

二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠视网膜的保护及其对血清胱抑素 C 的调节作用

白惠玲¹, 朱晓燕², 刘勤^{1,2}, 张延英³, 康万荣³, 张书¹

引用:白惠玲,朱晓燕,刘勤,等.二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠视网膜的保护及其对血清胱抑素 C 的调节作用.国际眼科杂志 2023;23(1):23-31

基金项目:甘肃省卫生行业科研计划项目(No.GSWSKY-2019-40);兰州市科技计划项目(No.2020-ZD-18)

作者单位:¹(730000)中国甘肃省兰州市,甘肃省人民医院眼科;²(730000)中国甘肃省兰州市,甘肃中医药大学第一临床医学院;³(730000)中国甘肃省兰州市,甘肃中医药大学科研实验中心

作者简介:白惠玲,毕业于兰州大学,硕士,副主任医师,研究方向:角膜病、眼眶病、眼整形、眼免疫。

通讯作者:刘勤,毕业于兰州大学,学士,主任医师,研究方向:角膜病、眼视光、眼免疫. summliu@126.com

收稿日期:2022-06-06 修回日期:2022-12-20

摘要

目的:在大鼠 2 型糖尿病(T2DM)造模的基础上继续制备糖尿病视网膜病变(DR)模型,观察二甲双胍对 T2DM 大鼠 DR 的预防及保护作用和对血清胱抑素 C(Cys C)的影响,并对其机制进行探讨。

方法:筛选 120 只雄性 SD 大鼠,随机取 30 只分为空白对照组 A(10 只),T2DM 组(10 只)和二甲双胍干预组 A(10 只);其余 90 只随机分为三组,分别为空白对照组 B(30 只),DR 组(30 只)和二甲双胍干预组 B(30 只)。除空白对照组 A、B 外,其余所有组大鼠均构建 T2DM 模型,成模后二甲双胍干预组 A 大鼠给予二甲双胍灌胃,空白对照组 A 和 T2DM 组大鼠均给予生理盐水灌胃,干预 3mo 后分别测量三组大鼠的空腹血糖(FBG)和空腹血清胰岛素(FINS)指标,计算并分析胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);测各组大鼠血清 Cys C、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)、血管内皮生长因子(VEGF)和活性氧(ROS)水平,并行 FFA、HE 染色及透射电镜观察大鼠视网膜组织及血管形态;在 T2DM 病程 3mo 后,二甲双胍干预组 B 大鼠开始给予二甲双胍灌胃,其余大鼠均给予生理盐水灌胃,按干预时长不同,分别于第 4、5、6mo 各组取 10 只大鼠进行观察,测各组大鼠血清 Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF 和 ROS 水平,并行 FFA、HE 染色及透射电镜观察大鼠视网膜组织及血管形态。

结果:空白对照组 A、T2DM 组和二甲双胍干预组 A 三组间大鼠血清 FBG、FINS、HOMA-IR、Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF 和 ROS 的表达均有差异($P<0.05$),且均为 T2DM 组最高,二甲双胍干预组 A 低于 T2DM 组;空白对照组 B、DR 组和二甲双胍干预组 B 分别在 4、5、6mo 各同年龄组中,三组间大鼠血清 Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF 和 ROS 的表达均有差异($P<0.05$),且均为 DR 组最高,二甲双胍干预

组 B 的表达低于 DR 组,随着 DR 病程的延长,Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF 和 ROS 的表达也进一步增加;FFA 结果显示:与对应的空白对照组相比,各模型组大鼠视网膜血管走行迂曲,并且随着病程的延长可见微动脉瘤及荧光渗漏;HE 染色结果显示:与对应的空白对照组相比,各模型组大鼠视网膜细胞排列紊乱,并随着病程的延长可见异常扩张的血管;透射电镜结果显示:与对应的空白对照组相比,各模型组大鼠视网膜毛细血管损伤严重;但与对应模型组比较,各二甲双胍干预组大鼠 FFA、HE 和透射电镜结果均有不同程度的改善。

结论:二甲双胍可通过下调血清 Cys C 介导的炎症和氧化应激水平,改善视网膜组织病变,从而对 T2DM 大鼠视网膜病变起预防和治理作用。

关键词:二甲双胍;2 型糖尿病;糖尿病视网膜病变;血清胱抑素 C

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.1.05

Protective effect of metformin on the retina of type 2 diabetic rats and its regulation on serum cystatin C

Hui-Ling Bai¹, Xiao-Yan Zhu², Qin Liu^{1,2}, Yan-Ying Zhang³, Wan-Rong Kang³, Shu Zhang¹

Foundation items: Gansu Province Health Industry Scientific Research Project (No.GSWSKY-2019-40); Lanzhou Science and Technology Plan Project (No.2020-ZD-18)

¹Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²First School of Clinical Medical, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ³Research and Experiment Center, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Qin Liu. Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; First School of Clinical Medical, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. summliu@126.com

Received:2022-06-06 Accepted:2022-12-20

Abstract

• **AIM:** To prepare the model of diabetic retinopathy (DR) on the basis of the model of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in rats, observe the preventive and protective effect of metformin on DR in T2DM rats and the effect on serum Cystatin C (Cys C), and discuss its mechanism.

• **METHODS:** A total of 120 male SD rats were selected and 30 rats were randomly divided into blank control group A (10 rats), T2DM group (10 rats) and metformin intervention group A (10 rats). The remaining 90 rats were randomly divided into three groups: blank control group B (30 rats), DR group (30 rats) and metformin intervention group B (30 rats). Except for blank control groups A and B, T2DM models were constructed in all other groups. After modeling, rats in metformin intervention group A were given metformin by gavage, and rats in blank control group A and T2DM group were given normal saline by gavage. After 3mo of intervention, fasting blood glucose (FBG) and fasting serum insulin (FINS) indexes of the three groups were measured respectively, and the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated and analyzed; The serum Cys C, tumor necrosis factor- α (TNF- α), the levels of Interleukin-8 (IL-8), vascular endothelial growth factor (VEGF) and reactive oxygen species (ROS) were measured, and we observed the retinal tissue and vascular morphology of rats by FFA, HE staining and transmission electron microscopy; rats in metformin intervention group B began to give metformin by gavage 3mo after the course of T2DM, and other rats were given normal saline. According to the length of intervention, 10 rats were taken from each group and observed at 4, 5 and 6mo respectively. Serum levels of Cys C, TNF- α , IL-8, VEGF and ROS were measured in each group. We observed the retinal tissue and vascular morphology of rats by FFA, HE staining and transmission electron microscopy.

