分组** 健康雄性 SD 大鼠 40 只,鼠龄 12wk,体质量 180~220g,由中国医科大学附属盛京医院实验动物中心提供,专人分笼喂养,严格遵守清洁动物级大鼠喂养条件。实验动物及实验所用条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。大鼠随机分为四组:正常对照组(NC)、正常波动组(NF)、糖尿病模型组(DM)和糖尿病波动组(DF),每组各 10 只大鼠。

**1.1.2 实验材料** 链脲佐菌素(streptozocin, STZ, 美国 Sigma 公司);Gold view(美国 Sigma 公司);正常熔点琼脂糖(NMA, Spain 公司);低熔点琼脂糖(LMA, BioSHARP 公司);50%葡萄糖(glucose, GLU, 20g/10mL, 上海化学试剂公司);拜安捷 2 血糖仪和血糖监测试纸(美国拜耳医药保健有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立** 所有大鼠适应性饲养 1wk,禁食 12h 后称重,DM 和 DF 组大鼠用 1% STZ 溶液按 60mg/kg 剂量一次性腹腔注射,诱导建立糖尿病模型,72h 后尾缘静脉取血,血糖仪测随机血糖 $\geq 16.7$ mmol/L 者,稳定 5d 即可为建模成功。此后 NF 和 DF 组每天三次腹腔注射 50%葡萄糖溶液 2g/kg,注射时间分别为 8:00, 12:00 和 16:00 时,NC 和 DM 组则腹腔注射等量的生理盐水。2wk 测量一次体质量,根据体质量的变化调整注射葡萄糖的量,连续观察 8wk。

**1.2.2 血糖稳定性的评估** 2wk 进行一次大鼠全天血糖的检测,即各组大鼠在每次注射前及注射后 30min 测血糖,分别为 8:00, 8:30, 12:00, 12:30, 16:00, 16:30 和 20:00 时共 7 个时间点,绘制“时间-血糖浓度”曲线,观察血糖波动的情况。根据血糖值计算各组大鼠平均血糖水平(MBG)、平均血糖水平标准差(SDBG)、最大血糖波动幅度(LAGE)和 Schlichtkrull Mz 值(M 值),从四个不同方面来评价血糖的稳定性。M 值计算方法参照相关文献: $M = \sum |10 \times \text{LOG}_{10}(\text{BG}/5)|^3 / N$ , BG 为血糖值, N 为测量血糖次数。

**1.2.3 单细胞悬液的制备** 第 8wk 处死各组大鼠,立即取出左眼球,去除眼前节、玻璃体,剥离视网膜组织,用眼科剪充分剪碎,滴加 PBS 轻轻研磨,200 目筛网过滤,1500r/min 离心 5min,弃上清, PBS 重悬,调整细胞浓度在  $5 \times (10^6 \sim 10^7) / \text{mL}$  之间,制成单细胞悬液,用于 DNA 损伤的检测。

**1.2.4 SCGE 的检测** 将新鲜制备的细胞悬液和 0.5% 的低熔点琼脂糖预热混匀后,滴到预处理的含有 0.5% 正常熔点琼脂糖的磨砂玻片上,充分凝固后,再滴加一层 0.5% 的低熔点琼脂糖,经细胞裂解和碱性缓冲液解旋

后,以 0.7V/cm 电压电泳 20min,经过中和、Gold view 染色,最后在荧光显微镜(激发波长 480nm)下观察、摄像。应用彗星分析软件(CASP)对彗星图像进行分析,每组选择 200 个细胞,计算彗星尾长(TL)、尾部 DNA 含量(TDNA%)、尾矩(TM)和 Olive 尾矩(OTM),来评价 DNA 的损伤程度。

