

塞来昔布对糖尿病大鼠视网膜缝隙连接蛋白 Cx43 的作用

潘桂萍, 田 朕, 张 勇, 袁 均, 王雅琴

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目 (No. B2016115)

作者单位: (442000) 中国湖北省十堰市太和医院眼科中心 湖北医药学院附属太和医院眼科中心

作者简介: 潘桂萍, 女, 毕业于武汉大学第一临床学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼整形、眼底病。

通讯作者: 潘桂萍. panguiiping03@126.com

收稿日期: 2018-01-23 修回日期: 2018-06-28

Effect of celecoxib on the expression of connexin43 in retina of diabetic rats

Gui-Ping Pan, Zhen Tian, Yong Zhang, Jun Yuan, Ya-Qin Wang

Foundation item: Guiding Project of Scientific Research Program of Hubei Provincial Department of Education (No. B2016115) Ophthalmic Center, Taihe Hospital; Ophthalmic Center, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Gui-Ping Pan. Ophthalmic Center, Taihe Hospital; Ophthalmic Center, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China. panguiiping03@126.com

Received: 2018-01-23 Accepted: 2018-06-28

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of connexin43 (Cx43) in retina of Sprague Dawley (SD) rats with diabetes mellitus (DM), and the effects of celecoxib, inhibitor of cyclooxygenase 2 (COX-2), on expression of Cx43 in retina of them.

• **METHODS:** DM was induced in SD rats by the administration of streptozotocin (STZ). DM rats were divided into two groups: COX-2 treated group (CTG, $n=15$), and diabetic group (DG, $n=15$). Normal control group (NCG) consisted of 15 rats was given. Three months' treatment was given after DM development. Sample of retina were made at the end of 3mo. Expression of Cx43 in retina were investigated by immunohistochemistry. Expression of Cx43 mRNA in retina were analyzed by RT-PCR.

• **RESULTS:** Cx43 was expressed in the ganglion cell layer, the nerve fiber layer, the inner plexiform layer, and the pigment epithelium layer of retina with a different degree. Computer image analysis showed that celecoxib

had elevated the expression of Cx43 in experimental diabetic rats, gray values were: 0.233 ± 0.025 , 0.124 ± 0.014 , 0.197 ± 0.021 ; multiple comparisons found statistically significant difference ($P < 0.05$). Celecoxib had raised the expression of Cx43 mRNA in diabetic rats with real time quantitative PCR. Relative value was 0.635 ± 0.084 , 0.110 ± 0.061 , 0.367 ± 0.074 , multiple comparisons found statistically significant difference ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Expression of Cx43 decreases in retina of SD rats with DM. Celecoxib can relieve the decrease of Cx43 expression in retina of them.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; celecoxib; Cx43

Citation: Pan GP, Tian Z, Zhang Y, et al. Effect of celecoxib on the expression of connexin43 in retina of diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(8):1389-1392

摘要

目的: 观察 COX-2 (cyclooxygenase, COX-2) 抑制剂 (塞来昔布) 对糖尿病大鼠视网膜缝隙连接蛋白 Cx43 (connexin43, Cx43) 表达的影响。

方法: 选取 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 45 只, 随机分为 3 组: 对照组、糖尿病组、用药组, 每组各 15 只, 采用 STZ 腹腔注射造模的方式进行造模, 快速血糖仪监测各组大鼠空腹血糖, 正常对照组、糖尿病模型组、用药组分别用生理盐水、生理盐水、塞来昔布溶液进行灌胃, 3mo 后采用过量麻醉法处死大鼠, 制备视网膜标本, 采用免疫组化法观察 Cx43 蛋白, 实时定量 PCR 技术检测大鼠视网膜 Cx43 mRNA 的相对表达量, 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 对各组检测结果进行比较。

结果: 免疫组织化学染色缝隙连接蛋白 Cx43 在视网膜大鼠的神经节细胞层、神经纤维层、内丛状层、色素上皮层、内皮细胞层可见表达不同程度点状、片状表达, 计算机图像灰度分析发现塞来昔布对糖尿病大鼠视网膜 Cx43 表达有促进作用, 正常对照组、糖尿病组、用药组灰度值分别是 0.233 ± 0.025 、 0.124 ± 0.014 、 0.197 ± 0.021 , 两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 实时定量 PCR 检测发现塞来昔布促进糖尿病大鼠 Cx43 mRNA 表达量增加, 正常对照组、糖尿病组、用药组相对表达量分别是 0.635 ± 0.084 、 0.110 ± 0.061 、 0.367 ± 0.074 , 两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 缝隙连接蛋白 Cx43 在糖尿病大鼠视网膜中表达减少, 塞来昔布可以减缓糖尿病大鼠视网膜缝隙连接蛋白 Cx43 表达的减少。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 塞来昔布; Cx43

