

大鼠糖尿病视网膜病与结缔组织生长因子的关联及血栓通的干预作用

邢玉微, 杨洋, 柴雪姣

作者单位:(050000)中国河北省石家庄市第二医院内分泌科
作者简介:邢玉微,女,硕士,主治医师,研究方向:糖尿病微血管病变的机制。

通讯作者:邢玉微. 510835700@qq.com

收稿日期:2015-07-07 修回日期:2015-11-18

Relation of diabetic retinopathy in rats and connective tissue growth factor as well as the intervention effect of Xueshuantong

Yu-Wei Xing, Yang Yang, Xue-Jiao Chai

Department of Endocrinology, the Second Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Yu-Wei Xing. Department of Endocrinology, the Second Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. 510835700@qq.com

Received:2015-07-07 Accepted:2015-11-18

Abstract

• **AIM:** To explore the effects of connective tissue growth factor (CTGF) on diabetic retinopathy (DR) in rats, and the potential protective mechanism of compound xueshuantong to DR.

• **METHODS:** Sprague-Dawley (SD) rats were divided into normal group (group A, $n=12$) and model group ($n=24$). Rats in model group received intraperitoneal injection of streptozotocin (60mg/kg body weight) to get diabetic rats, which were randomly subdivided into diabetic group (group B, $n=12$) and xueshuantong intervention group [group C, 1g/(kg·d), $n=12$]. At 6th and 12th wk of the experiment, 6 rats randomly selected from every group, were executed to get retinal tissue for detecting CTGF-mRNA by electron microscope.

• **RESULTS:** Compared with group A, the content of CTGF-mRNA in retina tissue increased at 6, 12wk in both group B and C ($P<0.05$). Compared with group B, the content of CTGF-mRNA in retina tissue in group C decreased at 6, 12wk ($P<0.05$). Electron microscope showed: in group B, the capillary endothelial cells and mitochondria became swollen; the amount of pinocytosis vesicle increased; the electron density in capillary basement membrane was not homogeneous and nodular thickening phenomenon appeared; compared with group B, the changes in group C were alleviated.

• **CONCLUSION:** CTGF may be involved in the progress of DR in diabetic rats. Compound xueshuantong may exert its protective effect through decreasing the expression of CTGF in the retina of diabetic rats.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; connective tissue growth factor; diabetic rats

Citation: Xing YW, Yang Y, Chai XJ. Relation of diabetic retinopathy in rats and connective tissue growth factor as well as the intervention effect of Xueshuantong. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(12):2060-2062

摘要

目的: 探讨结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)对大鼠糖尿病视网膜病变的影响及复方血栓通可能的保护机制。

方法: SD大鼠36只随机分为对照组(A组, $n=12$)和造模组($n=24$),造模组注射链脲佐菌素(STZ)60mg/kg,造模成功后随即分为糖尿病组(B组, $n=12$)、复方血栓通干预组[C组, 1g/(kg·d), $n=12$],于实验第6、12wk分别在各组处死6只大鼠,RT-PCR方法检测视网膜组织中CTGF mRNA水平。

结果: 与A组相比,B组、C组大鼠视网膜CTGF mRNA于第6、12wk表达均增加(均 $P<0.05$),C组视网膜组织CTGF mRNA表达于第6、12wk均较B组明显下调($P<0.05$);电镜显示B组大鼠视网膜毛细血管内皮细胞肿胀,胞质内线粒体肿胀,吞饮小泡增多,毛细血管基底膜电子密度不均匀,有结节样增厚现象,C组视网膜病变较B组减轻。

结论: CTGF可能参与糖尿病视网膜病变发生,复方血栓通对糖尿病大鼠视网膜具有保护作用,可能通过下调CTGF mRNA产生作用。

关键词: 糖尿病视网膜病变;结缔组织生长因子;糖尿病大鼠

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.12.09

引用: 邢玉微,杨洋,柴雪姣. 大鼠糖尿病视网膜病与结缔组织生长因子的关联及血栓通的干预作用. 国际眼科杂志 2015;15(12):2060-2062

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病微血管病变中最严重的表现,是糖尿病严重的并发症之一,其发病机制较为复杂,除了氧化应激直接损伤^[1]外,研究表明一些生物活性因子(如血管生长因子)的异常表达导致的某些信号通路的异常激活可能在糖尿病视网膜病变的发生、发展过程中起着重要作用。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种近年来发现的细胞因子,它广泛存在于人类多种组织器官中,具有促进血管生成、调节内皮细胞、修复创伤的作用,并与组织纤维化关系密切。近年研究发现CTGF与增生性玻璃体视