• **RESULTS:** The expressions of serum FBG, FINS, HOMA-IR, Cys C, TNF- α , IL-8, VEGF and ROS were statistically significant among the blank control group A, T2DM group and metformin intervention group A ($P < 0.05$), which were the highest in T2DM group, and the metformin intervention group A were lower than T2DM group; The expression of Cys C, TNF- α , IL-8, VEGF and ROS of rat serum were statistically significant among the blank control group B, DR group and metformin intervention group B within the same age groups at 4, 5 and 6mo respectively ($P < 0.05$), and were all the highest in DR group. The expressions of metformin intervention group B were lower than those of the DR group. With the prolongation of DR course, the expression of Cys C, TNF- α , IL-8, VEGF and ROS also increased further; FFA results showed that compared with the corresponding blank control group, the retinal blood vessels of each model group were tortuous, and microaneurysms and fluorescence leakage were visible with the prolongation of the disease course; HE staining results showed that compared with the corresponding blank control group, the retinal cells of each model group were arranged disorderly, and abnormal dilated blood vessels were visible with the prolongation of the disease course; Transmission electron microscopy results showed that compared with the corresponding blank control group, the retinal capillaries in each model group were seriously damaged; However, compared with the corresponding

model group, the results of FFA, HE and transmission electron microscopy of rats in each metformin intervention group had different degrees of improvement.

• **CONCLUSIONS:** Metformin can improve retinal tissue lesions by down-regulating serum Cys C-mediated levels of inflammation and oxidative stress, thus playing a preventive and therapeutic role in the retinopathy in T2DM rats.

• **KEYWORDS:** metformin; type 2 diabetes mellitus; diabetic retinopathy; serum cystatin C

Citation: Bai HL, Zhu XY, Liu Q, *et al.* Protective effect of metformin on the retina of type 2 diabetic rats and its regulation on serum cystatin C. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023; 23(1): 23-31

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的眼部并发症,是导致失明的重要原因。炎症反应和氧化应激是贯穿DR整个病理过程的关键特征,DR患者的视力损害主要由该两种途径引起^[1-2]。血清胱抑素C(Cystatin C, Cys C)是机体有核细胞合成的一种非糖基化碱性蛋白,主要由视网膜色素上皮细胞分泌^[3-4],近年来有研究表明,血清Cys C是DR的独立危险因素之一^[5],因此血清Cys C的分泌情况可能与DR的发生和发展密切相关。二甲双胍是目前治疗2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的首选口服药物。近期研究表明,二甲双胍还可以通过减轻炎症反应和氧化应激对视网膜色素上皮细胞的损伤,抑制视网膜新生血管生成来延缓DR进程^[6-7]。本研究通过观察二甲双胍对T2DM大鼠视网膜血管、组织病理学改变及血清Cys C的影响,旨在探讨二甲双胍通过对血清Cys C调控,预防T2DM大鼠DR的发生,同时对已经发生DR的大鼠病情转归的干预作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型的构建及分组给药 选取6周龄雄性SD大鼠120只,体质量约为130~170g,购自甘肃中医药大学动物实验中心[许可证号:SYXK(甘)2020-0009]。本实验通过甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审查(伦理审查编号:2020-298)。120只大鼠中随机抽取30只分为空白对照组A(10只),T2DM组(10只)和二甲双胍干预组A(10只);其余90只再次随机分为三组,分别为空白对照组B(30只),DR组(30只)和二甲双胍干预组B(30只)。所有大鼠适应性饲养7d后给予空白对照组A、B普通饲料喂养,其余组均给予高脂高糖饲料喂养,饲养4wk给空白对照组A、B左下腹腔注射柠檬酸钠缓冲液,将其余组大鼠按30mg/kg左下腹腔注射链脲佐菌素(STZ),给药后所有大鼠均改为普通饲料喂养,直到实验结束。注药72h后测量尾静脉血糖浓度,记录体质量、饮水量和尿量,当血糖 >16.7 mmol/L,尿糖 $>+++$,且有多饮、多食、多尿时即认为T2DM模型成功。

造模成功后给予二甲双胍干预组A大鼠二甲双胍灌胃[第1wk剂量为150mg/(kg·d),第2wk为300mg/(kg·d),

第3wk调整为400mg/(kg·d),该剂量一直保持到3mo],空白对照组A和T2DM组大鼠给予生理盐水灌胃[2mL/(kg·d),每日1次,连续3mo],干预3mo后三组大鼠进行观察:测量各组大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)和空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FINS)指标,计算并分析胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR),心脏采血测各组大鼠血清Cys C、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,并行眼底荧光造影(fundus fluorescein angiography, FFA)观察各组大鼠眼底血管变化,HE染色观察各组大鼠视网膜组织形态和厚度,透射电镜观察大鼠视网膜毛细血管超微形态。

在T2DM病程3mo后,二甲双胍干预组B大鼠开始给予二甲双胍灌胃[400mg/(kg·d),每日1次,连续3mo],空白对照组B和DR组大鼠均给予生理盐水灌胃[2mL/(kg·d),每日1次,连续3mo]。按干预时长不同,分别于第4、5、6mo各组取10只大鼠进行观察:测各组大鼠血清Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF和ROS水平,并行FFA观察各组大鼠眼底血管变化,HE染色观察各组大鼠视网膜组织形态和厚度,透射电镜观察大鼠视网膜毛细血管超微形态(图1)。

1.1.2 试剂与仪器 盐酸二甲双胍片:中美上海施贵宝制药有限公司(批号:ABT8279);链脲佐菌素:北京索莱宝科技有限公司(批号:616S0212);荧光素钠注射液:美国Alcon Research LLC(批号:314040F);眼底血管荧光造影机:德国海德堡公司(型号:SpectralisHRA+Multicolor);大鼠胰岛素、Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF ELISA试剂盒:江苏菲亚生物科技有限公司;大鼠ROS ELISA试剂盒:上海恒远生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 模型的观察指标 测量空白对照组A、T2DM组和二甲双胍干预组A大鼠的FBG和FINS指标,比较各组的FBG值、FINS变化并计算分析HOMA-IR(=FBG×FINS/22.5)。

1.2.2 FFA检查 大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠50mg/kg进行麻醉,双眼滴复方托吡卡胺滴眼液充分散瞳后,将大鼠固定于眼底血管造影机前,腹腔注射10%荧光素钠0.5mL/kg,观察各组大鼠眼底有无病变及荧光素有无渗漏。

1.2.3 ELISA实验 大鼠经2%的戊巴比妥钠50mg/kg麻醉后行心脏采血5mL,静置30min后4000r/min离心15min,取上清分别检测各组大鼠血清中Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF和ROS含量,并且根据标准曲线和吸光度值计算各组大鼠血清中Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF和ROS的浓度。