统计学分析:所有资料采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。血糖稳定性的评估指标服从正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 法;视网膜组织 DNA 损伤评价指标不服从正态分布,以 M(Min-Max)表示,多组间比较采用 Kruskal H 检验,两两比较采用 Bonferroni 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠一般状况** NC 和 NF 组大鼠无糖尿病症状,精神状态良好,毛皮有光泽,体质量增长较快,动作灵敏。DM 和 DF 组大鼠呈现明显多饮、多食、多尿典型的糖尿病症状,精神逐渐萎靡,毛皮污秽无光泽,体型消瘦、蜷卧拱背,反应迟钝,部分大鼠出现晶状体混浊。

### 2.2 血糖波动的评价

**2.2.1 “时间-血糖浓度”曲线** 根据第 8wk 全天血糖的检测值绘制“时间-血糖浓度”曲线(图 1),NC 组大鼠全天血糖在正常范围内,平稳无波动,NF 组大鼠血糖在 5~10mmol/L 范围内波动,DM 和 DF 组大鼠血糖均维持在较高水平( $>20$ mmol/L),DM 组波动幅度不大,DF 组则出现明显的波动;NF 和 DF 组每次腹腔注射葡萄糖后可使血糖出现明显的升高,与没有注射的对应组(NC 和 DM 组)比较均有显著差异( $P < 0.01$ );NF,DF 组大鼠的血糖变化明显而且规律,波动曲线比较稳定。

**2.2.2 血糖稳定性的比较** 根据血糖的检测值计算各组大鼠的 MBG, SDBG, LAGE 和 M 值(表 1)。结果表明:NF,DM 与 DF 三组大鼠各项指标均较 NC 组增高,多组及两组之间差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明腹腔注射葡萄糖后会导致血糖波动,增加血糖的不稳定性,而且糖尿病大鼠的血糖波动幅度比正常大鼠的波动幅度大。

### 2.3 视网膜组织 DNA 的损伤

**2.3.1 DNA 形态变化** 电泳后在荧光显微镜下观察 DNA 被染成桔红色。NC 组细胞未发生 DNA 断裂,细胞表现为圆形的荧光头,边缘清楚,密度均匀,拖尾细胞数少(图 2A);NF,DM,DF 三组细胞发生了 DNA 断裂,出现不同程度的彗星样拖尾细胞,即细胞头部变小,尾部变长(图 2B~D)。由图可看出,DM 和 DF 组拖尾细胞数增多,表明 DNA 断裂增多、细胞损伤加重。

**2.3.2 彗星软件测定 DNA 损伤** 应用 CASP 软件对彗星图像进行分析,计算 TL,TDNA%,TM,OTM,进一步评价 DNA 的损伤程度,结果见表 2。NC 组正常大鼠视网膜组织中即存在少量 DNA 损伤,其余三组 TL,TDNA%,TM 和 OTM 各项指标均较 NC 组有明显增加的趋势,多组及两组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果表明高血糖可使视网膜组织细胞受损,DNA 断裂增加,随着血糖波动的明显,血糖不稳定的增加,DNA 断裂、细胞损伤逐渐加重。

表1 评价大鼠血糖稳定性各指标的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	MBG (mmol/L)	SDBG (mmol/L)	LAGE (mmol/L)	M-Value
NC组	5.10±0.25	0.51±0.11	1.46±0.36	0.18±0.14
NF组	6.92±0.40 <sup>b</sup>	2.65±0.36 <sup>b</sup>	5.92±0.65 <sup>b</sup>	12.00±3.01 <sup>b</sup>
DM组	21.51±0.92 <sup>b</sup>	1.39±0.69 <sup>b</sup>	4.10±1.92 <sup>b</sup>	255.18±22.43 <sup>b</sup>
DF组	26.91±1.30 <sup>b,d,f</sup>	4.89±0.75 <sup>b,d,f</sup>	10.99±2.24 <sup>b,d,f</sup>	392.59±32.83 <sup>b,d,f</sup>
F	3335.17	245.35	139.64	1853.42
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:MBG表示平均血糖水平、SDBG表示平均血糖水平标准差、LAGE表示最大血糖波动幅度、M值表示 Schlichtkrull Mz 值;<sup>b</sup>P<0.01 vs NC组;<sup>d</sup>P<0.01 vs DM组;<sup>f</sup>P<0.01 vs NF组。