表1 实验大鼠体质量及血糖情况

组别	n(只)	体质量(g)		血糖(mmol/L)	
		6wk(n=6)	12wk(n=6)	6wk(n=6)	12wk(n=6)
正常组	12	316.1±22.7	621.1±31.3	4.6±0.4	5.6±1.5
糖尿病组	12	266.4±29.7 ^a	424.3±41.3 ^a	24.3±5.2 ^a	26.2±5.6 ^a
血栓通干预组	12	282.1±25.8 ^a	441.7±46.6 ^a	21.8±7.7 ^a	24.8±7.8 ^a

注:^a $P<0.05$ vs 正常组。

表2 各组大鼠视网膜组织中 CTGF mRNA 的表达

组别	n(只)	CTGF(6wk,n=6)	CTGF(12wk,n=6)
正常组	12	6.05±0.24	6.13±0.21
糖尿病组	12	7.51±4.05 ^a	8.51±6.06 ^a
血栓通干预组	12	7.01±3.15 ^{a,c}	7.26±1.51 ^{a,c}

注:^a $P<0.05$ vs 正常组;^c $P<0.05$ vs 糖尿病组。

网膜病变(proliferative vitreoretinopathy,PVR)的发生发展存在一定关系^[2],但目前关于CTGF与糖尿病视网膜病变的研究较少。鉴于复方血栓通对糖尿病视网膜病变有一定疗效,本实验拟以链脲佐菌素(streptozocin,STZ)诱导的糖尿病大鼠模型建立糖尿病组及复方血栓通干预组,并设立大鼠正常组,通过观察各组大鼠视网膜组织CTGF mRNA的含量及视网膜病理特点,以探索CTGF与糖尿病视网膜病变的关系及复方血栓通对糖尿病视网膜病变可能的保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级SD雄性大鼠36只,约2月龄,体质量约为180~200g,购自上海中国科学院实验动物中心;链脲佐菌素(STZ)购自Sigma公司;复方血栓通超微颗粒由广东众生药业提供,批号Z20090352;引物合成由上海英俊生物技术有限公司合成;实时荧光定量试剂SYBRPremix Ex Taq TM购自TakaRa公司。糖测定采用罗氏公司优越型血糖仪。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备 成年SD雄性大鼠分为3组:正常对照组(A组)、糖尿病组(B组)、复方血栓通干预组(C组),每组12只。B组、C组进行糖尿病模型制备:禁食12h,腹腔注射STZ 65mg/kg,3d后尾静脉取血测血糖 >16.7 mmol/L,造模成功;如 <16.7 mmol/L,再次腹腔注射STZ 65mg/kg,1wk后复测血糖,仍维持该水平以上则造模成功。模型制备时正常对照组在造模时腹腔注射6mL/kg 无菌枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。造模成功后血栓通干预组按照血栓通1g/(kg·d)的剂量以双蒸水溶解后每日上午灌胃,正常对照组及糖尿病组每日给予同等量双蒸水灌胃。

1.2.2 实验流程 实验第6wk末分别在各组随机取6只大鼠,称体质量、测血糖后处死,取视网膜组织进行CTGF mRNA水平测定;剩下6只大鼠于12wk末以同样办法处理,并以电镜观察视网膜组织变化。

1.2.3 RT-PCR 检测视网膜组织中 CTGF mRNA 的表达

按照RNA提取试剂盒说明书提取视网膜组织匀浆总RNA。目的基因及内参 β -actin的引物由上海英俊生物技术有限公司合成。CTGF上游引物:5'-CTAAGACCTGTGCAATGGGC-3',下游引物:5'-CTCAAAGATGTCATTGCCCCC-3'。采用ReverTra AceTM反转录试剂盒,以引物分别从各组视网膜组织中抽提的总

RNA反转录为cDNA,然后以cDNA为模板,利用SYBR Green Real-time PCR试剂盒进行荧光定量PCR,测得阈值循环值(threshold,Ct)值,根据 $\Delta Ct = [Ct(\text{目的基因})] - [Ct(\text{内参基因})]$ 和 $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{研究组})] - [Ct(\text{对照组})]$,并计算出 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,以反映目的基因在研究组中表达水平(相对于对照组)。

1.2.4 电镜观察视网膜组织变化 于12wk后称体质量、测血糖,过量麻醉处死大鼠后取眼球,眼球沿角膜缘剪开,去除角膜、虹膜、晶状体,将眼球后壁固定于电镜固定液中2h,然后取出切1mm×3mm大小带巩膜的视网膜组织放入固定液中,电镜观察视网膜细胞超微结构。

统计学分析:使用SPSS 17.0统计软件包,所有实验数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P<0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 糖尿病组与复方血栓通干预组出现典型三多一少症状,并有少量大鼠出现皮肤溃疡等并发症;糖尿病组及复方血栓通干预大鼠血糖在第6、12wk时均明显高于正常组($P<0.05$),而体质量明显低于正常组($P<0.05$);但血糖、体质量在两组间中第6、12wk时相比无统计学差异($P>0.05$,表1)。

