

维生素 D₃ 联合 rhG-CSF 对糖尿病小鼠眼部结构的保护作用

赖铭莹, 应方微, 刘梅

基金项目: 中国广东省卫生厅科研基金资助项目 (No. A2008614)
作者单位: (518040) 中国广东省深圳市, 暨南大学附属深圳眼科医院
作者简介: 赖铭莹, 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 青光眼、眼底病和白内障。
通讯作者: 赖铭莹. yingfangwei@yahoo. com. cn
收稿日期: 2010-12-01 修回日期: 2011-01-24

Protective effect of vitamin D₃ combined with rhG-CSF on ocular structure of diabetic mice

Ming-Ying Lai, Fang-Wei Ying, Mei Liu

Foundation item: Scientific Research Foundation of Health Department of Guangdong Province, China (No. A2008614)
Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ming-Ying Lai. Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. yingfangwei@yahoo. com. cn

Received: 2010-12-01 Accepted: 2011-01-24

Abstract

• **AIM:** To study the protective effect of vitamin D₃ (VD₃) combined with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on ocular structure of experimental diabetic mice.

• **METHODS:** Of 22 mice (C57/BL6 rats weighing 20-25g), 3 healthy rats were chosen for blank control after glucose analysis. The others were diabetic models produced by 20g/L streptozotocin (STZ) injection (175mg/kg intraperitoneally in citrate buffer) after fasting for 15 hours. Blood was obtained from a tail vein to make glucose analysis 3 times in the third day after STZ injection (blood glucose concentration > 16.7mmol/L as diabetic model). They were randomly distributed into two groups: experimental group (E group), control group (C group). In 14th day after STZ injection, E group animals were treated with VD₃ 5mg/kg intraperitoneally once a week; In 28th day after STZ injection, with hypodermic injection of rhG-CSF 20μg/kg per days for 5 consecutive days. At the 7th, 14th, 21st, 28th, 35th, 42nd, 49th day, blood sugar monitoring, direct ophthalmoscope examination and thickness measurement were taken by pathologic

analyzing software. Data were processed by SPSS 16.0.

• **RESULTS:** Corneal edema of C group lasted from 1st week to 7th week. After combined treatment, corneal edema turned better ($F = 1668.887, P = 0.00$). Two groups had significant difference at different time ($F = 546.835, P = 0.00$). There were significant interaction effects between the time and group factors ($F = 163.566, P = 0.00$). At 5th week, corneal epithelium atrophy of C group was significant ($F = 96.914, P = 0.00$), E group was near normal ($P > 0.05$). Choroid membrane atrophy of C group lasted from 1st week to 7th week. E group had protective effects on choroid membrane ($F = 1579.832, P = 0.00$). Both groups had atrophy of the retina, but E group was better than C group ($F = 531.239, P = 0.00$).

• **CONCLUSION:** VD₃ combined with rhG-CSF has significant protective effect on ocular structure of experimental diabetic mouse.

• **KEYWORDS:** Vitamin D₃; rhG-CSF; diabetic; ocular; protection

Lai MY, Ying FW, Liu M. Protective effect of vitamin D₃ combined with rhG-CSF on ocular structure of diabetic mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(3):411-413

摘要

目的: 探讨维生素 D₃ (VD₃) 联合 rhG-CSF 对实验性糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 小鼠眼部结构损伤的作用。

方法: 健康 C57BL/6 小鼠 22 只, 体质量 20 ~ 25g, 随机分为联合治疗实验组、DM 对照组, 并设健康对照。用 20g/L 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) ip, 制备实验性 DM 模型, 实验组小鼠制模后 14d 行 VD₃ 5mg/kg ip, 1 次/wk; 制模后 28d 行 20μg/kg rhG-CSF sc, 1 次/d, 连续注射 5d。两组每周进行血糖监测和眼底镜观察。每周各组随机摘取 3 只眼球, 常规病理制片后镜下观察眼球各部分结构, 利用病理图像分析系统测量中央角膜、视乳头旁 1PD 处脉络膜厚度和视网膜神经上皮层的厚度。