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.8.07

引用:潘桂萍,田朕,张勇,等.塞来昔布对糖尿病大鼠视网膜缝隙连接蛋白Cx43的作用.国际眼科杂志2018;18(8):1389-1392

0 引言

随着人们生活水平的提高,饮食习惯及生活环境的改变,我国糖尿病发病率逐年提高,糖尿病视网膜病变的患病率也不断上升,流行病学研究发现^[1],2型糖尿病发病年轻化,病程达20a的患者发生视网膜病变的概率高达80%,因此,糖尿病视网膜病变发病机制的研究成为了学者及眼科医生研究的热点。近年研究^[2]发现糖尿病视网膜病变是一种慢性炎症,非甾体抗炎药可以抑制糖尿病视网膜病变的发展,非甾体抗炎药是通过抑制环氧合酶实现抗炎作用,环氧合酶是前列腺素合成的限速酶,能够通过催化花生四烯酸生成前列腺素,介导炎症反应。除此之外,有学者研究发现选择性COX-2抑制剂塞来昔布能够阻断糖尿病大鼠视网膜内前列腺素E(PGE)生成,从而抑制糖尿病视网膜病变的发生发展^[3]。缝隙连接蛋白Cx43在血-视网膜屏障中发挥重要的作用,是维持血-视网膜屏障结构及功能的重要蛋白,与维持视网膜正常通透性密切相关。本实验研究塞来昔布对糖尿病大鼠视网膜缝隙连接蛋白Cx43的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 选取45只SPF级雄性健康SD大鼠,体质量200~220g,饲养于湖北医药学院实验动物中心,单笼喂养,按照计算机数字随机分配法,随机分为正常对照组、糖尿病模型组、塞来昔布用药组,每组各15只。本实验符合动物保护条例。

1.2 方法

1.2.1 模型的制备 采用1%链脲佐菌素(STZ)50mg/(kg·d)腹腔注射造模,1wk后应用微量快速血糖仪(强生公司)测量大鼠空腹血糖,血糖均 ≥ 16.7 mmol/L,隔日再次监测血糖仍 ≥ 16.7 mmol/L,出现多饮、多食、多尿,皮毛无光泽,消瘦为造模成功,不成功的再次腹腔注射1%STZ 50mg/(kg·d)1次,30只SD大鼠均造模成功。造模成功后用药组给予塞来昔布溶液40mL/kg,1mg/mL空腹灌胃,1次/d,正常对照组、糖尿病模型组大鼠每日空腹等量生理盐水灌胃,所用药物均连续给药3mo,每周监测SD大鼠血糖、体质量。

1.2.2 大鼠视网膜标本制备 造模成功3mo后的大鼠给予体积分数为10%水合氯醛(0.5g/kg)腹腔内注射,处死大鼠,迅速摘除大鼠的双眼球,1只眼球在显微镜下迅速顿性分离视网膜,放于液氮中保存,另1只眼球用甲醛固定,常规石蜡包埋,用于视网膜组织化学染色,制作切片,厚度为4 μ m。

1.2.3 视网膜免疫组织化学染色 随机取组织切片,烤片后脱蜡至水,洗片后热修复,血清工作液封闭,一抗为兔抗鼠Cx43相关抗原mAb单克隆抗体(工作浓度为1:200,武汉博士德公司),4 $^{\circ}$ C过夜,复温后冲洗几次,二抗为生物素化羊抗兔IgG,室温孵育15min,冲洗后滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育15min,DAB染色后(DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司)经苏木精

复染,盐酸酒精分化;脱水、透明,中性树脂封片,光镜下观察,Cx43在视网膜中的阳性表达为黄褐色。每组选取3张结构完整的视网膜切片,每张切片随机选取5个视野($\times 200$),用Image-Pr. Plus 6.0图像处理分析软件分析灰度值,取平均值。