表2 各组大鼠视网膜组织 DNA 损伤的测定结果 [M (Min ~ Max), n=200]

组别	TL(μm)	TDNA%	TM	OTM
NC组	3(3~8)	1.053(1~9)	0.0049(-0.01~9.94)	0.12(-0.02~8.75)
NF组	15(3~49) <sup>b</sup>	9.67(0~39.83) <sup>b</sup>	1.63(0~17.92) <sup>b</sup>	1.90(0~11.78) <sup>b</sup>
DM组	26(6~47) <sup>b</sup>	24.73(4.43~63.80) <sup>b</sup>	6.63(0.45~27.72) <sup>b</sup>	4.62(0.1~18.74) <sup>b</sup>
DF组	29(9~58) <sup>b,d,f</sup>	28.04(7.18~55.25) <sup>b,d,f</sup>	8.14(0.72~29.73) <sup>b,d,f</sup>	5.47(1.22~16.41) <sup>b,d,f</sup>
F	535.577	568.043	537.112	530.606
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:TL表示彗星尾长,TDNA%表示尾部DNA含量,TM表示尾矩,OTM表示 Olive 尾矩;<sup>b</sup>P<0.01 vs NC组;<sup>d</sup>P<0.01 vs DM组;<sup>f</sup>P<0.01 vs NF组。

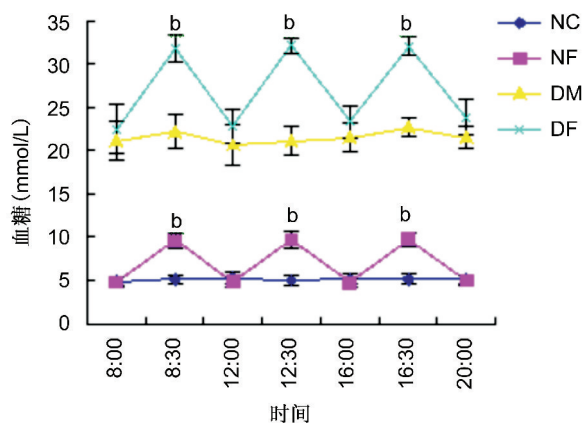


图1 根据全天血糖的检测值绘制“时间-血糖浓度”曲线 <sup>b</sup>P<0.01 vs NC,DM组。

### 3 讨论

糖尿病的主要危害在于各种并发症的出现,DR是最常见的并发症,但其发病机制至今尚未完全明确。研究发现高血糖诱发 ROS 产生是糖尿病并发症发生的一个早期事件,氧化应激是糖尿病并发症发生、发展的重要因素<sup>[5]</sup>,而且血糖波动更容易引发氧化应激<sup>[6]</sup>,血糖波动幅度越大,慢性并发症的发生率越高、预后越差。

关于血糖波动的研究多见于临床报道和细胞水平<sup>[7]</sup>,在体研究血糖波动的动物模型较少<sup>[8-10]</sup>。我们先用一次性注射大剂量 STZ 诱发 1 型糖尿病,而后采用腹腔注射葡萄糖的方法来构建血糖波动模型。全天血糖监测的结果显示:大鼠腹腔注射葡萄糖后血糖会迅速上升,在下次注射前血糖基本恢复到原先水平,每天注射 3 次,形成了 3 个明显的尖峰,如此反复,血糖有规律地进行波动,绘制的“时间-血糖浓度”曲线稳定;通过对 MBG,SDBG,LAGE 及 M 值的比较发现:NF,DM 和 DF 三组各指标数值比 NC 组明显增高,多组及两组间比较差异有统计学意义(P<0.01)。