结果: DM 小鼠 7d 角膜中央出现明显水肿, 21d 达高峰后逐渐减轻, 经联合治疗后小鼠角膜厚度一直呈现减少趋势, 水肿情况比 DM 对照组有明显缓解, 接近健康小鼠平均值。DM 小鼠 7d 角膜上皮厚度明显增加, 21d 达高峰后逐渐下降, 到 35d 后 DM 对照组角膜上皮厚度持续下降, 萎缩明显, 联合治疗组的角膜上皮厚度接近正常 ($P > 0.05$)。DM 小鼠 7d 脉络膜厚度降低, 开始萎缩, 逐渐加剧, 联合治疗组在 28d 后脉络膜厚度明显增加, 到 49d 时与正常小鼠无差异, 两组 DM 小鼠的视网膜神经上皮层厚

度均呈逐渐下降趋势,联合治疗组的下降趋势略缓和。
结论:VD₃联合 rhG-CSF 治疗能有效缓解小鼠 DM 角膜水肿,改善角膜上皮萎缩,有效缓解并改善脉络膜萎缩,对视网膜神经上皮层萎缩也有一定的保护作用。
关键词:维生素 D₃;rhG-CSF;糖尿病;眼;保护
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.03.011

赖铭莹,应方微,刘梅. 维生素 D₃联合 rhG-CSF 对糖尿病小鼠眼部结构的保护作用. 国际眼科杂志 2011;11(3):411-413

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)眼病是眼科常见的致盲性疾病,维生素 D₃(VD₃)对 DM 有一定的治疗作用,而 rhG-CSF 则有助于修复受损组织,我们用 VD₃联合 rhG-CSF 治疗实验性 DM 小鼠,以了解其对 DM 眼病损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 C57BL/6 小鼠 22 只(广东实验动物中心提供)体质量 20~25g,链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma),重组人粒细胞刺激因子(rhG-CSF,山东齐鲁制药有限公司),病理图像分析系统(深圳高通影像)。

1.2 方法 随机选取 8 只小鼠为联合治疗实验组,取 11 只小鼠为 DM 对照组,并取 3 只小鼠做为健康对照。实验组及 DM 对照组小鼠在禁食 15h 后 ip 20g/L STZ,175mg/kg,制造实验性 DM 模型,第 3d 剪尾测定血糖 3 次,血糖 > 16.7mmol/L 为制模成功。实验组小鼠在第 14d 行 ip VD₃, 5mg/kg,注射 1 次/wk;第 28d 行 sc rhG-CSF 20μg/kg, 1 次/d,连续 5d。每周进行血糖监测、直接眼底镜镜检查,第 7 和 14d,DM 对照组分别取 3 只眼球;第 21,28,35, 42 和 49d,联合治疗实验组和 DM 对照组分别摘取 3 只眼球。甲醛固定后,经视神经与角膜中央,沿纵切面切开眼球,常规脱水包埋后,制作连续切片 10 张,镜下观察眼球各部分结构并照相,利用病理图像分析系统测量中央角膜厚度、视乳头旁 1PD 处脉络膜及视网膜神经上皮层的厚度,每张切片测量 3 个数据。

统计学分析:利用 SPSS 16.0 统计软件,采用重复测量资料的方差分析法评价 VD₃联合 rhG-CSF 对实验性 DM 小鼠眼部结构损伤的影响, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 眼病理 两组 DM 小鼠第 21d 均开始出现眼底出血,第 28d 均可见明显眼底出血,两组眼底出血情况无明显差异。DM 对照组小鼠第 7d 角膜明显水肿,视网膜神经上皮层可见明显的凹凸不平,轻度水肿,脉络膜开始出现萎缩;第 14d 开始出现视网膜新生血管;第 21d 视网膜神经上皮层开始萎缩;第 35d 角膜上皮开始萎缩(表 1)。

2.2 角膜 健康小鼠角膜平均厚度为 $166.7 \pm 4.6\mu\text{m}$ 。DM 小鼠第 7d 角膜即出现明显水肿,角膜平均厚度为 $339.1 \pm 11.1\mu\text{m}$,水肿加剧在 21d 达到高峰,以后水肿虽然持续,但呈逐渐减轻趋势,可能是对高血糖已适应;经 VD₃联合 rhG-CSF 治疗后,小鼠角膜中央平均厚度一直呈减少趋势,水肿情况较对照组有明显缓解,逐渐接近正常小鼠角膜平均厚度,联合治疗能够有效缓解小鼠 DM 角膜水肿的