1.2.4 HE染色 大鼠处死后迅速取出两个眼球,左眼置于眼球固定液行HE染色。

1.2.5 透射电镜 每组大鼠的右眼放入2.5%戊二醛溶液用于透射电镜观察。

统计学分析:应用SPSS 25.0软件进行统计分析,实验数据正态分布检验后均服从正态分布,采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组间差异比较采用单因素方差分析,两组间比较方差齐选用LSD-*t*检验,不齐选用Dunnnett-T3检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T2DM大鼠成模及死亡率 T2DM造模大鼠一次成模69只,二次累加成模11只,总成模率100%。T2DM大鼠共死亡4只,死亡率5%,分别于病程5mo(2只)、病程6mo(2只)时死亡。空白对照组大鼠无死亡。

2.2 各组大鼠FBG和FINS及HOMA-IR比较 三组间FBG、FINS和HOMA-IR差异均具有统计学意义($F=205.708, 171.955, 321.631$,均 $P<0.01$),见表1。与空白对照组A比较,T2DM组大鼠FBG、FINS和HOMA-IR显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),提示T2DM大鼠造模成功;与T2DM组比较,二甲双胍干预组A大鼠FBG、FINS和HOMA-IR显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠FFA检查结果 空白对照组A大鼠视网膜血管管径均匀一致,走行规则,以视盘为中心呈放射状分布,未见黄斑样结构(图2A1);T2DM组大鼠眼底可见由稀疏的分支小动脉形成的浅层毛细血管网,毛细血管迂曲并可见荧光渗漏(图2A2);二甲双胍干预组A大鼠眼底血管粗细均匀一致,走行规则,未见荧光渗漏(图2A3)。提示T2DM病程3mo时大鼠眼底血管已出现DR的改变,而二甲双胍干预可以预防T2DM大鼠眼底血管发生病变。

不同干预时间,空白对照组B大鼠眼底血管均清晰可见,管径均匀一致,走行规则,无渗出和出血(图2B1、C1、D1)。DR组(M4组)大鼠眼底血管走行迂曲,可见血管串珠样改变和无灌注区形成(图2B2);DR组(M5组)大鼠眼底无灌注区面积增大,并可见出血遮蔽荧光(图2C2);DR组(M6组)大鼠眼底屈光间质混浊,可能存在玻璃体出血(图2D2)。二甲双胍干预组B(M4、M5、M6组)大鼠眼底屈光间质清晰,荧光渗漏及无灌注区随着二甲双胍干预时间的延长,至M6组时眼底病变已明显好转(图2B3、C3、D3)。

2.4 各组大鼠血清中Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF、ROS的浓度 各组大鼠血清中Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF和ROS浓度差异均具有统计学意义($F=182.128, 167.362, 166.013, 249.265, 76.803$,均 $P<0.01$)。与空白对照组A相比,T2DM组和二甲双胍干预组A大鼠血清中Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF和ROS含量均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);二甲双胍干预组A大鼠血清中Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF和ROS含量较T2DM组均明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

各组大鼠血清中Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF和ROS在4、5、6mo差异均有统计学意义($P<0.01$)。随后用LSD-*t*法进行两两比较,结果显示,在各时间点,与同期空白对照组B比较,DR组和二甲双胍干预组B大鼠血清中Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF和ROS含量均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),但二甲双胍干预组B大鼠增

