

玻璃体腔注射抗氧化剂 NAC 对早期糖尿病大鼠视网膜的保护作用

陈玲, 刘彦芳, 林萍

引用: 陈玲, 刘彦芳, 林萍. 玻璃体腔注射抗氧化剂 NAC 对早期糖尿病大鼠视网膜的保护作用. 国际眼科杂志 2020;20(3): 438-441

作者单位: (710004) 中国陕西省西安市儿童医院眼科

作者简介: 陈玲, 毕业于西安交通大学医学院, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变、小儿斜弱视及屈光不正的诊治。

通讯作者: 刘彦芳, 毕业于西安交通大学医学院, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 小儿斜弱视的诊治. duckling911@163.com

收稿日期: 2019-06-19 修回日期: 2020-02-18

摘要

目的: 探讨抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对早期糖尿病大鼠视网膜保护作用的机制。

方法: 健康成年雄性 SD 大鼠 30 只, 按照随机分配的原则分为正常对照组 (CON 组, $n=10$), 糖尿病组 (DM 组, $n=20$)。DM 组禁食 12h 后, 按照 60mg/kg 体质量剂量一次性左下腹腔注射 1% 链脲佐菌素 (STZ) 溶液, CON 组注入等量的柠檬酸缓冲溶液。用药 72h 后, 鼠尾静脉取血检测血糖, $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 者定为糖尿病模型动物。成模大鼠随机分为糖尿病对照组 (D 组) 和 NAC 治疗组 (N 组)。模型建立后, N 组大鼠每周通过玻璃体腔注射 $4\mu\text{L}$ $1.6\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 NAC, CON 组、D 组大鼠则给予玻璃体腔注射 $4\mu\text{L}$ 0.01mmol/L 的磷酸缓冲盐溶液 (pbs) 不限饮食水, 分组喂养。每周记录各组大鼠体质量及血糖。糖尿病成模后 2mo, 处死实验动物, 通过 HE 染色法, 检测各组大鼠视网膜内核层厚度; 通过免疫荧光法, 检测各组大鼠视网膜神经节细胞数量及视网膜中色素上皮衍生因子 (PEDF) 水平。

结果: N 组视网膜内核层厚度较 D 组厚度增加 ($P<0.01$), 与 CON 组厚度无差异 ($P>0.05$)。与 CON 组相比, D 组视网膜神经节细胞数量减少 ($P<0.01$), N 组视网膜神经节细胞略减少 ($P>0.05$)。D 组视网膜神经节细胞较 N 组减少 ($P<0.01$)。与 CON 组相比, D 组 PEDF 表达下降 ($P<0.01$), N 组 PEDF 表达略下降 ($P>0.05$)。D 组 PEDF 表达较 N 组下降 ($P<0.01$)。

结论: 抗氧化剂 NAC 对早期糖尿病大鼠视网膜组织有保护作用的机制可能是通过上调视网膜中 PEDF 水平。

关键词: 抗氧化剂; N-乙酰半胱氨酸; 玻璃体腔注射; 色素上皮衍生因子

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.3.08

Protective effect of intravitreal injection of antioxidant NAC on retina in early diabetic rats

Ling Chen, Yan-Fang Liu, Ping Lin

Department of Ophthalmology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Yan-Fang Liu. Department of Ophthalmology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. duckling911@163.com

Received: 2019-06-19 Accepted: 2020-02-18

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) on retina in early diabetic rats.