情况。经析因设计的方差分析检验结果显示,两组间差异明显且与健康对照组有差异($F = 1668.887, P = 0.00$);两组不同时间之间有显著差异($F = 546.835, P = 0.00$);分组与时间的交互效应显著($F = 163.566, P = 0.00$)。健康小鼠的角膜上皮平均厚度为 $78.5 \pm 6.3\mu\text{m}$ 。DM 小鼠第 7d 角膜上皮厚度明显增加,DM 对照组在第 21d 达到高峰,之后角膜上皮厚度呈现逐渐下降的趋势,这与其 DM 性角膜水肿的情况相一致,同时联合治疗组角膜上皮厚度一直呈下降趋势;直到第 35d,两组 DM 小鼠角膜上皮平均厚度均接近正常小鼠($P > 0.05$);此后 14d 则出现明显的差异,对照组角膜上皮厚度持续下降,较正常均值明显减少,萎缩明显,联合治疗组的角膜上皮平均持续稳定,与正常均值无明显差异($P > 0.05$),联合治疗能够有效改善 DM 小鼠角膜上皮的萎缩情况(表 1)。经析因设计的方差分析检验结果显示,组间差异明显($F = 96.914, P = 0.00$);两组不同时间之间有显著差异($F = 87.075, P = 0.00$);分组与时间的交互效应显著($F = 23.994, P = 0.00$)。

2.3 脉络膜 健康小鼠视乳头旁 1PD 处脉络膜平均厚度为 $111.3 \pm 3.5\mu\text{m}$ 。DM 小鼠第 7d 的脉络膜平均厚度为 $106.5 \pm 3.0\mu\text{m}$,并开始萎缩,DM 对照组随时间延长,萎缩情况逐渐加剧,至第 49d 平均厚度仅为 $45.6 \pm 2.9\mu\text{m}$ 。经联合治疗后,第 21d 脉络膜平均厚度的下降趋缓,脉络膜萎缩趋势较对照组减缓,至 28d 达到最低点,之后脉络膜平均厚度开始明显增加,到第 49d 时已经与正常脉络膜厚度无差异($P > 0.05$),联合治疗能够有效缓解并改善脉络膜萎缩情况(表 1)。经析因设计的方差分析检验结果显示,组间差异明显($F = 1579.832, P = 0.00$);各组不同时间之间有显著差异($F = 130.557, P = 0.00$);分组与时间的交互效应显著($F = 99.380, P = 0.00$)。

2.4 视网膜神经上皮层 健康小鼠视网膜神经上皮层平均厚度为 $557.6 \pm 8.6\mu\text{m}$ 。DM 小鼠第 7d 可见视网膜神经上皮层明显的凹凸不平,轻度水肿,平均厚度为 $615.8 \pm 1.6\mu\text{m}$ ($P = 0.000$)。两组 DM 小鼠的视网膜神经上皮层平均厚度均呈逐渐下降趋势,随时间延长,DM 造成的视网膜神经上皮层萎缩加剧两组 DM 小鼠的视网膜神经上皮层平均厚度呈逐渐下降趋势,但联合治疗组的下降趋势略缓和(表 1)。经析因设计的方差分析检验结果显示,组间差异明显($F = 531.239, P = 0.00$);各组不同时间之间有显著差异($F = 235.956, P = 0.00$);分组与时间的交互效应显著($F = 59.262, P = 0.00$)。

3 讨论

维生素 D 受体(VDR)存在于外周血单核细胞和活化的 T 细胞中,还广泛存在于视网膜中,VD₃可能可以保护 DM 患者的视网膜^[1]。VD₃还可以增强胰岛素的敏感性及胰岛素的分泌^[2],这对控制高血糖症,减轻角膜水肿起到了重要作用。维生素 D 与 VDR 结合后,通过基因调节的方式发挥各种作用,当其浓度达到 10^{-10} mol/L(超过生理浓度 100~1000 倍)时可发挥它的抗炎和免疫调节作用^[3]。骨髓干细胞在骨髓、外周血和缺血部位的迁移和分化受多种因素的调控^[4,5],包括致炎因子如单核细胞集落刺激因子(monocyte colony-stimulating factor)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor)等。研究表明,自