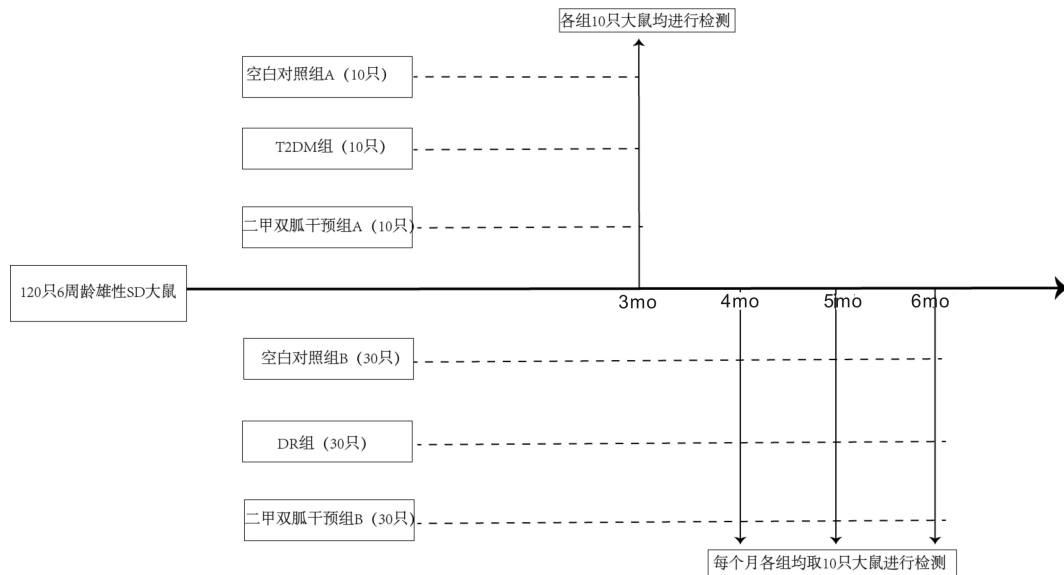


图1 实验分组及动物处理流程。

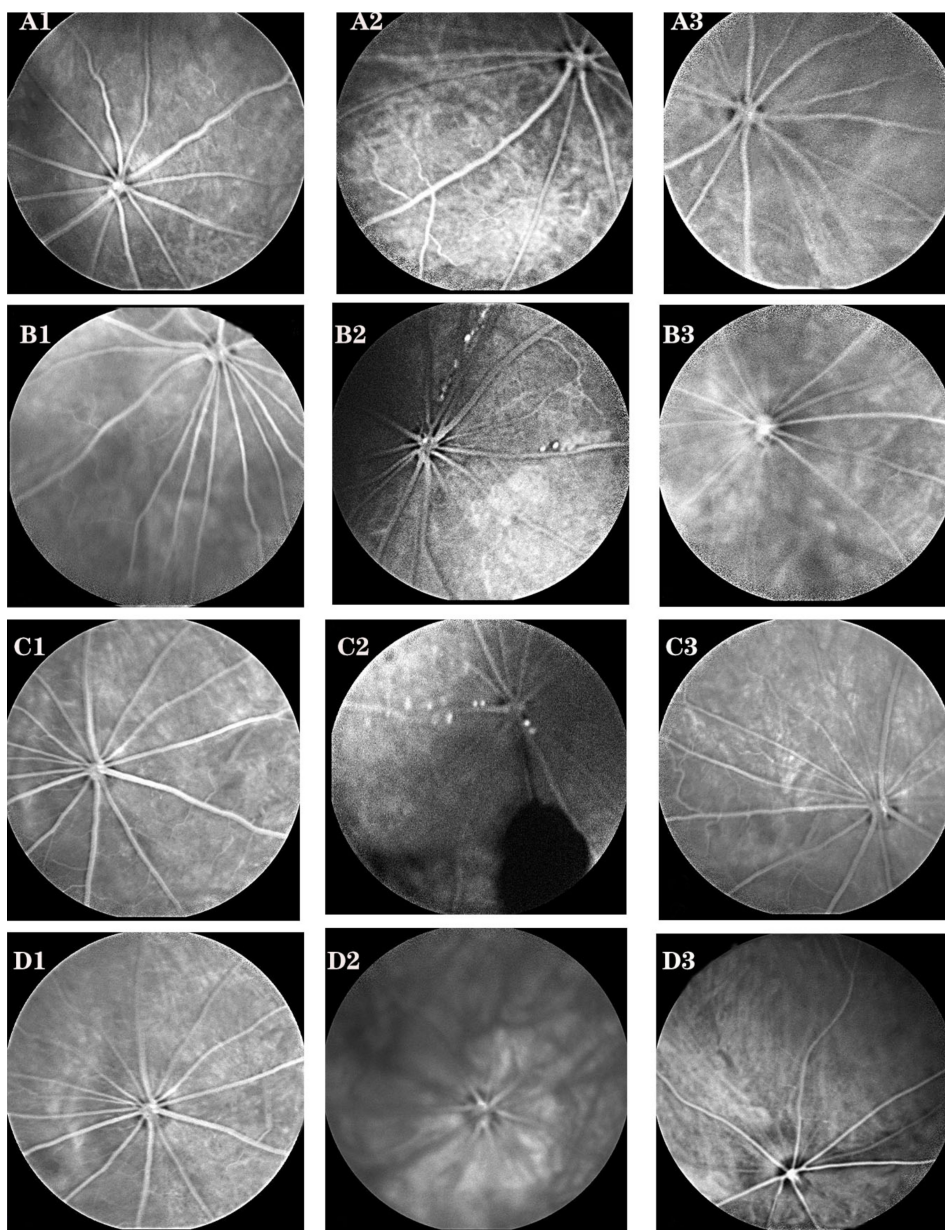


图2 各组大鼠 FFA 检查结果 A1~A3:病程 3mo;A1:空白对照组 A;A2:T2DM 组;A3:二甲双胍干预组 A;B1~B3:病程 4mo;B1:空白对照组 B M4 组;B2:DR 组 M4 组;B3:二甲双胍干预组 B M4 组;C1~C3:病程 5mo;C1:空白对照组 B M5 组;C2:DR 组 M5 组;C3:二甲双胍干预组 B M5 组;D1~D3:病程 6mo;D1:空白对照组 B M6 组;D2:DR 组 M6 组;D3:二甲双胍干预组 B M6 组。

表 1 各组大鼠 FBG 和 FINS 及 HOMA-IR 比较

 $\bar{x} \pm s$

分组	FBG (mmol/L)	FINS (mIU/L)	HOMA-IR
空白对照组 A	4.68±0.42	13.65±1.79	2.86±0.58
T2DM 组	29.75±3.56 ^a	25.60±1.01 ^a	33.85±4.21 ^a
二甲双胍干预组 A	13.78±3.26 ^c	17.50±1.50 ^c	10.67±2.49 ^c
<i>F</i>	205.708	171.955	321.631
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05 vs 空白对照组 A;^c*P*<0.05 vs T2DM 组。

表 2 各组大鼠血清中 Cys C、TNF-α、IL-8、VEGF 和 ROS 含量的变化

 $\bar{x} \pm s$

分组	Cys C (μg/L)	TNF-α (ng/L)	IL-8 (ng/L)	VEGF (pg/mL)	ROS (IU/mL)
空白对照组 A	492.47±22.79	17.23±3.06	212.78±10.81	4.29±0.56	205.91±16.52
T2DM 组	739.55±30.26 ^a	40.09±2.56 ^a	344.63±20.47 ^a	20.49±1.74 ^a	286.43±13.92 ^a
二甲双胍干预组 A	608.61±32.89 ^{a,c}	29.93±9.89 ^{a,c}	261.99±16.31 ^{a,c}	13.35±2.15 ^{a,c}	229.77±14.19 ^{a,c}
<i>F</i>	182.128	167.362	166.013	249.265	76.803
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05 vs 空白对照组 A;^c*P*<0.05 vs T2DM 组。

高不如 DR 组明显;与 DR 组比较,二甲双胍干预组 B 大鼠血清中 Cys C、TNF-α、IL-8、VEGF 和 ROS 含量均明显下降,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。且随着病程的延长,DR 组大鼠血清中 Cys C、TNF-α、IL-8、VEGF 和 ROS 含量也显著增高(均 *P*<0.05),而二甲双胍干预组 B 大鼠血清中 Cys C、TNF-α、IL-8、VEGF 和 ROS 含量增高不如 DR 组明显,见表 3~5。

2.5 各组大鼠 HE 染色结果 空白对照组 A 大鼠视网膜各层结构清晰可见,内界膜完整,细胞排列整齐,细胞形态结构正常(图 3A1);T2DM 组大鼠视网膜各层细胞排列稀疏,细胞间隙明显增宽,内核层和外核层细胞密度明显减少,排列稀疏,厚度变薄(图 3A2);二甲双胍干预组 A 大鼠视网膜各层结构完整,细胞排列整齐,细胞形态正常(图 3A3)。与空白对照组 A 比较,T2DM 组大鼠视网膜变薄(*P*<0.05);与 T2DM 组比较,二甲双胍干预组 A 大鼠视网膜增厚(*P*<0.05,图 4),提示二甲双胍干预可以预防 T2DM 视网膜组织发生病变。

不同时间点空白对照组 B(M4、M5、M6 组)大鼠视网膜各层结构均完整且连接紧密,细胞排列整齐;DR 组(M4 组)大鼠视网膜各层结构排列紊乱,内界膜断裂、水肿,外核层结构明显紊乱、变薄,大量细胞结构被破坏并可见部分空泡,DR 组(M5 组)大鼠视网膜各层结构紊乱加剧,内界膜肿胀断裂严重,可见内皮细胞突破内界膜,神经节细胞层细胞明显减少,DR 组(M6 组)大鼠视网膜内界膜严重肿胀,神经节细胞层细胞进一步减少,内外核层界限消失,内丛状层、内核层、外丛状层、外核层细胞数量均减少,排列稀疏,各层的毛细血管明显扩张,管腔增粗,腔内可见红细胞,还可见部分红细胞渗漏到血管外的组织中,毛细血管数量增加;二甲双胍干预组 B(M4、M5、M6 组)大鼠视网膜各层结构排列稍紊乱,少量细胞结构被破坏,形态结构改变较 DR 组各亚组均较轻,见图 3B、C、D。与同期空白对照组比较,DR 组大鼠视网膜变薄(*P*<0.05);与 DR 组比较,二甲双胍干预组 B 大鼠视网膜增厚(*P*<0.05),且随着病程的延长,DR 组大鼠视网膜进一步变薄(*P*