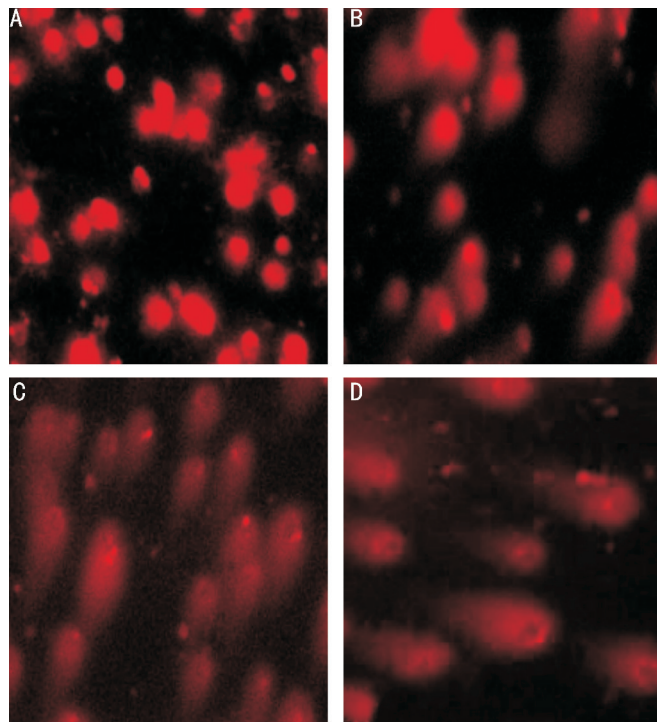


图2 各组大鼠视网膜单细胞凝胶电泳图像 (Gold view 染色×400) A:正常对照组。细胞头圆、边缘清楚,拖尾细胞少;B~D:正常波动组、糖尿病模型组及糖尿病波动组,可见细胞头部变小尾部变长,呈彗星样拖尾改变。

所以通过人为腹腔注射葡萄糖的方法建立血糖波动模型是可行的,可使血糖的不稳定性增加,而且糖尿病大鼠血糖的波动幅度比正常大鼠明显。

细胞内 ROS 最主要的攻击目标是 DNA,它通过直接和间接的机制损伤 DNA,其中 DNA 链的断裂最为常见。单细胞凝胶电泳(SCGE)又称彗星实验,是一种在单细胞水平上检测细胞 DNA 损伤及损伤修复的技术<sup>[11]</sup>,经过裂



解、解旋、电泳后,受损的细胞呈现“彗星”外观,明亮的头部为细胞核,一系列的 DNA 断片组成“彗尾”,未受损的细胞只有“彗核”而无“彗尾”。SCGE 技术不但为研究 DNA 损伤提供了形态学的资料,而且可以通过测定“彗星”的情况和荧光强度来推测 DNA 链断裂情况,量化 DNA 损伤的程度。

目前 SCGE 已经广泛地用于有核细胞的 DNA 损伤与修复研究。有研究应用 SCGE 测定氧化、辐射及细胞外高糖、高钙环境对体外培养的晶状体上皮细胞 DNA 的损伤,结果表明各处理组细胞呈不同程度的典型彗星图像,头尾分明,与对照组相比差异具有显著性 ( $P < 0.001$ )<sup>[12]</sup>;高糖还可引起体外培养的牛视网膜毛细血管周细胞氧化应激和 DNA 损伤。我们建立糖尿病模型,通过在体实验研究高糖及血糖波动对视网膜组织 DNA 损伤的影响。结果观察到正常大鼠视网膜组织中存在少量 DNA 损伤,DM 组大鼠视网膜组织细胞 DNA 链的断裂增加,细胞头小尾长,拖尾细胞数增多,TL,TDNA%,TM,OTM 指标均升高,与 NC 组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ );DF 组大鼠 DNA 的损伤比 DM 组更明显,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。这与以往的体外研究结果类似,提示高血糖作为一种独立危险因素促进了 DNA 损伤,血糖波动作为一种刺激信号使 DNA 损伤更加明显,具有独立于持续高血糖以外的损伤作用。