• **METHODS:** Thirty healthy adult male SD rats were randomly assigned to the normal control group (CON group, $n=10$) and the diabetes group (DM group, $n=20$). After fasting for 12h, the DM group was injected with 1% streptozotocin (STZ) solution, according to 60mg/kg disposable left lower abdominal injection. After 72h, blood was taken from the rat tail vein to detect blood glucose, diabetic model animals were defined as $\geq 16.7\text{mmol/L}$. Model rats were randomly divided into diabetes control group (group D) and NAC treatment group (group N). After the model was established, N group of rats were injected with $4\mu\text{L}$ $1.6\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NAC through the vitreous cavity every week. Rats in CON group and D group were injected with $4\mu\text{L}$ 0.01mmol/L phosphate buffer saline. All the rats no diet water, group feeding. Body mass and blood glucose were recorded weekly. After the diabetes was modeled, 2mo killed the experimental animals. The thickness of the inner layer of the retina of rats in each group was determined by HE staining. The number of retinal ganglion cells and the level of pigment epithelial derived factor in the retina were measured by immunofluorescence.

• **RESULTS:** The thickness of retinal kernel layer increased in group N compared with group D ($P<0.01$), and there was no difference between group CON and group ($P>0.05$). Compared with CON group, the number of retinal ganglion cells decreased in group D ($P<0.01$), and decreased slightly in group N ($P>0.05$). Retinal ganglion cells decreased in group D compared with group N ($P<0.01$). Compared with CON group, PEDF expression decreased in group D ($P<0.01$), and decreased slightly in

group N ($P>0.05$). The expression of PEDF in group D decreased compared with group N ($P<0.01$).

• **CONCLUSION:** The protective effect of antioxidant NAC on retinal tissue in early diabetic rats may be due to the up-regulation of PEDF levels in the retina.

• **KEYWORDS:** antioxidant; N - acetylcysteine; vitreous injection; pigment epithelial-derived factor

Citation: Chen L, Liu YF, Lin P. Protective effect of intravitreal injection of antioxidant NAC on retina in early diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020;20(3):438-441

0 引言

随着生活水平的提高,糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者在全世界快速增加。国际糖尿病协会发声,糖尿病的发展将面临失控,没有哪一个国家完全有能力遏制糖尿病的发展。糖尿病视网膜病变(diabetic Retinopathy, DR)是糖尿病最为常见和严重的神经及微血管并发症之一,成为全球性四大主要致盲原因之一^[1-2]。前期研究表明,抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对早期糖尿病大鼠视网膜有保护作用^[3-4],其可以抑制糖尿病时活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的生成增加,下调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)在视网膜血管的表达^[4]。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)作为神经营养因子,在眼部主要由视网膜色素上皮细胞合成,在 DR 的进程中作用广泛。本实验拟在既往研究的基础上,观察抗氧化剂 NAC 对早期糖尿病大鼠视网膜内核层厚度、神经节细胞数量及视网膜中 PEDF 表达情况的影响,探讨 NAC 对视网膜保护作用的机制,为更早期的 DR 进行有效治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年雄性 SD 大鼠 30 只(由西安交通大学实验动物中心提供,眼部检查无异常,体质量约 180~220g,实验动物饲养管理室内有通风换气设备,保持空气清新,饲料为西安交通大学实验动物中心供应的标准饲料。按照随机分配的原则分为正常对照组(normal control group, CON 组, $n=10$)和糖尿病组(DM 组, $n=20$)。糖尿病组(DM 组)禁食 12h 后,按照 60mg/kg 体质量剂量一次性左下腹腔注射 10g/L 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)溶液,正常对照组(CON 组)注入等量的柠檬酸缓冲溶液。用药 72h 后,鼠尾静脉取血检测血糖, ≥ 16.7 mmol/L 者定为糖尿病模型动物。成模大鼠随机分为糖尿病对照组(D 组, $n=8$ 只)和 NAC 治疗组(N 组, $n=8$ 只)。模型建立后, N 组大鼠每周通过玻璃体腔注射 4 μ L 1.6 μ g/ μ L 的 NAC, CON 组、D 组大鼠则给予玻璃体腔注射 4 μ L 0.01mmol/L 的磷酸缓冲盐溶液(PBS),不限饮食水,分组喂养。实验动物在麻醉下进行所有手术(10%水合氯醛腹腔注射过量麻醉大鼠),并尽一切努力最大限度减少其疼痛、痛苦和死亡,符合实验动物伦理要求。