0.05),而二甲双胍干预组 B 大鼠视网膜厚度变化不明显(*P*>0.05),见图 5。

2.6 各组大鼠视网膜毛细血管的透射电镜结果 空白对照组 A 大鼠视网膜毛细血管由基底膜、内皮细胞和周细胞组成,位于管腔内面的内皮细胞被连续的基底膜和周细胞环绕,内皮细胞和周细胞核形态正常,异染色质分布均匀,细胞器结构清晰,基底膜连续完整(图 6A1);T2DM 组大鼠内皮细胞和周细胞核的异染色质凝聚靠边,核膜凹陷褶皱,线粒体嵴部分消失,个别呈空泡变,内皮细胞胞质内饮泡增多,胞质向管腔突出,基底膜增厚(图 6A2);二甲双胍干预组 A 大鼠透射电镜下视网膜毛细血管内皮细胞核的周围可见少量异染色质,管壁的厚度基本正常,线粒体基本正常,未见肿胀和嵴断裂,基底膜无增厚(图 6A3)。提示二甲双胍干预可以预防 T2DM 大鼠视网膜毛细血管发生病变。

空白对照组 B(M4、M5、M6 组)大鼠视网膜毛细血管周细胞和内皮细胞结构均清晰,线粒体结构正常,基底膜连续完整,无增厚(图 6B1、C1、D1);DR 组(M4 组)大鼠视网膜周细胞和内皮细胞的线粒体出现空泡样改变,线粒体膜中断不连续,基底膜增厚,电子密度增加,毛细血管管腔变形(图 6B2);二甲双胍干预组 B(M4 组)大鼠视网膜毛细血管内皮细胞及周细胞核的异染色质凝聚并靠边,内皮细胞胞质内饮泡增多且胞质向管腔突出以及线粒体肿胀(图 6B3),但视网膜损害较 DR 组(M4 组)轻;DR 组(M5 组)大鼠视网膜毛细血管周细胞及内皮细胞核固缩,异染色质边聚,周细胞、内皮细胞细胞器结构模糊,内皮细胞向管腔突出,基底膜断裂缺失,管腔变形(图 6C2);二甲双胍干预组 B(M5 组)大鼠视网膜毛细血管内皮细胞核的周围可见少量异染色质并且核内也可见散在的异染色质,仍有管腔内突起物,线粒体基本正常,未见肿胀、嵴断裂,基底膜稍厚(图 6C3);DR 组(M6 组)大鼠视网膜毛细血管改变较前更加严重,管腔狭窄闭塞,管壁周细胞和内皮细胞均出现明显固缩,内皮细胞向管腔突出严重,细胞器结构不清,管腔周围水肿明显,基底膜缺失(图 6D2);二甲双胍干预组 B

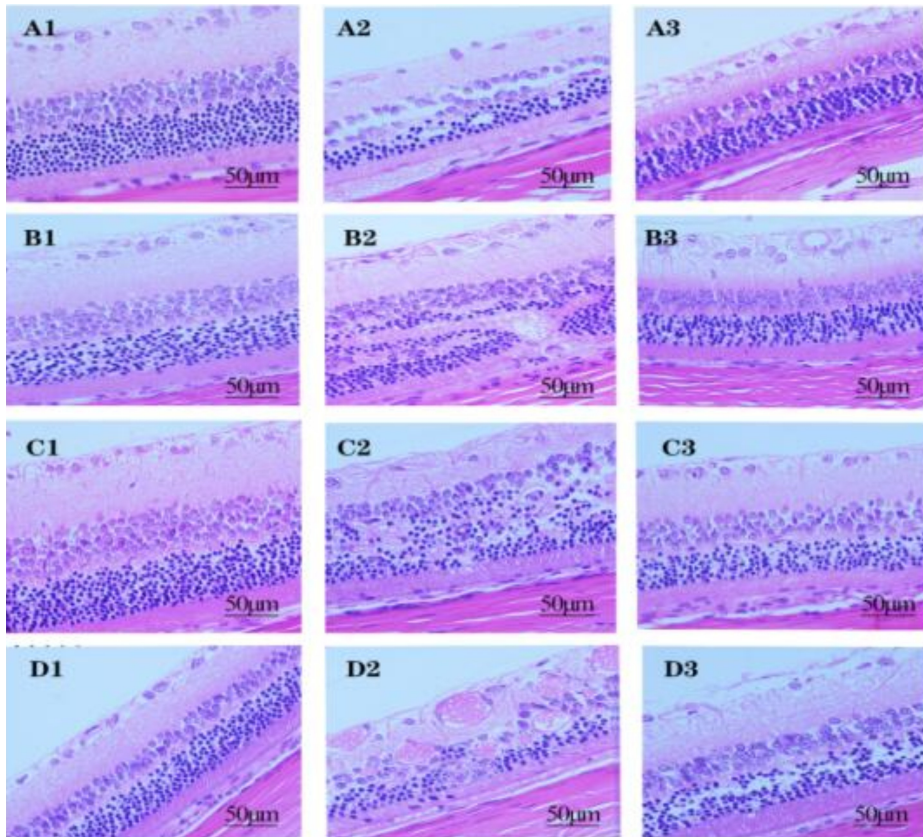


图3 各组大鼠 HE 染色结果 A1~A3:病程 3mo;A1:空白对照组 A;A2:T2DM 组;A3:二甲双胍干预组 A;B1~B3:病程 4mo;B1:空白对照组 B M4 组;B2:DR 组 M4 组;B3:二甲双胍干预组 B M4 组;C1~C3:病程 5mo;C1:空白对照组 B M5 组;C2:DR 组 M5 组;C3:二甲双胍干预组 B M5 组;D1~D3:病程 6mo;D1:空白对照组 B M6 组;D2:DR 组 M6 组;D3:二甲双胍干预组 B M6 组。

表3 各组大鼠血清中 Cys C 和 TNF- α 含量的变化

分组	Cys C ($\mu\text{g/L}$)			TNF- α (ng/L)		
	4mo	5mo	6mo	4mo	5mo	6mo
空白对照组 B	499.47 \pm 30.86	499.25 \pm 37.11	499.27 \pm 28.40	16.66 \pm 3.22	15.41 \pm 2.92	15.49 \pm 2.68
DR 组	843.64 \pm 46.20	960.00 \pm 45.76	1172.73 \pm 67.95	46.93 \pm 3.24	54.66 \pm 2.71	64.44 \pm 3.60
二甲双胍干预组 B	640.70 \pm 39.15	782.14 \pm 25.53	800.06 \pm 34.78	35.56 \pm 3.26	35.89 \pm 2.81	39.57 \pm 6.15

