

白细胞淤滞对糖尿病视网膜病变作用的研究

邴寒,唐杰,安小玲,赫红丹

作者单位:(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,黑龙江省医院南岗分院眼科
作者简介:邴寒,男,硕士,主治医师,研究方向:糖尿病视网膜病变。
通讯作者:邴寒. hljsybinghan@163.com
收稿日期:2011-11-16 修回日期:2011-12-23

Study of the effect of leukostasis in diabetic retinopathy

Han Bing, Jie Tang, Xiao-Ling An, Hong-Dan He

Department of Ophthalmology, Nangang Branch, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Han Bing. Department of Ophthalmology, Nangang Branch, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. hljsybinghan@163.com
Received:2011-11-16 Accepted:2011-12-23

Abstract

• **AIM:** To investigate the leukostasis and expression of ICAM-1 in 10 weeks diabetic mice retina.
• **METHODS:** Forty-five C57 mice (20-25g) were randomly divided into two groups. There were twenty-two mice in diabetic group and twenty-three mice in normal group. The leukostasis in diabetic retinopathy was counted and the expression of VEGF and ICAM-1 was studied by Western Blot.
• **RESULTS:** Ten weeks postoperatively, the number of leukocyte was significantly high in diabetic retinopathy ($P < 0.01$). The expression of VEGF and ICAM-1 was significantly increased in diabetic group ($P < 0.05$).
• **CONCLUSION:** The no perfusion of retinal blood capillary is related to leukostasis in early diabetic retinopathy.
• **KEYWORDS:** retina; leukocyte; diabetic retinopathy; ICAM-1

Bing H, Tang J, An XL, *et al.* Study of the effect of leukostasis in diabetic retinopathy. *Guji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2012;12(2): 218-220

摘要

目的:观察糖尿病小鼠视网膜血管内白细胞淤滞和细胞间黏附因子-1(ICAM-1)在视网膜的表达。
方法:选取 C57 型小鼠 45 只,随机分为 2 组:糖尿病组 22 只、正常组 23 只。10wk 后取视网膜,荧光显微镜计数小鼠全视网膜微血管内淤滞的白细胞数目及其含有 ICAM-1 表达的荧光小球数目,免疫蛋白印迹法检测视网膜血管内皮生长因子(VEGF)和 ICAM-1 的表达。
结果:10wk 后,糖尿病小鼠视网膜血管内白细胞数目及含

有 ICAM-1 表达的荧光小球数目明显高于正常对照组($P < 0.01$),其视网膜内 VEGF 和 ICAM-1 明显增加,有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:视网膜血管内白细胞淤滞与糖尿病视网膜病变(DR)早期的视网膜毛细血管无灌注有关。

关键词:视网膜;白细胞;糖尿病视网膜病变;细胞间黏附因子-1

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.02.08

邴寒,唐杰,安小玲,等.白细胞淤滞对糖尿病视网膜病变作用的研究.国际眼科杂志 2012;12(2):218-220

0 引言

当今,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是成年人视力丧失的主要原因,其发病率正在逐年增加。糖尿病患者视网膜血管病理改变包括:凋亡的周细胞、无细胞血管的形成、基底膜的增厚。早期表现为,血管通透性增加和毛细血管阻塞。目前发病机制不十分清楚,但有研究表明,DR 与炎症有相关性^[1]。白细胞黏附到血管壁,不仅是炎症的一个过程,也可能是毛细血管阻塞的主要因素^[2]。研究发现,糖尿病大鼠视网膜血管最早期的病理表现为血管内白细胞增多^[3]和聚集,导致血-视网膜屏障的破坏,毛细血管无灌注和内皮细胞损害和死亡^[4],其结果是视网膜的缺血,血管内皮生长因子(VEGF)增加。当视网膜和玻璃体 VEGF 水平达到一定阈值时,视网膜新生血管(CNV)形成,导致糖尿病患者的视功能减退。内皮细胞间黏附因子-1(ICAM-1)是最早发现的免疫蛋白超家族黏附分子之一^[5],本实验研究观察了糖尿病小鼠视网膜血管内白细胞淤滞和 ICAM-1 在视网膜的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 C57 型小鼠 45 只,体质量 20~25g,随机分为 2 组:糖尿病组和正常组。24h 禁食后,ip 链脲佐菌素(45mg/kg)诱发糖尿病,1wk 后证实糖尿病组 22 只,正常组 23 只,2~3d 测尿量,1wk 测一次血糖,1mo 测一次糖化血红蛋白,当糖尿病小鼠的体质量下降严重时,用胰岛素维持糖尿病小鼠的体质量,10wk 后收获眼及视网膜。