兔抗大鼠 Thy-1.1 多克隆抗体检测视网膜神经节细胞数量,购于北京博奥森,工作浓度 1:50 兔抗大鼠 PEDF 多克隆抗体购于上海研晶生物,工作浓度 1:50; FITC 标记

山羊抗兔 IgG 购于北京博奥森,工作浓度 1:200。图像信号采集与分析系统:德国 Leica 公司(q550cw); 荧光显微镜,日本 OLYMPAS BX51; 荧光图像采集系统:美国 QE SPOT INSIGHT。

1.2 方法

1.2.1 取材 糖尿病大鼠成模 2mo 后,10%水合氯醛腹腔注射过量麻醉大鼠,迅速摘除眼球,在眼球角膜距角巩缘 0.5mm 针刺定位,将眼球固定脱水后常规包埋,根据针刺定位点过视神经垂直于子午线平面切成 5 μ m 厚的切片。

1.2.2 HE 及免疫荧光染色 每只眼选择 6 张切片,每张切片随机选取视网膜中央部、中周部、周边部共 5 个视野,6 张切片测量平均值作为 1 个样本。采用计算机图像分析系统观察视网膜结构改变,并测量内核层厚度,并以此作为视网膜组织损伤的判断指标。采用免疫荧光法,按照说明书,结果判定标准:阳性细胞胞浆为荧光绿。

统计学分析:应用 SPSS18.0 统计软件包对采集数据进行统计学分析,数据结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐者采用单因素方差分析,方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠视网膜内核层厚度 各组大鼠视网膜内核层厚度测定显示, CON 组、D 组、N 组视网膜内核层厚度(32.062 \pm 1.543、21.207 \pm 3.603、31.187 \pm 1.004 μ m)比较,差异有统计学意义($F=53.322, P<0.001$,图 1)。D 组视网膜内核层厚度较 CON 组下降,差异有统计学意义($P<0.01$), N 组视网膜内核层厚度较 CON 组略下降,差异无统计学意义($P>0.05$)。D 组视网膜内核层厚度较 N 组下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠视网膜神经节细胞数量 各组大鼠视网膜神经节细胞数量检测表明, CON 组、D 组、N 组视网膜神经节细胞数量(25.25 \pm 4.268、5.13 \pm 1.808、23.63 \pm 3.159 个)比较,差异有统计学意义($F=95.334, P<0.001$,图 2)。D 组视网膜神经节细胞数量较 CON 组减少,差异有统计学意义($P<0.01$); N 组视网膜神经节细胞数量较 CON 组略下降,差异无统计学意义($P>0.05$)。D 组视网膜神经节细胞数量较 N 组下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 免疫荧光法观察视网膜各层 PEDF 表达情况 PEDF 阳性反应主要分布于视网膜内核层及神经节细胞层。糖尿病 2mo 后,大鼠视网膜中 PEDF 平均光密度的测定表明, CON 组、D 组、N 组视网膜中 PEDF 平均光密度值(1.363 \pm 0.190、0.688 \pm 0.119、1.304 \pm 0.218)比较,差异有统计学意义($F=34.403, P<0.001$,图 3)。D 组 PEDF 表达较 CON 组下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。N 组 PEDF 表达较 CON 组略下降,差异无统计学意义($P>0.05$)。D 组 PEDF 表达较 N 组下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

DR 是糖尿病最为常见和严重的神经及微血管并发症之一,也是影响患者生活质量的主要原因。PEDF 是目前发现的最重要的新生血管抑制因子^[5],属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的一种糖蛋白,在眼部主要由视网膜色素上皮细胞合成,1987 年 Tombrn-Tink 等^[6]从胎儿视网膜色

