

糖皮质激素对糖尿病大鼠视网膜病变的影响

张博, 王玉波, 刘文强, 刘学政

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院基础学院解剖学教研室

作者简介: 张博, 在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。

通讯作者: 刘学政, 博士, 教授, 辽宁医学院院长, 研究方向: 糖尿病视网膜病变. liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期: 2015-03-20 修回日期: 2015-07-15

Effects of glucocorticoids on retina in diabetic rats

Bo Zhang, Yu - Bo Wang, Wen - Qiang Liu, Xue - Zheng Liu

Department of Anatomy, Foundation Institute of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue - Zheng Liu. Department of Anatomy, Foundation Institute of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. liuxuezheng168@vip.sina.com

Received: 2015-03-20 Accepted: 2015-07-15

Abstract

• AIM: To investigate the effect and mechanism of glucocorticoids on retinal nerve tissue in diabetes mellitu (DM) rats.

• METHODS: The DM model was established by a single injection of streptozotocin. Diabetic rats were intravitreal injected with adenovirus vehicle (DM group), or carried glucocorticoids receptor antisense (siGR group), or scrambled nucleotide (scRNA group). Control group (CON group) were normal SD rats intravitreal injected with adenovirus vehicle. Twelve weeks later, the density of retinal ganglion cell (RGC) and retinal thickness were detected by HE staining, and the expression of ROCK was observed by immunohistochemical staining and Western-blot.

• RESULTS: Compared with CON group, glucocorticoid concentrations were significantly increased in DM group, siGR group and scRNA group ($P < 0.01$, respectively). DM group and scRNA group showed reduction of RGC density and retinal thickness, and up-regulation of ROCK ($P < 0.01$, respectively). While no alterations was detected between CON group and siGR group ($P > 0.05$, respectively).

• CONCLUSION: Inhibition of glucocorticoids in diabetes reverses the expression of retinal ROCK, RGC density,

and retinal thickness.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; retinal ganglion cells; glucocorticoids; ROCK

Citation: Zhang B, Wang YB, Liu WQ, et al. Effects of glucocorticoids on retina in diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(8):1319-1321

摘要

目的: 探讨糖皮质激素对糖尿病 (diabetes mellitu, DM) 大鼠视网膜神经组织的损伤作用及机制。

方法: 利用链脉佐菌素诱导大鼠 DM 模型, 玻璃体内注射腺病毒 (DM 组) 或腺病毒包装的糖皮质激素受体反义寡核苷酸 (siGR 组)、阴性核苷酸序列 (scRNA 组)。另取正常 SD 大鼠, 玻璃体腔注射腺病毒为对照组 (CON 组)。12wk 后, HE 染色检测视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 密度, 测量大鼠视网膜厚度, 免疫组织化学和 Western-blot 检测 ROCK 表达变化。

结果: 与 CON 组相比, DM 组、siGR 组及 scRNA 组糖皮质激素浓度均明显升高 (均 $P < 0.01$)。HE 染色显示, 与 CON 组相比, DM 组及 scRNA 组 RGC 密度明显降低, 视网膜厚度下降, ROCK 的蛋白表达增加 (均 $P < 0.01$), 而 siGR 组无明显变化 (均 $P > 0.05$)。

结论: 抑制糖皮质激素能下调糖尿病大鼠视网膜 ROCK 表达, 恢复视网膜 RGC 密度降低及视网膜厚度。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 视网膜神经节细胞; 糖皮质激素; ROCK

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.8.04

引用: 张博, 王玉波, 刘文强, 等. 糖皮质激素对糖尿病大鼠视网膜病变的影响. *国际眼科杂志* 2015;15(8):1319-1321

0 引言

糖尿病患者数逐渐增加, 预计全球的糖尿病人数将从 2013 年的 2 亿 8 千万增至 2035 年的 5 亿 9 千万^[1]。约 30% 以上的糖尿病患者并发糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR), DR 严重影响患者视力, 已经成为发达国家成年人致盲的首要因素^[2,3]。在我国, DR 患者占糖尿病患者 20% ~ 40%, 也已经成为成年人致盲最常见的原因。目前, 各种临床治疗手段均无法有效阻止 DR 的病情发展^[4]。视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 是视神经的主要组成部分, RGC 凋亡是 DR 的重要原因之一^[5]。Rhoa-ROCK 信号通路由三个关键分子组成: Rhoa、肌球蛋白磷酸酶 (myosin phosphatase, MP) 和 ROCK。当 ROCK 激活后可以诱发神经轴突细胞回缩, 抑制下游 Rhoa-

表1 糖皮质激素对糖尿病大鼠视网膜病变的视网膜厚度影响 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