表 1 糖尿病小鼠联合治疗后眼部结构厚度

($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

分组	7d	14d	21d	28d	35d	42d	49d
角膜							
联合治疗	339.1 ± 11.1	327.7 ± 12.0	253.6 ± 7.1	228.8 ± 12.4	179.6 ± 14.1	177.7 ± 22.0	172.7 ± 17.4
DM 对照	339.1 ± 11.1	327.7 ± 12.0	357.4 ± 9.9	255.9 ± 19.7	211.6 ± 15.1	198.8 ± 12.3	190.3 ± 26.0
角膜上皮层							
联合治疗	133.5 ± 2.4	121.2 ± 8.6	110.3 ± 16.4	90.1 ± 7.5	76.4 ± 6.0	80.1 ± 3.4	82.4 ± 5.1
DM 对照	133.5 ± 2.4	121.2 ± 8.6	125.4 ± 5.0	90.9 ± 2.7	74.6 ± 4.4	71.3 ± 0.8	67.6 ± 2.0
脉络膜							
联合治疗	106.5 ± 3.0	83.7 ± 0.5	75.3 ± 2.0	65.6 ± 9.5	79.9 ± 4.1	92.1 ± 11.0	110.0 ± 10.1
DM 对照	106.5 ± 3.0	83.7 ± 0.5	67.1 ± 1.6	58.1 ± 2.1	53.2 ± 1.1	49.5 ± 0.6	45.6 ± 2.9
视网膜神经上皮层							
联合治疗	615.8 ± 1.6	594.3 ± 19.5	335.0 ± 18.3	310.6 ± 21.7	285.6 ± 8.1	277.3 ± 11.1	268.5 ± 14.1
DM 对照	615.8 ± 1.6	594.3 ± 19.5	351.9 ± 10.4	305.8 ± 32.0	268.3 ± 17.1	260.6 ± 14.7	254.9 ± 11.1

体骨髓干细胞滴眼能够有效的帮助修复角膜化学性烧伤^[6],而 rhG-CSF 则可以减少实验性视网膜新生血管的形成,帮助受损组织纤维性修复^[7]。

本研究显示 DM 小鼠角膜水肿,厚度增加,其机制可能在于高血糖症通过诱导局部传导酶的灭活和细胞内肌醇的抑制,导致了内皮细胞中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性下降。研究中还发现联合治疗对 DM 性角膜水肿有明显的缓解作用,且能够缓解角膜上皮萎缩,同时对脉络膜萎缩有保护作用。这些作用除了药物对高血糖症的控制,也可能与 VD_3 能减少角膜炎症和新生血管的形成,以及 rhG-CSF 发挥的作用有关。我们的研究结果还显示,视网膜神经上皮作为神经组织,损伤后难以恢复,而联合治疗虽然不能扭转其萎缩的趋势,但也有一定的缓解作用。

DM 常常引起包括 DM 性角膜病变、青光眼、及 DM 视网膜病变在内的多种眼部并发症,是眼科较常见的难治性致盲眼病。本研究的结果表明, VD_3 联合骨髓动员对实验性 DM 小鼠角膜及脉络膜有保护作用,但其对已萎缩的视网膜神经上皮修复作用有限。因而将联合治疗应用于临床保护患者眼部结构和功能尚需要进一步的深入研究。

参考文献

- 1 Taverna MJ, Selam JL, Slama G, *et al.* Association between a protein polymorphism in the start codon of the vitamin D receptor gene and severe diabetic retinopathy in C-peptide-negative type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(8): 4803-4808
- 2 Chiu KC, Chu A, Go VL, *et al.* Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(5):820-825
- 3 Mathieu C, Van Etten E, Decallonne B, *et al.* Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D3 as modulators in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90(1-5):449-452
- 4 Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005;45(3):321-325
- 5 Urbich C, Aicher A, Heeschen C, *et al.* Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39(5):733-742
- 6 应方微,黄丽娜,赖铭莹,等. 自体骨髓干细胞促进角膜苯酚烧伤愈合的实验研究. *国际眼科杂志* 2008;8(9):1798-1800
- 7 赖铭莹,应方微. 骨髓干细胞动员对激光诱导视网膜新生血管产生的影响. *中国实用眼科杂志* 2010;28(2):121-123