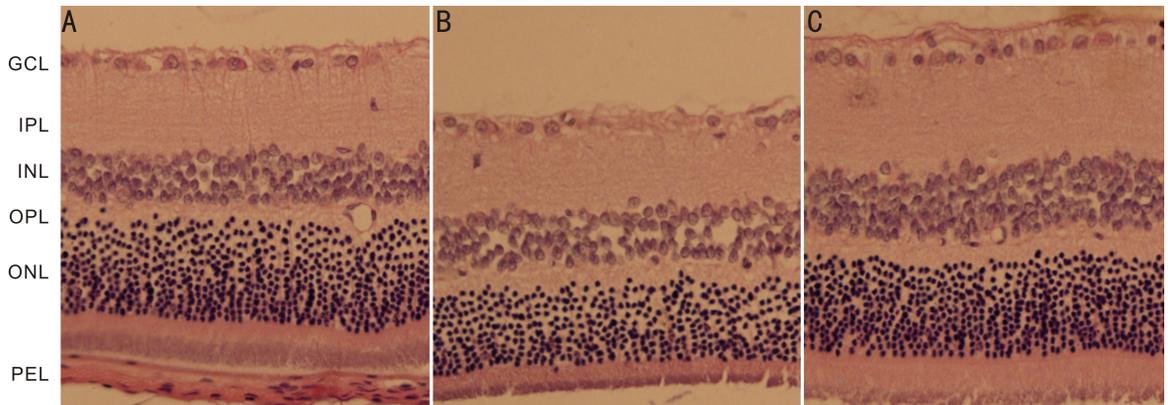


图1 各组大鼠视网膜组织的形态学改变(×400) A:CON组;B:D组;C:N组;GCL;神经节细胞层;IPL;内网层;INL;内核层;OPL;外网层;ONL;外核层;PEL;色素上皮层。