2.2 各组大鼠视网膜组织中 CTGF mRNA 的表达 糖尿病组和血栓通干预组视网膜组织CTGF mRNA水平在第6、12wk时均较正常组明显升高(均 $P<0.05$);同糖尿病组相比,血栓通干预组的视网膜组织CTGF mRNA水平在第6、12wk时均明显下降,差异有统计学意义(均 $P<0.05$,表2)。

2.3 视网膜组织电镜改变 正常组大鼠视网膜毛细血管未见明显病理改变;电镜观察糖尿病组大鼠视网膜毛细血管管腔变形,可见内皮细胞肿胀,吞饮小泡增多,胞质内线粒体肿胀,毛细血管基底膜电子密度不均匀,基底膜有节段性增厚现象;同糖尿病组大鼠相比,血栓通干预组大鼠上述病理改变均有所改善,包括吞饮小泡减少、胞质内线粒体程度减轻等,基底膜部分节段有增厚,毛细血管基底膜电子密度不均匀仍然非常明显(图1)。

3 讨论

糖尿病(diabetes mellitus,DM)是有遗传和环境因素共同作用引起的一种以糖代谢紊乱为主要表现的临床综合征,可引发多种并发症。糖尿病视网膜病变便是其中常见的并发症之一。有研究表明有多种细胞因子可能参与

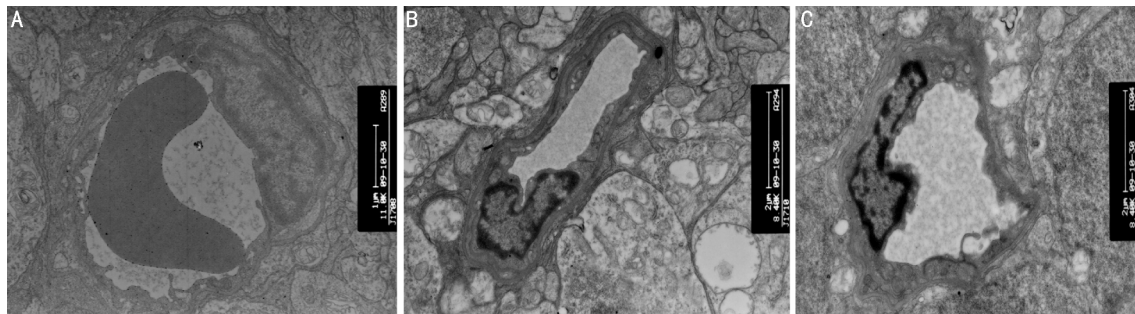


图1 复方血栓通对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜组织的影响 A:正常组大鼠视网膜毛细血管未见明显病理改变(腔内为放大的红细胞);B 糖尿病组:观察糖尿病组大鼠视网膜毛细血管管腔变形,可见内皮细胞肿胀,吞饮小泡增多,胞质内线粒体肿胀,毛细血管基底膜电子密度不均匀表现,基底膜有节段性增厚现象;C 干预组:同糖尿病组大鼠相比,血栓通干预组大鼠上述病理改变均有所改善,包括吞饮小泡减少,胞质内线粒体程度减轻等,基底膜有节段性增厚现象变化为结节样增厚,毛细血管基底膜电子密度不均匀仍然非常明显。

该病理过程,当前糖尿病视网膜病变研究中涉及的细胞因子包括血管内皮生长因子、转化生长因子、胰岛素样生长因子-1、碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子- β 、肿瘤坏死因子- α 、色素上皮衍生因子等^[3]。近年的研究表明,CTGF可能是另一种参与糖尿病视网膜病变的细胞因子。CTGF是1991年由Bradham等首先在人脐静脉内皮细胞的条件培养基中发现的。目前认为CTGF是TGF- β 部分生物学功能的下游介质,它协同TGF- β 参与多种生物学过程,包括促进成纤维细胞在内的多种细胞的有丝分裂及增殖、促进血管内皮细胞的黏附和增生、促进细胞外基质的合成、促进纤维化等^[4]。