分组	眼数	鼻上	鼻下	颞上	颞下
CON组	5	123.63±3.24	122.63±4.12	121.63±2.64	121.94±2.51
DM组	5	104.00±2.78	103.86±1.46	104.32±2.28	104.11±1.83
scRNA组	5	113.55±7.76	117.82±3.63	113.55±4.10	115.84±5.16
siGR组	5	124.55±4.26	122.73±3.11	123.63±2.33	122.93±4.18
<i>F</i>		245.87	195.26	242.73	168.46
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

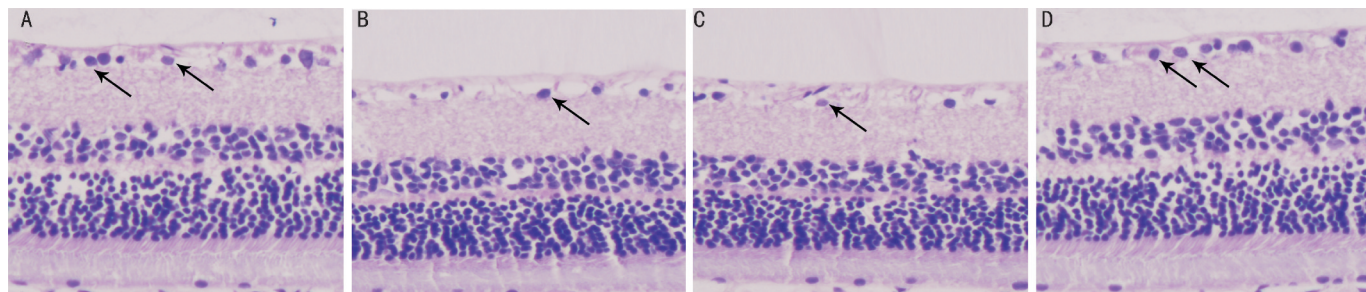


图1 视网膜 HE 染色(箭头示 RGC 细胞,×200) A:CON 组;B:DM 组;C:scRNA 组;D:siGR 组。

ROCK 的激活后,可减少 RGC 凋亡。糖皮质激素增加是糖尿病的特征性表现之一,糖皮质激素能导致神经元凋亡。因此,本研究拟探讨糖皮质激素对 RGC 的影响及机制。本研究对于揭示 DR 发病机制以及 DR 的临床治疗具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 200~230g (辽宁医学院实验动物中心)。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, Sigma);糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 反义寡核苷酸序列为 5'-TGGAGTCCATTGGCAAAT-3',以腺病毒包装 (上海吉玛生物司);糖皮质激素试剂盒 (MP Biomedicals 生物试剂公司);HE 试剂盒 (碧云天生物技术研究所);ROCK 抗体、免疫组织化学及 Western blot 相关二抗 (Abcam)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及实验分组 SD 大鼠单次腹腔注射 STZ (55mg/kg), 3d 后尾静脉测血糖浓度高于 16.7mmol/L 即为糖尿病模型。玻璃体内注射腺病毒 (DM 组) 或腺病毒包装的糖皮质激素受体反义寡核苷酸 (siGR 组)、阴性核苷酸序列 (scRNA 组),另取正常大鼠玻璃体腔注射腺病毒为对照组 (CON 组),注射体积均为 10 μL , 每组 10 只大鼠 3mo 后进行检测。

1.2.2 视网膜 HE 染色 取 5 只大鼠,以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 (0.3mL/100g),以 4% 多聚甲醛溶液心脏灌注固定,取双侧眼球 (左眼用于 HE 染色,右眼用于免疫组化),20% 蔗糖溶液过夜脱水,眼球冠状位切片,厚度 15 μm 。苏木精浸染 2min,自来水冲洗,分化液 30s, PBS 冲洗,伊红染色浸染 90s, PBS 冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片,倒置显微镜观察,每张切片选 3 个视野,计数 RGC 密度。距视盘边缘 200 μm 处 100 μm 长度内随机取 4 点,利用 Pro plus 6.0 软件测算视网膜内层厚度 (视网膜内界膜到外网状层内缘的距离)。

1.2.3 免疫组织化学检测大鼠视网膜 ROCK 表达 PBS 浸泡震荡 3 遍,10min/次,滴加 3% 过氧化氢溶液 10min,血清孵育 30min,切片滴加一抗,室温湿盒保存过夜, PBS

冲洗 3 遍,滴加生物素标记的二抗,室温湿盒保存 4h,以 ABC 反应试剂盒显色,苏木素轻度复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,倒置显微镜下观察视网膜节细胞层 ROCK 阳性染色结果。