1.2 方法

1.2.1 视网膜血管内白细胞的检测 小鼠用氯胺酮(100mg/mL)深度麻醉后,打开心腔,从左心室插入 6G 灌注针头到主动脉并固定,将灌注的压力调整到 250mmHg。灌注方法:9g/L 生理盐水循环为 1~2min,使红细胞及未黏附的白细胞全部除掉,然后灌注荧光染色剂(Fluorescen-Coupled ConcanavaLinA Lectin, 20mg/mL)循环 5min,目的是使黏着的白细胞和血管着色,9g/L 生理盐水冲洗 1min,以除掉过量的染色剂。完成灌注后,取出眼球并分离出视网膜,将其铺平在载玻片上,通过荧光显微镜(Zwiss, lankeweed. NJ)计数小鼠全视网膜微血管内淤滞的白细胞数目。

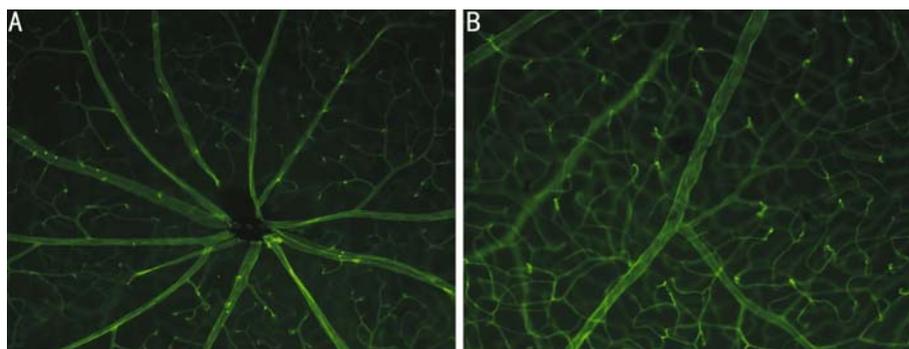


图1 糖尿病小鼠视网膜血管内的白细胞黏附情况 A:糖尿病组;B:对照组。

1.2.2 视网膜 ICAM-1 的检测 将荧光小球 (Fluorescent Microsphere; Thermo Scientific, NA, USA) 培育在 0.3mg/mL Protin A 溶液中 1h 后,用 10mL/L BSA 冲洗 2 次,离心,除掉上清液后,培育在 10mL/L BSA 溶液中 30min,稀释抗体 ICAM-1 (Preduction Description, illinesis, USA) 到 0.1mg/mL。培育在 4℃ 冰箱中 2 ~ 7d,从小鼠尾静脉注入 200 μ L 含有 ICAM-1 抗体和荧光小球的 10mL/L BSA 溶液,30min 后,麻醉动物,并通过上述的心脏灌注法使其循环到眼内,取出眼球并分离出视网膜,铺平在载玻片上,通过荧光显微镜计数视网膜显示出的荧光红点数目,即是荧光小球内含有 ICAM-1 的表达。

1.2.3 免疫蛋白印迹法检测视网膜 VEGF 和 ICAM-1 的表达 将新鲜的视网膜超声粉碎离心后,测量蛋白质的浓度。将等量的蛋白质 50 μ g 置 SDS-PAGE 胶上进行电泳,再转移至硝酸纤维素膜。并应用抗体 VEGF (R&D, Inc, USA) 1:5000 稀释和抗体 ICAM-1 (Santa Cruz, CA) 1:200 稀释,与其含有蛋白质的硝酸纤维素膜反应,蛋白质的条带通过加强的光化学发光剂 (Santa Cruz, USA) 反应后,扫描、评价和分析,应用抗体 Actin (Sigma, USA) 证实,等量的蛋白质加到 SDS-PAGE 胶上。

统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件进行分析,根据各变量的分布特征进行秩和检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 10wk 时正常对照组的小鼠血糖的水平为 145.2 \pm 29.9mg/dL,所有糖尿病小鼠的血糖及糖化血红蛋白值均明显高于正常对照组,糖尿病小鼠的体质量虽然通过胰岛素的治疗来维持体质量,但是仍不能保持正常的生长速度,并且明显低于正常组(表 1)。

2.2 视网膜血管内的白细胞淤滞 白细胞数目黏附于血管壁,10wk 时糖尿病小鼠视网膜血管内白细胞数目明显高于正常对照组($P < 0.01$)。淤滞的特点是:(1)糖尿病组毛细血管内白细胞数目多见于大血管;(2)静脉多于动脉;(3)白细胞可黏附在微血管的分支处、大血管分支处(表 2,图 1)。

2.3 视网膜荧光小球结合后 ICAM-1 在视网膜的表达 视网膜荧光小球内 ICAM-1 的表达:正常对照组 4.5 \pm 1.3,糖尿病组 9.8 \pm 2.9,二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠 10wk 时糖化血红蛋白和血糖及体质量情况

分组	糖化血红蛋白(%)	血糖(mg/dL)	体质量(g)
正常对照组	2.9 \pm 0.11	145.0 \pm 29.9	38.5 \pm 3.7
糖尿病组	10.2 \pm 1.5	344.4 \pm 71.2	29.7 \pm 2.6

表 2 视网膜血管内白细胞的数目 ($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2)