CTGF在眼部各组织及房水中均有存在,研究表明CTGF与多种眼部慢性疾病相关。本实验结果表明,糖尿病组大鼠视网膜CTGF mRNA的表达较正常组显著增强,并在第6、12wk时有较好的重复性,提示CTGF参与了糖尿病视网膜病变的进展。糖尿病视网膜病变重要特征之一是视网膜微血管异常,早期表现为毛细血管内皮细胞肿胀、凋亡、微血管瘤形成、血-视网膜屏障破坏;随着病情进展逐渐发展为微血管基底膜增厚、血管闭塞,晚期由于视网膜广泛缺血缺氧导致新生血管生成,但由于这种增生血管脆性大、结构不健全、内皮细胞间隙增大等原因,可引起眼部渗出、出血等病理性改变,从而诱发视网膜渗出、玻璃体出血、新生血管性青光眼等并发症造成视力下降。若不加以治疗,随着病变发展,增生的血管开始出现纤维变性、卷曲、收缩等变化而牵引视网膜,又可导致视网膜脱离等并发症,严重者可致视力丧失。研究认为CTGF在上述病理过程中发挥着重要作用。首先,CTGF参与了新生血管的发生,国外研究表明CTGF在糖尿病视网膜病变的新生血管膜上有过度表达^[5],将重组CTGF作用于鸡的尿囊绒毛膜可导致新生血管形成,而这种血管生成作用可被CTGF抗体所抑制^[6],另有实验表明,CTGF可增加大鼠缺血性皮瓣微血管生成,且皮瓣微血管生成程度与CTGF呈剂量相关^[7]。CTGF促进新生血管生成的机制尚未完全清楚,但研究显示可能与刺激成纤维细胞产生细胞外基质^[8]及促进细胞有丝分裂和增生、趋化细胞、诱导细胞黏附有关。其次,CTGF被认为是导致纤维化的重要因子,在一定条件下能诱发肝、肺、肾纤维化^[9-11]及血管纤维化^[12],故有理由相信过量表达的CTGF对视网膜血管纤维变性也起着重要作用。

复方血栓通作为一种中药制剂,有降低血液黏稠度、抑制血小板聚集等作用,在临床观察中已经发现其对糖尿

病视网膜病变有一定的疗效^[13]。本实验显示,糖尿病大鼠经复方血栓通 $1g/(kg \cdot d)$ 治疗12wk后,视网膜CTGF mRNA的表达明显降低,其病理改变已有所好转,这进一步证明了CTGF与糖尿病视网膜病变的密切关系,并表明降低CTGF可能对糖尿病视网膜病变的治疗具有积极意义,此为新药的研发提供了一个全新的方向。

参考文献

- 1 Sharma S, Saxena S, Srivastav K, et al. Nitric oxide and oxidative stress is associated with severity of diabetic retinopathy and retinal structural alterations. *Clin Exp Ophthalmol* 2015;43(5):429-436
- 2 Abu EA, Imtiaz NM, Kangave D, et al. Osteopontin and other regulators of angiogenesis and fibrogenesis in the vitreous from patients with proliferative vitreoretinal disorders. *Mediators Inflamm* 2012; 2012:493043
- 3 朱丹,金子夜.重视糖尿病视网膜病变相关细胞因子的研究. *中华眼科医学杂志(电子版)* 2014;4(4):190-192
- 4 衡欣,陈悦.增生型糖尿病视网膜病变患者血清中转化生长因子- β 1和结缔组织生长因子水平的变化及意义. *眼科新进展* 2013;33(4):363-365
- 5 Kita T, Hata Y, Kano K, et al. Transforming growth factor- β 2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases: possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor. *Diabetes* 2007;56(1):231-238
- 6 李盛国,谭湘莲,李湘黔.增生性糖尿病视网膜病变玻璃体中结缔组织生长因子的定量分析. *眼科新进展* 2009;29(5):367-369
- 7 Wu DM, Liu Y, Duan WQ, et al. Effects of connective tissue growth factor on angiogenesis of random skin flaps in rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2008;39(1):111-113
- 8 Watanabe D, Takagi H, Suzuma K, et al. Expression of connective tissue growth factor and its potential role in choroidal neovascularization. *Retina* 2005;25(7):911-918
- 9 Yang Z, Sun Z, Liu H, et al. Connective tissue growth factor stimulates the proliferation, migration and differentiation of lung fibroblasts during paraquat-induced pulmonary fibrosis. *Mol Med Rep* 2015;12(1):1091-1097
- 10 Pi L, Robinson PM, Jorgensen M, et al. Connective tissue growth factor and integrin α 6; a new pair of regulators critical for ductular reaction and biliary fibrosis in mice. *Hepatology* 2015;61(2):678-691
- 11 Lu W, Liu S, Zhao Z, et al. The effect of connective tissue growth factor on renal fibrosis and podocyte injury in hypertensive rats. *Ren Fail* 2014;36(9):1420-1427
- 12 汪燕舞,刘红玲,陈智龙.阿托伐他汀对高血压大鼠血管纤维化及结缔组织生长因子的影响. *中国康复* 2010;25(1):6-8
- 13 杜军辉,孙宏志,成静.复方血栓通治疗糖尿病视网膜病变研究进展. *中华临床医师杂志(电子版)* 2012;6(22):7373-7375