1.2.4 Western-bolt 检查大鼠视网膜 ROCK 表达 取 5 只大鼠,麻醉后取左眼,解剖镜下分离视网膜组织、剪碎并研磨,称重后按比例加入蛋白裂解液,30min 后离心 10000r/min,15min,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后电泳分离,再转入硝酸纤维素膜,室温封闭缓冲液 1h。分别加入一抗 (兔抗大鼠 ROCK 或 β -actin, 稀释度 1:1000) 湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 稀释度 1:1000),37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 40min,漂洗 3 次,每次 10min,试剂盒显色,以 β -actin 为内对照,观测 ROCK 蛋白相对表达量。

统计学分析:数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,进行单因素方差分析,采用 LSD-*t* 检验进行组间的两两比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖皮质激素对糖尿病大鼠视网膜病变 RGC 密度的影响 视网膜 HE 染色显示,CON 组及 siGR 组视网膜 RGC 细胞排列规则,密度均匀,而 DM 组及 scRNA 组视网膜 RGC 细胞数量减少,密度不均匀。CON 组、DM 组、scRNA 组及 siGR 组视网膜 RGC 密度分别为 1209 \pm 295, 843 \pm 236, 861 \pm 263, 1139 \pm 304 个/ mm^2 。四组之间比较,总体有统计学差异 ($F = 121.35, P < 0.01$),与 CON 组相比,DM 组视网膜 RGC 细胞密度明显降低 ($t = 38.46; P < 0.01$),scRNA 组视网膜 RGC 细胞密度明显降低 ($t = 43.21; P < 0.01$),siGR 组 RGC 密度无明显变化 ($t = 7.59; P > 0.05$,图 1)。

2.2 糖皮质激素对糖尿病大鼠视网膜病变的视网膜厚度影响 鼻侧及颞侧视网膜厚度均表现出了明显的组间差异。与 CON 组相比,DM 组和 scRNA 组视网膜鼻侧及颞侧 4 个象限的视网膜厚度均明显变薄 ($P < 0.01$),而 siGR 组无明显变化 ($P > 0.05$,表 1)。

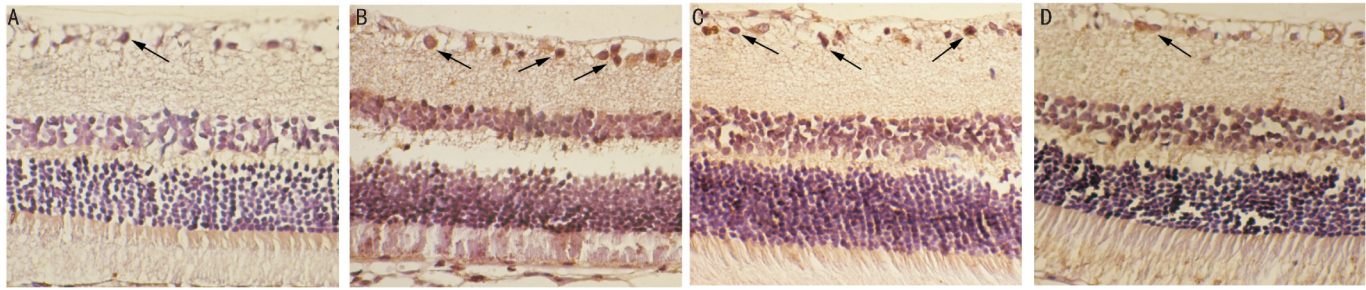


图2 免疫组化检测视网膜 ROCK 蛋白表达(箭头示 ROCK 阳性细胞,ABC 法×200) A:CON 组;B:DM 组;C:scRNA 组;D:siGR 组。

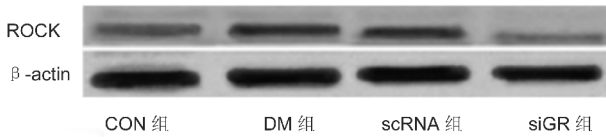


图3 Western-blot 检测视网膜 ROCK 表达。

2.3 糖皮质激素对糖尿病大鼠视网膜病变中视网膜 ROCK 阳性表达的影响 免疫组织化学检测结果显示,与 CON 组相比,DM 组及 scRNA 组视网膜节细胞层及内核层均可见大量 ROCK 阳性神经元,数量多且深染,而 siGR 组着色较 CON 组变化不明显(图 2)。

2.4 Western-blot 检测大鼠视网膜 ROCK 表达结果 CON 组、DM 组、scRNA 组及 siGR 组 ROCK 相对表达量分别为 $(20.1 \pm 4.6)\%$, $(28.6 \pm 3.3)\%$, $(29.1 \pm 4.7)\%$, $(19.6 \pm 3.4)\%$ 。组间总体统计显著 ($F = 184.38, P < 0.01$),与 CON 组相比,DM 组视网膜 ROCK 表达增加 ($t = 41.37, P < 0.01$) 及 scRNA 组视网膜 ROCK 表达增加 ($t = 36.51, P < 0.01$),siGR 组无明显变化 ($t = 8.23, P > 0.05$,图 3)。