分组	动脉	静脉	毛细血管	总计
正常对照组	1.1 \pm 0.3	1.7 \pm 0.5	5.6 \pm 1.1	8.4 \pm 1.7
糖尿病组	4.0 \pm 1.3	6.8 \pm 2.4	12.8 \pm 4.8	23.6 \pm 8.5

2.4 视网膜 VEGF 和 ICAM-1 的表达 视网膜 VEGF 的表达:正常对照组 0.95 \pm 0.25,糖尿病组 1.25 \pm 0.43。视网膜 ICAM-1 的表达:正常对照组 4.5 \pm 1.3,糖尿病组 9.8 \pm 2.9。表明 10wk 时糖尿病小鼠视网膜导致视网膜内 VEGF 和 ICAM-1 的明显增加,有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

DR 最早期的一个临床特点为视网膜毛细血管无灌注,继而引起周围毛细血管扩张,导致血-视网膜屏障破坏和内皮细胞损害和死亡,导致视网膜的缺血和 VEGF 形成,发展至临床增殖型糖尿病视网膜病变(PDR)。因此有研究推测视网膜毛细血管阻塞到无灌注是 CNV 形成的开始^[4]。目前视网膜毛细血管无灌注的准确机制仍不十分清楚,但增加的证据指出白细胞和内皮细胞黏着导致视网膜血管内白细胞淤滞是一个早期的表现,并与视网膜毛细血管无灌注和 DR 早期发展有关^[6]。我们的研究说明,10wk 时糖尿病小鼠视网膜血管内白细胞的淤滞明显高于正常组,具有统计学意义($P < 0.01$),与目前的研究报道一致^[1]。

白细胞淤滞在视网膜血管可能有以下几种原因:(1)视网膜血管是末梢血管,白细胞体积大、僵硬,不像红细胞在血管中易变形,尤其当血管内阻力变化时。本研究结果显示,视网膜毛细血管内白细胞淤滞的数目多于视网膜大血管,视网膜静脉多于视网膜动脉,并在毛细血管分叉处更易发生。白细胞几乎可以阻塞整个毛细血管内腔,使局部血流减少,或无血流通过。(2)视网膜细胞黏附因子的表达增加是白细胞淤滞在视网膜内血管的另一个原因。由于视网膜内 ICAM-1 的表达增加,使白细胞和视网膜之

间的黏附力增加,这样也促进了白细胞在视网膜血管内的淤滞^[9,10]。本研究通过两种方法研究都证实,10wk时糖尿病小鼠视网膜内ICAM-1的表达是增加的,具有统计学意义($P < 0.05$)。有研究报道ICAM-1不仅调节着白细胞黏附到视网膜血管,而且也参与炎症与缺血的发生和发展^[2]。白细胞淤滞在视网膜血管内可能引起管腔阻塞,血流减少或没有,达到一定的阈值后,视网膜内皮生长因子形成,即VEGF的表达增加,这是新生血管形成的关键因素。本研究中10wk时糖尿病小鼠视网膜内VEGF的表达和正常对照组比较是增加的,但没有统计学意义($P > 0.05$),我们考虑可能与病程即糖尿病本身因素有关。有研究显示VEGF也可以增加ICAM-1表达^[7]。(3)高血糖是DR发生的主要因素是公认的。它引起细胞内代谢的异常,以致某些代谢产物引起视网膜毛细血管内皮细胞或周细胞凋亡,及血糖在体内的升高又引起血液成分的改变,从而产生血管内灌注压下降。一旦白细胞黏附到血管壁上,就将释放自由基和酶,这样也可以引起血管的通透性增加和内皮细胞的损害。至于白细胞淤滞的具体类型,将是我们进一步研究的方向。

参考文献

1 Shelton MD, Kern TS, Mieczal JJ. Activation of NFkB and Increased

Pro-Inflammatory ICAM-1 in Retinal Glial (Müller) Cells in High Glucose, a Model of Diabetic Retinopathy, is Mediated via Upregulation of Glutaredoxin. *FASEB J* 2007;21:A1036

2 Kern TS, Du Y, Levin LA. Bcl-2, Endothelial Death, and Capillary Degeneration in Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:3638

3 Jousen AM, Huang S, Poulaki V, et al. In vivo Retinal Gene Expression in Early Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(12): 3047-3057

4 Skondra D, Noda K, Almulki L, et al. Characterization of Azurocidin as a Permeability Factor in the Retina: Involvement in VEGF-Induced and Early Diabetic Blood-Retinal Barrier Breakdown. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(2): 726-731

5 Lu M, Amano S, Miyamoto K, et al. Insulin-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40 (13):3281-3286

6 J Zhang J Marshall, R Chibber, J Hillenkamp and J Marshall. Establishment of an In vitro model of human RPE/Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43;E- abstract693

7 Zhang XL, Wen L, Chen YJ, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1 in retinal endothelial cells via reactive oxygen species, but not nitric oxide. *Chin Med J* 2009;122(3):338-343