1.2.4 Real-time PCR法检测视网膜Cx43 mRNA相对表达量 PCR引物采用Primer EXPRESS 2.0软件设定,由上海生物工程公司合成,引物序列见表1;造模成功3mo后,分别选取15只每组-80 $^{\circ}$ C保存的大鼠视网膜,提取视网膜中的总RNA,紫外分光光度剂测定总RNA的浓度和纯度,逆转录合成cDNA,以 β -actin为内参基因,在冰上依次加入2 \times SYBR Green PCR buffer,5 \times Rox,sepcial primer(5pmol),cDNA和水,50 $^{\circ}$ C 2min,95 $^{\circ}$ C 10min,95 $^{\circ}$ C 15s;60 $^{\circ}$ C 1min,共45个循环,循环结束时,收集荧光信号,每组样本重复3次,所得结果取平均值。采用ABI7000 Real Time PCR SDS软件检测荧光强度。在扩增完毕后进行溶解曲线分析,对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析特异性。在反转录过程分别不加反转录酶和cDNA的样品进行PCR扩增作为阴性对照,每组设3个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组视网膜Cx43 mRNA的相对表达量。

统计学分析:采用SPSS13.0统计软件进行分析。采用单因素方差分析和LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型建立情况 第一次注射1% STZ 50mg/(kg·d)后,有21只大鼠监测空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L,9只大鼠再次注射1% STZ 50mg/(kg·d)后空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L,均建模成功,SD大鼠出现明显的多饮、多食、多尿、毛色萎黄,体质量减轻,3mo后糖尿病大鼠体质量减轻 30 ± 5 g,糖尿病组大鼠和用药组大鼠血糖及体质量变化无统计学意义($P > 0.05$);正常组大鼠饮食、大小便正常,毛色顺滑,3mo后体质量增加 38 ± 8 g,平均空腹血糖为 6.7 ± 2.9 mmol/L。

2.2 各组大鼠视网膜Cx43的表达 通过免疫组织化学,在正常对照组、糖尿病组、用药组的视网膜血管内皮细胞可见棕黄色染色,神经节细胞层、神经纤维层、内丛状层、色素上皮层可见不同程度点状、片状表达。免疫组织化学染色结果进行计算机图像分析示:正常对照组Cx43阳性反应在血管内皮细胞、神经节细胞层、神经纤维层、内丛状层、色素上皮层较强,多表现为棕黄色;糖尿病组Cx43阳性反应较正常对照组明显减弱,内丛状层、颗粒细胞层可见散在不同棕黄色点状、片状染色,余染色层呈淡棕黄色;用药组Cx43阳性反应与糖尿病组相似,然而在內丛状层、颗粒层、神经上皮层、色素上皮层点状、片状染色明显增多(图1)。经计算机图像测定,正常组、糖尿病组、用药组大鼠视网膜Cx43蛋白表达量分别为 0.233 ± 0.025 、 0.124 ± 0.014 、 0.197 ± 0.021 。糖尿病组与正常对照组、用药组与正常组、糖尿病组与用药组比较,差异均有统计学意义($t = 8.65, 2.4, 6.4$,均 $P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠视网膜Cx43 mRNA的表达 实验得到的 β -actin和Cx43 mRNA得到的溶解曲线存在单一溶解峰,溶解温度分别为81.2 $^{\circ}$ C、86.4 $^{\circ}$ C。PCR检测视网膜Cx43 mRNA的扩增曲线见图2。造模成功3mo后糖尿病组大