表4 各组大鼠血清中 IL-8 和 VEGF 含量的变化

分组	IL-8 (ng/L)			VEGF (pg/mL)		
	4mo	5mo	6mo	4mo	5mo	6mo
空白对照组 B	206.59 \pm 13.34	205.03 \pm 11.62	206.19 \pm 14.27	4.13 \pm 0.47	4.11 \pm 0.52	4.30 \pm 0.71
DR 组	380.94 \pm 34.32	458.40 \pm 30.83	518.56 \pm 18.73	27.70 \pm 1.57	32.39 \pm 1.71	40.91 \pm 2.26
二甲双胍干预组 B	258.24 \pm 29.16	312.44 \pm 28.07	324.20 \pm 10.11	20.03 \pm 2.49	21.87 \pm 2.30	23.83 \pm 1.51

表5 各组大鼠血清中 ROS 含量的变化

组别	4mo	5mo	6mo
空白对照组 B	194.69 \pm 18.67	197.12 \pm 18.55	198.07 \pm 21.09
DR 组	368.63 \pm 23.89	438.34 \pm 11.21	519.55 \pm 14.04
二甲双胍干预组 B	260.45 \pm 31.98	302.81 \pm 24.04	263.70 \pm 13.82

(M6 组)大鼠在视网膜毛细血管内皮细胞中,细胞核周边可见异染色质聚集,细胞核内亦可见异染色质,线粒体正常,管壁厚度基本正常,管腔内见少量突起物,周细胞核及线粒体内偶见空化现象,但基底膜无增厚(图 6D3)。

3 讨论

T2DM 是近年来患病率较高的一种慢性炎症性疾病,

长期的高血糖可以导致血管的结构和功能发生改变,引发一系列并发症。DR 是 T2DM 最常见的微血管病变之一,主要表现为免疫、炎症反应等多种机制共同作用引起的视网膜微血管瘤和眼底出血、渗出,进而导致视物模糊,严重时出现永久性视力丧失^[8-9]。STZ 糖尿病大鼠模型是研究 DR 的常用动物模型,可以用于研究该病的病理机制以及

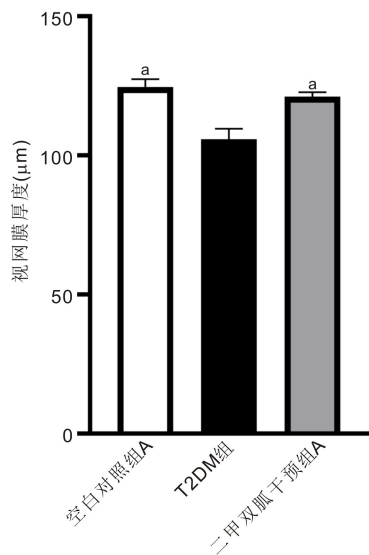


图4 二甲双胍对 T2DM 大鼠视网膜厚度的影响 ^a $P < 0.05$ vs T2DM 组。

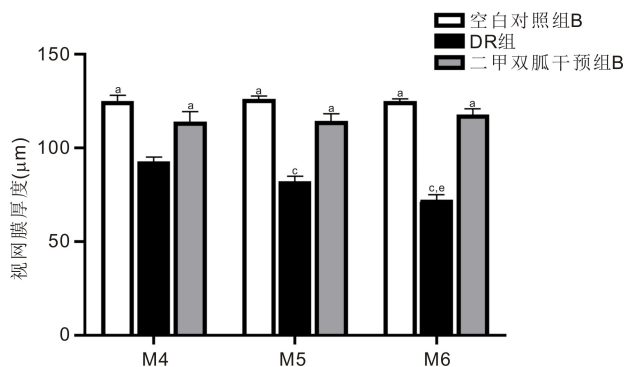


图5 二甲双胍对 DR 大鼠视网膜厚度的影响 ^a $P < 0.05$ vs DR 组; ^c $P < 0.05$ vs 病程 4mo DR 组; ^e $P < 0.05$ vs 病程 5mo DR 组。

防治策略^[10]。本研究采用高脂高糖饲料喂养 4wk 联合小剂量 STZ 30mg/kg 腹腔注射建立 T2DM 大鼠模型,结果发现 T2DM 模型大鼠多食、多饮、多尿、体质量减轻,所有大鼠空腹血糖均 ≥ 16.7 mmol/L,且 HOMA-IR 升高,成功复制出了大鼠胰岛素抵抗模型,即 T2DM 模型。饲养 3mo 后,T2DM 模型大鼠 FFA 结果显示,眼底可见稀疏的分支小动脉形成的浅层毛细血管网,毛细血管迂曲并可见荧光渗漏;HE 染色结果显示,视网膜各层细胞排列稀疏,细胞间隙明显增宽,内核层和外核层细胞密度明显减少,排列稀疏,厚度变薄;透射电镜结果显示,内皮细胞与周细胞的细胞核异染色质凝聚并靠边,核膜凹陷褶皱,线粒体嵴部分消失,个别呈空泡变,内皮细胞的胞质内饮泡增多且胞质向管腔突出,基底膜增厚。这些结果均提示本研究 DR 模型大鼠建立成功。而 DR 的发病机制非常复杂,炎症反应和氧化应激在 DR 的发生发展中具有重要作用。

Cys C 是一类半胱氨酸蛋白酶抑制剂,研究发现,它在大鼠玻璃体、视网膜的各层细胞中均有表达^[4]。有研究表明,随着 DR 的发展,血清 Cys C 水平显著升高^[11],其参与 DR 的机制可能有:(1)Cys C 及其降解产物能够激活并介导炎症反应^[12]。文献报道 Cys C 与伴随有 TNF- α 、IL-8 和 VEGF 等炎症细胞因子升高的炎症反应呈正相关^[13-18]。可能的机制为,Cys C 通过干扰素 γ (interferon- γ ,