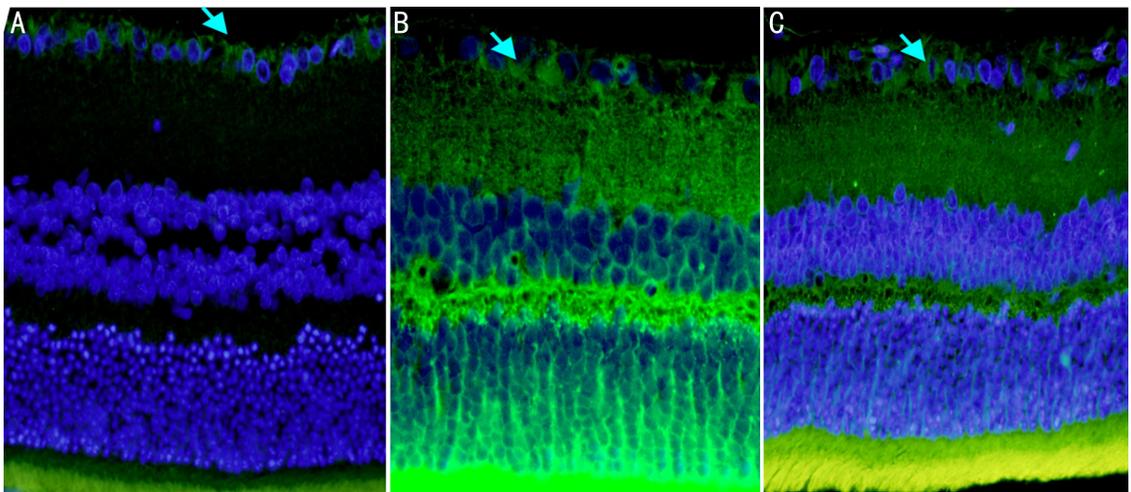


图2 免疫荧光法检测各组大鼠视网膜神经节细胞(×400) A:CON组;B:D组;C:N组;图中箭头所指为显色的视网膜神经节细胞的胞膜及树突。

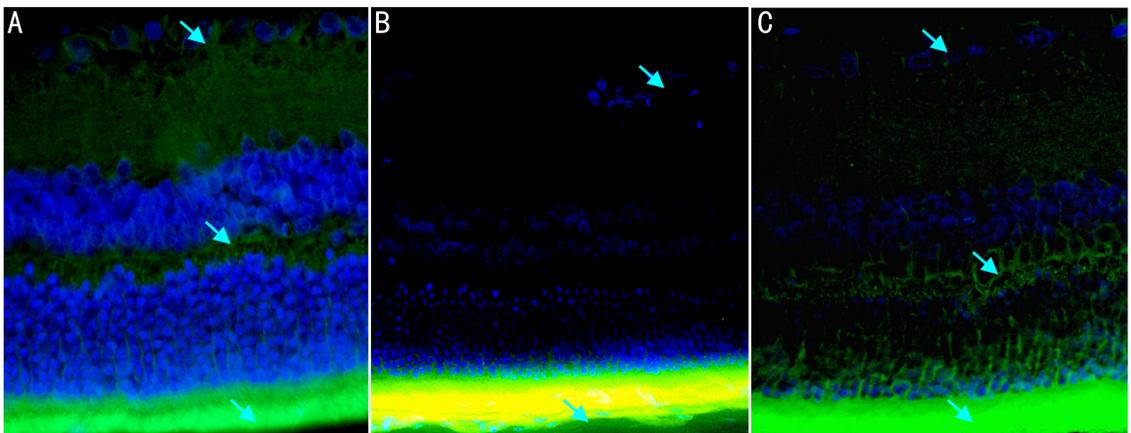


图3 各组大鼠视网膜中 PEDF 表达情况(×400) A:CON组;B:D组;C:N组;图中箭头所指为 PEDF 表达情况。

素上皮细胞培养液中第一次发现。Ogata 等^[7]检测糖尿病患者玻璃体及房水中 PEDF 含量较正常人明显降低,而同时 VEGF 含量增加,提示 PEDF 除了是一种神经营养因子外还可以抑制新生血管的生成。作用机制主要有:在 DR 早期通过抑制 NADPH 氧化酶来发挥抗氧化保护作用^[8];上调 FasL,促进活化的血管内皮细胞凋亡等^[9]。糖尿病慢性并发症的统一机制学说认为:引起糖尿病各并发症的四条经典通路,即多元醇通路激活、晚期糖基化终末产物(advanced glycosylation end products, AGEs)增加、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 激活及氨基己糖途径,实质上都是高糖诱导过氧化物过多表达的结果,氧化应激是糖尿

病并发症发生、发展的重要因素^[10]。因而抗氧化治疗也逐渐被人们所关注。研究表明,腺病毒介导的 PEDF 以玻璃体腔注射的方式转染视网膜组织后,视网膜内核层较前增厚,视网膜神经节细胞密度增高,提示外源性 PEDF 能够保护视神经损伤后的视网膜神经节细胞,促进视网膜神经节细胞损伤修复,具有神经保护作用^[11]。近期也有研究发现,新型 PEDF 小肽可以减少脉络膜及视网膜新生血管生成^[12]。本实验中,糖尿病大鼠 2mo 时,视网膜内核层变薄及视网膜神经节细胞数量减少,从而导致视网膜缺血缺氧可能与视网膜组织中 PEDF 水平减少有关。