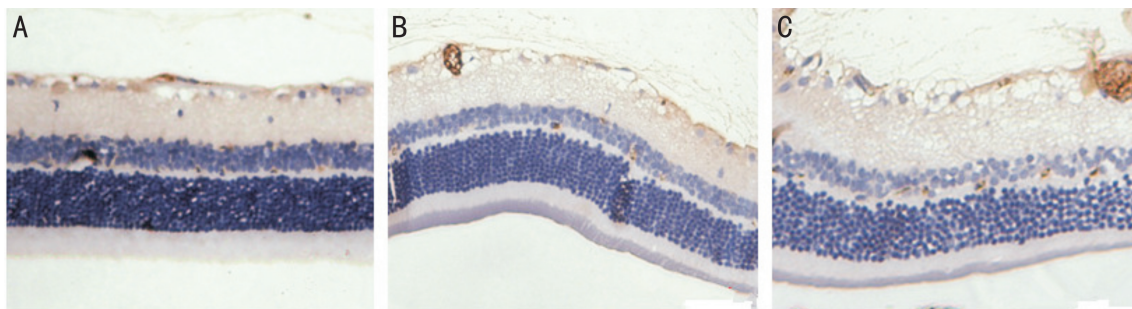


图1 大鼠视网膜中 Cx43 表达的免疫组织化学染色 (×200) A: 正常组; B: 糖尿病组; C: 用药组。

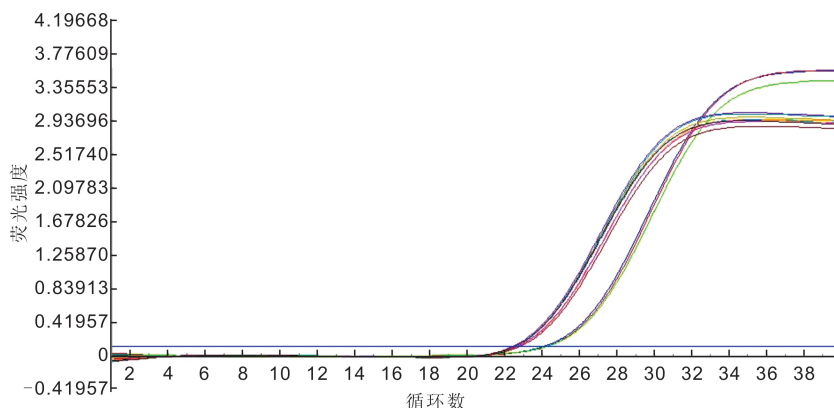


图2 实时荧光定量 PCR 视网膜中 Cx43 mRNA 扩增曲线。

表1 实时定量 PCR 引物序列

| 基因 | 正义链 | 反义链 | 长度 (bp) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| β -actin | 5'-CGTTGACATCCGTAAGACCTC-3' | 3'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-5' | 110 |
| Cx43 | 5'-GAACACGGCAAGGTGAGGAT-3' | 3'-ATGGCTGGAGTTCATGTCAC-5' | 129 |

鼠和用药组大鼠 Cx43 mRNA 的相对表达量 (0.110 ± 0.061 , 0.367 ± 0.074) 与正常对照组 (0.635 ± 0.084) 相比明显减少, 差异均有统计学意义 ($t = 17.85, 8.75$, 均 $P < 0.01$)。用药组大鼠视网膜中 Cx43 mRNA 相对表达量与同时期糖尿病大鼠相比较均有所增加, 差异均有统计学意义 ($t = 94.48, P < 0.01$)。

3 讨论

STZ 腹腔注射, 通过自由基损伤 β 细胞, 使 β 细胞功能受损, 胰岛素合成减少, 诱导的糖尿病模型是目前公认的简单易行的造模方式。

缝隙连接是直接连接相邻细胞质的细胞间通道, 介导缝隙连接细胞间通讯, 由连接蛋白构成, 连接蛋白根据分子量命名。Cx43 是 Cx 家族最重要的成员, 在视网膜的色素上皮层、颗粒层、神经节细胞层均可以见到表达^[4], 本实验发现 Cx43 在大鼠视网膜色素上皮层、血管细胞层大量表达, 神经节细胞层、神经纤维层呈片状表达, 呈棕色染色, 内丛状层可见斑点状棕色染色, 通过计算机图像采集分析, 单位视网膜面积内的阳性表达吸光度的半定量分析, 我们发现, 糖尿病组 Cx43 蛋白表达明显低于正常组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明在这些部位细胞间的信号通道连接紧密, 缝隙连接蛋白 Cx43 的磷酸化与去磷酸化对 GJ (gap junction, GJ) 通道有着重要的影响。高血糖可以促进 Cx43 磷酸化后降解, 引起缝隙连接的改变, 引起视网膜周细胞、内皮细胞、Müller 等细胞内环境都发生改变, 从而破坏了血-视网膜屏障。Tien 等^[5]通过细胞培

养发现, 高糖环境下, 细胞膜上 Cx43 表达下降可直接抑制细胞间信号的转导, 导致细胞结构的改变, 血-视网膜屏障破坏, 诱发视网膜微血管病变, 并且 Tien 等^[6]通过检测人的血管中缝隙连接蛋白 Cx43, 也发现患有糖尿病视网膜膜病变的患者 Cx43 表达下降, 我们通过免疫组织化学法和实时定量 PCR 也发现在糖尿病大鼠视网膜中的 Cx43 表达明显降低 ($P < 0.05$), 与本实验结果一致。