但最近糖尿病控制与并发症试验<sup>[13]</sup>研究发现代表血糖波动水平的血糖标准差对 DR 发生发展的影响不如平均血糖水平;Wentholt 等<sup>[14]</sup>研究发现血糖波动并未比持续高糖状态增加 1 型糖尿病患者的氧化损伤;国内也有研究<sup>[15]</sup>显示持续性高糖对视网膜周细胞 DNA 的损伤作用大于波动性高糖的作用,他们认为在持续性高糖下周细胞受到持续性刺激,细胞受损严重,而波动性高糖中周细胞间断处于高糖刺激作用下,有一定时间进行代偿反应,以修复在高糖作用下的损伤。这与我们的结果又有些出入,分析原因如下:我们的实验是通过腹腔注射葡萄糖的方法引起血糖波动,而不是应用胰岛素或类似物降低血糖导致血糖波动,因此血糖一直波动于较高水平,从而使视网膜组织细胞受到持续性的刺激,故得出血糖波动对 DNA 的损伤比持续性高血糖更明显的结果。

所以从本实验研究结果中我们大胆推测高血糖及血糖波动可能参与了视网膜组织 DNA 的损伤机制:高血糖诱导细胞自由基形成增多,产生氧化应激,使 DNA 的碱基和脱氧核糖发生化学变化,导致 DNA 断裂损伤,而血糖的

波动性增加可能对 DNA 损伤起到了促进的作用,从而为诱发细胞凋亡、DR 的发生发展提供了一个前提条件,为研究 DR 的发病机制提供了一个新的思路,为科学预防和临床治疗提供参考资料。

#### 参考文献

- 1 王先令,陆菊明,潘长玉,等. 糖耐量低减者和新诊断 2 型糖尿病患者动态血糖谱的特点. 中华医学杂志 2006;86(10):674-677
- 2 张静,叶希韵,王耀发. 血糖波动与糖尿病并发症. 中华中西医杂志 2005;6(9):1319-1321
- 3 Del Prato S. In search of normoglycemia in diabetes: controlling postprandial glucose. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26(Suppl 3):S9-17
- 4 Konca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res* 2003;534(1-2):15-20
- 5 Li Y, Lu Y. Perspectives on mechanism of diabetic retinopathy in ear stage. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2005;5(4):750-754
- 6 Piconi L, Corgnali M, Da Ros R, et al. The protective effect of rosuvastatin in human umbilical endothelial cells exposed to constant or intermittent high glucose. *J Diabetes Complications* 2008;22(1):38-45
- 7 Risso A, Mercuri F, Quagliari L, et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281(5):E924-930
- 8 Azuma K, Toyofuku Y, Iesaki T, et al. Acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor, improves endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki rats exhibiting repetitive blood glucose fluctuation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(2):688-693
- 9 金可可,林艳红,王万铁,等. 血糖波动对糖尿病大鼠肾小球内皮细胞和肾小管上皮细胞凋亡的影响. 中国病理生理杂志 2007;23(3):570-573
- 10 涂白青,翁宇静,童智,等. 糖尿病小鼠血糖波动模型的建立及其对脏器损伤的研究. 复旦学报(自然科学版) 2008;47(5):647-651
- 11 Andrew R. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 2004;26:249-261
- 12 崔璟琳,高维奇,刘平,等. 晶状体上皮细胞 DNA 损伤的 SCGE 测定法. 哈尔滨医科大学学报 2006;40(5):388-390,393
- 13 Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. Effect of glucose variability on the long-term risk of microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32(10):1901-1903
- 14 Wentholt IM, Kulik W, Michels RP, et al. Glucose fluctuations and activation of oxidative stress in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2008;51(1):183-190
- 15 江红,匡洪宇,马丽丽,等. 波动性及恒定性高糖对视网膜毛细血管周细胞 DNA 损伤的影响. 实用糖尿病杂志 2010;6(4):12-14