3 讨论

糖尿病患者胰岛素分泌不足或受体敏感性下降,不仅导致了高血糖,也导致了细胞能量代谢障碍,产生代谢性应激。代谢性应激与其他应激类似,能激活下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴系统,而且糖尿病状态下糖皮质激素负反馈作用减弱,导致糖皮质激素明显增高,已经成为糖尿病特征性表现之一^[6,7]。长期使用糖皮质激素能引发多种眼部并发症,能损害视网膜神经元^[8,9],但糖皮质激素对 RGC 的影响有待进一步明确。

糖皮质激素长期能诱导细胞凋亡^[10]。离体实验证实,糖皮质激素诱导糖皮质激素反应元件表达,提高凋亡相关因子 Caspase-3 的活性,抑制细胞活力^[11]。神经胶质抗原 2 蛋白聚糖阳性神经祖细胞是脑海马内的重要神经祖细胞,具有增殖分化能力。高浓度糖皮质激素能抑制脑海马的神经胶质抗原 2 蛋白聚糖阳性神经祖细胞的分裂增殖,并诱导细胞凋亡^[12]。我们实验中发现,糖尿病大鼠视网膜 RGC 数量减少、密度降低,鼻侧和颞侧视网膜厚度也变薄。而抑制糖皮质激素受体,拮抗糖皮质激素作用能恢复大鼠视网膜 RGC 的数量和密度,能恢复糖尿病大鼠视网膜的厚度,这提示糖皮质激素可能诱导了视网膜 RGC 凋亡。

ROCK 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,与 RGC 凋亡关系密切。研究发现,糖皮质激素能调节 ROR2/RhoA/ROCK 信号通路^[13,14]。ROCK 蛋白抑制剂 Y-27632 可剂量依赖性促进 RGC 轴突再生,抑制 RGC 凋亡,而且能促进视神经切断大鼠的神经再生^[15]。本研究发现,抑制糖皮质激素

受体,拮抗糖皮质激素能下调 ROCK 在糖尿病大鼠视网膜中的表达。该结果提示,糖皮质激素可能激活了 ROCK 信号通路,导致糖尿病大鼠视网膜神经元缺失。

本研究探讨了糖皮质激素对糖尿病视网膜神经组织病变的影响,证实了糖皮质激素长期增加能导致糖尿病大鼠视网膜神经元缺失,并初步探讨了其中的分子机制,为糖尿病视网膜病变的治疗提供了参考和思路。

参考文献

- 1 Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;103(2): 137-149
- 2 李才锐,孙曙光,姜德咏,等. 银杏叶提取物治疗早期糖尿病视网膜病变观察. *国际眼科杂志* 2006;(6)1:78-81
- 3 Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2012;35(3):556-564
- 4 蒲一民,杨君,杨田. 糖尿病视网膜病变药物治疗的研究进展. *国际眼科杂志* 2011;11(12):2134-2137
- 5 Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, et al. Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci* 2013;14(2): 2559-2572
- 6 Chan O, Inouye K, Vranic M, et al. Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetes is associated with reduced stress responsiveness and decreased pituitary and adrenal sensitivity. *Endocrinology* 2002; 143(5):1761-1768
- 7 温慧华,牛利军. 非糖尿病代谢综合征患者血清脂联素水平与胰岛素抵抗的相关性的研究. *疾病监测与控制* 2012;6(2):65-67
- 8 Arevalo JF. Diabetic macular edema: changing treatment paradigms. *Curr Opin Ophthalmol* 2014;25(6):502-507
- 9 刘向前. 糖皮质激素和细胞因子与海马突触损害的关系及抗炎细胞因子 IL-10 的保护作用. 华中科技大学 2006
- 10 孔晓冬,张建宁,杨树源. 糖皮质激素及其受体与细胞凋亡. *中国现代神经疾病杂志* 2002;2(2):114-117
- 11 于永斌,王林,关立南. 地塞米松和 RU-486 作用人晶状体上皮细胞后糖皮质激素受体和 Caspase-3 的表达变化. *哈尔滨医科大学学报* 2013;47(6):511-516
- 12 于秀军,李奕,台立稳,等. 糖皮质激素对成体海马神经祖细胞的影响. *中国组织工程研究* 2013;17(9):3521-3526
- 13 Yuan Y, Call MK, Yuan Y, et al. Dexamethasone induces cross-linked actin networks in trabecular meshwork cells through noncanonical wnt signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(10):6502-6509
- 14 刘冬. ROCK1 介导的糖皮质激素调节炎症细胞功能的非基因组机制研究. 第三军医大学 2012
- 15 Lingor P, Teusch N, Schwarz K, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan *in vitro* and axonal regeneration in the adult optic nerve *in vivo*. *J Neurochem* 2007;103(1):181-189