IFN- γ) 介导的信号转导通路发挥了重要的致炎作用。IFN- γ 是一种由 NK 细胞和活化的 T 细胞产生可溶性细胞因子,通常作为巨噬细胞的重要激活因子,也是主要组织相容性复合物 II (MHC-II) 分子表达的诱导剂,IFN- γ 异常高表达通常会自身炎症的产生。现有研究发现,向 Cys C^{-/-}小鼠巨噬细胞中加入 Cys C 会促进诱导的核转录因子 κ B (NF- κ B) 的激活,进而启动多种细胞因子特别是 TNF- α 、IL-6、IL-8 及 VEGF 等^[19-21] 基因的转录,而使炎症反应放大;(2)同时,糖尿病患者体内原本就已经存在的慢性炎症,在 Cys C 水平异常升高时,反之亦可引起患者视网膜血管内皮出现损伤,并引起硬化^[22-24];(3)同型半胱氨酸具有损伤血管内皮细胞、导致微血管病变的作用,而 Cys C 对同型半胱氨酸的表达及分泌可产生一定的激发作用^[25],Cys C 可通过影响蛋白水解酶的活性及对同型半胱氨酸的作用参与血管内皮细胞损伤、血管重塑、血管新生等病变过程,参与 DR 的发生^[26]。本研究结果发现,分别与空白对照组 A 和空白对照组 B 相比,对应的 T2DM 组和 DR 组大鼠血清中 Cys C 含量明显升高,同时伴有 TNF- α 、IL-8、VEGF 和 ROS 含量均明显升高,且随着病程的延长,DR 组大鼠血清中 Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF 和 ROS 含量也均逐渐升高。本实验与其他研究结果一致,提示血清 Cys C 在 DR 的发生和发展中都起了重要作用,并通过炎症和氧化应激两者所涉及共同通路有关,可能为 DR 探讨新的治疗策略提供思路。

二甲双胍来源于山羊豆碱,指南推荐其可以作为治疗 T2DM 的一线 and 全程用药^[27]。研究发现,二甲双胍不仅可以通过提高胰岛素敏感性降低血糖,还可以通过减少视网膜损伤、抑制视网膜的炎症反应和改善胰岛素抵抗等,减少或延缓 DR 的发生与发展^[28]。近年来多篇研究已报道二甲双胍还具有抗氧化特性,通过促进 SOD 分泌,抑制超氧阴离子自由基分泌,最终改善患者的氧化应激^[29]。本研究发现,与 T2DM 组比较,二甲双胍干预组 A 大鼠 HOMA-IR、Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF 和 ROS 含量均显著降低,FFA、HE 和透射电镜结果均显示与空白对照组 A 基本相似,视网膜均未出现明显的异常改变,该结果提示二甲双胍可有效改善胰岛素抵抗及炎症反应对视网膜的损伤,可预防 DR 的发生。在研究中还发现,在各时间点与 DR 组比较,二甲双胍干预组 B 大鼠血清中 Cys C、TNF- α 、IL-8、VEGF 和 ROS 含量均明显下降,且随着病程的延长,这些指标的增高也都不如 DR 组明显,FFA、HE 和透射电镜结果示眼底改变较 DR 组各亚组均较轻,且眼底病变都明显逐渐好转,其机制可能是 T2DM 大鼠经二甲双胍治疗后,使得 NF- κ B 的亚单位无法从失活状态活化,从而无法从细胞质转移到细胞核内与相应的炎症相关基因结合,进而抑制了炎性细胞因子的转录以及炎性因子或递质的合成和释放^[30-31],通过抑制 NF- κ B 介导的炎症通路降低血清 Cys C,延缓和改善了炎症反应对视网膜的破坏,从而达到保护视网膜的效果^[32],从而提示二甲双胍可能是通过下调血清 Cys C 介导的炎症和氧化应激水平来预防和减缓 T2DM 大鼠发生 DR。

综上所述,二甲双胍能够有效下调血清中 Cys C 和其

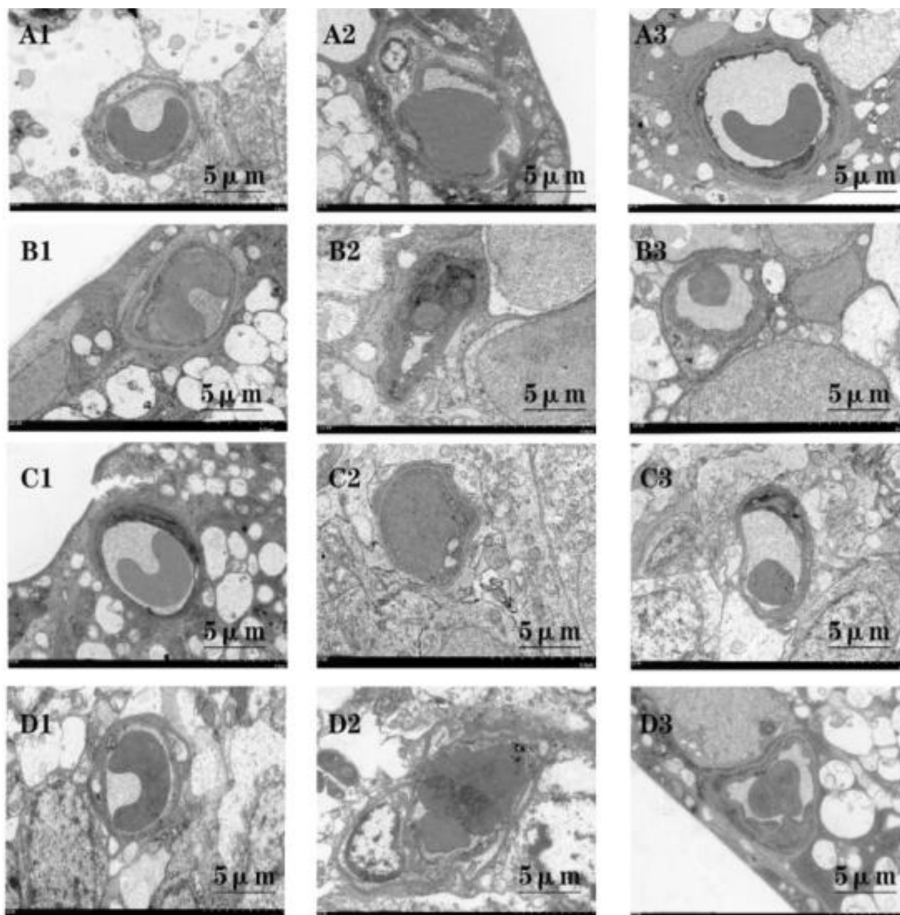


图6 各组大鼠视网膜毛细血管的透射电镜结果 A1~A3:病程3mo;A1:空白对照组A;A2:T2DM组;A3:二甲双胍干预组A;B1~B3:T2DM病程4mo;B1:空白对照组B M4组;B2:DR组M4组;B3:二甲双胍干预组B M4组;C1~C3:T2DM病程5mo;C1:空白对照组B M5组;C2:DR组M5组;C3:二甲双胍干预组B M5组;D1~D3:T2DM病程6mo;D1:空白对照组B M6组;D2:DR组M6组;D3:二甲双胍干预组B M6组。