NAC 是一种含有巯基的抗氧化剂,在以往主要用于

呼吸系统疾病的治疗。近年研究发现,其不但对于呼吸系统疾病起重要作用,同时在干细胞保护及抗肿瘤的过程中也有重要的保护作用。大量研究发现,其具有抗氧化、减少活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)生成、清除自由基、调节细胞代谢活性、抗细胞凋亡等作用^[13]。NAC起作用的优点有:为小分子物质,易于进入细胞,脱乙酰基后成为谷胱甘肽(glutathione,GSH)合成的前体,从而提高组织内GSH含量,增加体内GSH贮存。体内实验中发现NAC能提高红细胞、肝脏组织和肺组织中细胞内的GSH水平^[14]。有研究显示:抗氧化剂NAC能不同程度恢复糖尿病大鼠各组织抗氧化水平,从而起到阻止或延缓糖尿病相关的靶器官功能损害的作用^[15]。前期研究发现,NAC抗氧化应激可减轻视网膜缺血缺氧状态,从而减轻视网膜新生血管的生成^[4]。本实验研究发现,糖尿病大鼠2mo时视网膜中PEDF水平已明显降低,而通过玻璃体腔注射NAC后视网膜中PEDF水平较D组明显提高,同时视网膜组织较D组破坏减少,提示NAC对早期糖尿病大鼠视网膜组织保护作用,可能是通过NAC的抗氧化应激作用,减轻了视网膜缺血缺氧状态,从而上调了视网膜中PEDF水平相关。

综上所述,在糖尿病早期,视网膜缺血缺氧的环境已经使PEDF水平下降,抗氧化剂NAC对早期糖尿病大鼠视网膜组织有保护作用的机制可能是通过上调视网膜中PEDF水平,提示NAC及PEDF有潜在的临床应用价值。

参考文献

- 1 Nakajima M, Cooney MJ, Alexander HT, *et al.* Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2110-2114
- 2 Jenkins AJ, Joglekar MV, Hardikar AA, *et al.* Biomarkers in Diabetic Retinopathy. *Rev Diabet Stud* 2015;12(1-2):159-195
- 3 陈玲, 张小玲, 郝扬, 等. 抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸对糖尿病大鼠早期视网膜神经组织的保护作用. *西安交通大学学报(医学版)* 2016;37(4):518-524
- 4 Zhu Y, Zhang XL, Zhu BF, *et al.* Effect of antioxidant N-acetylcysteine on diabetic retinopathy and expression of VEGF and

ICAM-1 from retinal blood vessels of diabetic rats. *Mol Biol Rep* 2012;39(4):3727-3735

5 Bharathi DSR, Coral K, Gayathree K, *et al.* Case report on two diabetic donor eyes with no retinopathy: Clinic ophthalmological and molecular studies. *Indian J Ophthalmol* 2019;67(10):1762-1765

6 Tombran - Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(8):1700

7 Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, *et al.* Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium - derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002;134(3):348-353

8 Yoshida T, Akiba J, Matsui T, *et al.* Pigment Epithelium - Derived Factor (PEDF) Prevents Hepatic Fat Storage, Inflammation, and Fibrosis in Dietary Steatohepatitis of Mice. *Dig Dis Sci* 2017;62(6):1527-1536

9 Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, *et al.* Prevention of ischemia - induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium - derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2593-2597

10 Zheng L, Szabó C, Kern TS. Poly (ADP - ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor - kappaB. *Diabetes* 2004;53(11):2960-2967

11 Serrarbassa PD, Dias AF, Vieira MF. New concepts on diabetic retinopathy: neural versus vascular damage. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71(3):459-463

12 Sheibani N, Wang S, Darjatmoko SR, *et al.* Novel anti - angiogenic PEDF - derived small peptides mitigate choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 2019;188:107798

13 De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, *et al.* Mechanisms of N - acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking - related end - points. *Carcinogenesis* 2001;22(7):999-1013

14 Verma AS, Mallick P, Dwivedi PD, *et al.* Exogenous supplementation of N-acetylcysteine Can Reduce Hepatotoxicity Induced by Ascites Fluid (Cell - Free) Adsorbed Over Protein - A - Containing Staphylococcus aureus Cowan - I Without Compromising Its Antitumor Effect. *J Pharm Bioallied Sci* 2019;11(3):205-215

15 周玉, 王伶俐, 黄杨, 等. 糖尿病大鼠的SOD活性与抗氧化剂治疗对机体抗氧化状态的影响. *中国实验动物学报* 2016;24(4):422-426