炎症反应在糖尿病视网膜病变发病机制的作用是近 10a 的研究热点, 目前认为炎症因子与脂肪内分泌、氧化、免疫系统相互作用引起了胰岛素抵抗和 β 细胞结构与功能障碍, 最后导致了糖尿病。COX-2 是花生四烯酸代谢的一种重要酶, 是重要的炎性因子。孙国玲等^[7]研究表明, COX-2 与糖尿病视网膜病变有重要的相关性, COX-2 在炎性物质的刺激下大量表达, 催化花生四烯酸成为前列腺素, 后者常常引起血管渗透性增加; EL-Asrar 等^[8]研究发现 COX-2 及其产物在糖尿病视网膜病变的患者纤维血管膜中可以检测到。Schoenberger 等^[9]研究发现 PEDF 在糖尿病视网膜病变的患者中表达减少, 其减少程度与糖尿病黄斑水肿及增殖型糖尿病视网膜病变的严重程度呈正相关。Zheng 等^[3]也研究发现, NSAIDs 可以抑制糖尿病视网膜膜病变的发展, 以上均表明 COX-2 抑制剂可以抑制糖尿病视网膜膜病变的发生发展。本实验通过免疫组化和实时定量 PCR 发现, 塞来昔布用药组糖尿病大鼠缝隙连接蛋白 Cx43 表达较糖尿病组大鼠增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 炎性因子能直接损伤视网膜毛细血管内皮细

胞,从而导致血-视网膜屏障的破坏,缝隙连接蛋白 Cx43 是与血-视网膜屏障联系紧密的缝隙连接蛋白之一,其介导的细胞间隙的通讯功能是维持血-视网膜屏障结构和功能正常的重要保障,与视网膜正常血管通透性的维持密切相关^[10];塞来昔布可以通过控制炎症减少视网膜毛细血管内皮细胞的损伤,从而减少血-视网膜屏障的破坏,同时塞来昔布可以通过调控缝隙连接蛋白 Cx43 的表达,而保持微血管内皮细胞间有序的组织及结构的完整性不受损或消失,我们的研究进一步表明塞来昔布对糖尿病视网膜病变的作用可以通过缝隙连接蛋白途径。除此之外,有研究发现 Cx43 与炎症状态的形成有着紧密的关系,在神经系统中,Cx43 的表达可以显著下调炎症反应^[11-12]。

塞来昔布可以通过抑制 COX-2 途径控制炎症反应,抑制糖尿病大鼠视网膜炎性因子的表达,减少缝隙连接蛋白 Cx43 的磷酸化,Cx43 又可以再下调炎症反应,对早期糖尿病视网膜病变发挥作用,为糖尿病视网膜病变的发病机制提供了新的思路。因糖尿病视网膜病变的发病机制是一个复杂的多因素的过程,通过单因子的角度进行研究可能均有一定的局限性,需进一步的探索。

参考文献

- 1 Eisma JH, Dulle JE, Fort PE. Current knowledge on diabetic retinopathy from human donor tissues. *World J Diabetes* 2015;6(2):312-320
- 2 Wan TT, Li XF, Sun YM, et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *Biomed Pharmacother* 2015;74(3):145-147
- 3 Zheng L, Howell SJ, Hatala DA, et al. Salicylate-based anti-inflammatory drugs inhibit the early lesion of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2007;56(2):337-345

- 4 Bobble MW, Roy S, Trodeau K, et al. Reduced connexin 43 expression and its effect on the development of vascular lesions in retinas of diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(7):3758-3763
- 5 Tien T, Barrette KF, Chronopoulos A, et al. High glucose alters Cx43 expression and gapjunction intercellular communication in retinal müller cells; promotes Müller cell and peficyte apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(7):4327-4337
- 6 Tien T, Muto T, Zhang J, et al. Association of reduced Connexin 43 expression with retinal vascular lesions in human diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 2016;146:103-106
- 7 孙国玲,李筱荣,孙靖. 环氧酶-2 在早期糖尿病大鼠视网膜中表达的研究. *天津医科大学学报* 2008;14(3):335-338
- 8 EL-Asrar AM, Missotten L, Geboes K. Expression of cyclooxygenase-2 and downstream enzymes in diabetic fibrovascular epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* 2008;92(11):1534-1539
- 9 Schoenberger SD, Kim SJ, Sheng J, et al. Increased prostaglandin E2 (PGE2) levels in proliferative diabetic retinopathy. and correlation with VEGF and inflammatory cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(3):5906-5911
- 10 Tien T, Muto T, Barrette K, et al. Downregulation of Connexin 43 promotes vascular cell loss and excess permeability associated with the development of vascular lesions in the diabetic retina. *Mol Vis* 2014;20(12):732-741
- 11 Li K, Yao J, Shi L, et al. Reciprocal regulation between proinflammatory cytokine-induced inducible NO synthase (iNOS) and connexin43 in bladder smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2011;286(48):41552-41562
- 12 Tsuchida S, Arai Y, Kishida T, et al. Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *J Orthop Res* 2013;31(4):525-530