介导的 $\text{TNF}-\alpha$ 、IL-8、VEGF 和 ROS 的含量,从而抑制 T2DM 大鼠的视网膜发生炎症反应和氧化应激,提示二甲双胍可能是预防和治理 DR 的有效药物。本研究尚存在几处不足:(1)本研究由于实验周期较长,设亚组较多,且采用 HE 和透射电镜两种方法将视网膜组织制样,故组织样本数量有限,无法从局部检测,后续有条件时将从视网膜组织进一步加以验证;(2)本研究仅设立了安慰剂对照,如有条件后期将设立接受其他对 DR 有效的药物治疗的大鼠作为同期对照。

参考文献

- 1 Fujii S, Setoguchi C, Kawazu K, *et al.* Functional characterization of carrier-mediated transport of pravastatin across the blood-retinal barrier in rats. *Drug Metab Dispos* 2015;43(12):1956-1959
- 2 Mishra M, Flaga J, Kowluru RA. Molecular mechanism of transcriptional regulation of matrix metalloproteinase - 9 in diabetic retinopathy. *J Cell Physiol* 2016;231(8):1709-1718
- 3 Nozawa Y, Sato H, Wakamatsu A, *et al.* Utility of estimated glomerular filtration rate using cystatin C and its interpretation in patients with rheumatoid arthritis under glucocorticoid therapy. *Clin Chim Acta* 2018;487:299-305
- 4 韩文莉, 马威. 胱抑素 c 及同型半胱氨酸与 2 型糖尿病视网膜病变的相关性研究. *长治医学院学报* 2019;33(1):29-32
- 5 金雅美, 冯晓红. 2 型糖尿病患者视网膜病变与血清胱抑素 C 关系分析. *浙江医学* 2019;41(19):2085-2086, 2132

- 6 Kim YS, Kim M, Choi MY, *et al.* Metformin protects against retinal cell death in diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;492(3):397-403
- 7 Han J, Li Y, Liu XL, *et al.* Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2018;13(3):e0193031
- 8 丁秋爱, 游志鹏. 糖尿病视网膜病变与免疫炎症关系的研究进展. *南昌大学学报(医学版)* 2017;57(6):97-100
- 9 孙扬, 李琪欢, 田思佳, 等. 免疫球蛋白 G N-糖基化与糖尿病视网膜病变的相关性研究. *中国预防医学杂志* 2018;19(10):734-737
- 10 李蓉, 姚国敏, 闫红林, 等. G 补缀 FHA 域血管生成因子 1 在糖尿病视网膜新生血管形成中的作用. *国际眼科杂志* 2020;20(9):1487-1492
- 11 Joobin K, Gholamhossein Y, Abbas HR, *et al.* 糖尿病患者血清胱抑素 C 和急性反应指标与视网膜病变严重程度相关性研究. *国际眼科杂志* 2018;18(3):412-417
- 12 Sahakyan K, Lee KE, Shankar A, *et al.* Serum cystatin C and the incidence of type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2011; 54(6):1335-1340
- 13 崔翠, 孙彩霞, 赵军波, 等. 2 型糖尿病视网膜病变患者血清 Chemerin、 $\text{TNF}-\alpha$ 及 Cys C 水平变化及其临床意义. *现代生物医学进展* 2019;19(22):4392-4395
- 14 王慧娟. 2 型糖尿病肾病与血清 VEGF、Cys C 水平的相关性研究. *泰山医学院* 2018
- 15 任安义. HCY、Cys C 及 IL-8 对糖尿病肾病早期诊断的意义. *国际检验医学杂志* 2017;38(10):1432-1433

- 16 翟红艳, 王亚娇. 趋化素、肿瘤坏死因子- α 与 2 型糖尿病视网膜病变的相关性. 眼科新进展 2015;35(7):667-669
- 17 Elsayed MS, El Badawy A, Ahmed A, *et al.* Serum cystatin C as an indicator for early detection of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr* 2019;13(1):374-381
- 18 孙卫华, 张晓梅, 李晓丽, 等. Hcy、CysC 和 VEGF 与 2 型糖尿病微血管病变的关系研究. 中华全科医学 2014;12(10):1547-1549
- 19 Lu JW, Wang H, Ji YL, *et al.* Differential effects of pyrrolidine dithiocarbamate on TNF- α -mediated liver injury in two different models of fulminant hepatitis. *J Hepatol* 2008;48(3):442-452
- 20 Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, *et al.* Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *Diabetes* 2001;50(12):2792-2808
- 21 Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, *et al.* Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free Radic Res* 2003;37(11):1169-1180
- 22 何煜, 夏宁. 胱抑素 C 与 2 型糖尿病慢性并发症关系的研究进展. 医学综述 2013;19(11):2032-2035
- 23 Yang HY, Wang C, Guo MZ, *et al.* Correlations between peroxisome proliferator activator receptor γ , Cystatin C, or advanced oxidation protein product, and atherosclerosis in diabetes patients. *Pathol Res Pract* 2015;211(3):235-239
- 24 Jeon YL, Kim MH, Lee WI, *et al.* Cystatin C as an early marker of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Clin Lab* 2013;59(11-12):1221-1229
- 25 赖静怡, 张颖栩, 黄焕葵. 血清胱抑素 C 及血脂水平与糖尿病视网膜病变的关系研究. 国际眼科杂志 2015;15(11):2003-2005
- 26 黄秋菊, 李玉兰, 韦秀英, 等. 胱抑素 C、尿微量白蛋白肌酐比值与胱抑素 C 基因多态性老年糖尿病视网膜病变的相关性. 中国老年学杂志 2018;38(21):5162-5165
- 27 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版). 中国实用内科杂志 2018;38(4):292-344
- 28 韩静, 闫小龙, Xiaoxi Qiao. 二甲双胍对炎症状态下人视网膜血管内皮细胞生物学行为的保护作用及其机制. 中华实验眼科杂志 2017;35(7):581-585
- 29 冯丽洁, 李俊. 二甲双胍与有氧运动对 2 型糖尿病大鼠血管氧化应激的影响. 中国比较医学杂志 2019;29(4):58-63, 81
- 30 Gao WW, Zhao ZL, Yu GJ, *et al.* VEG1 attenuates the inflammatory injury and disruption of blood-brain barrier partly by suppressing the TLR4/NF- κ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 2015;1622:230-239
- 31 Cui L, Feng L, Zhang ZH, *et al.* The anti-inflammation effect of baicalin on experimental colitis through inhibiting TLR4/NF- κ B pathway activation. *Int Immunopharmacol* 2014;23(1):294-303
- 32 Zhu XC, Jiang T, Zhang QQ, *et al.* Chronic metformin preconditioning provides neuroprotection via suppression of NF- κ B-mediated inflammatory pathway in rats with permanent cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2015;52(1):375-385