

# 糖尿病大鼠早期视网膜形态观察和 Bcl-2、Bax 及 VEGF 表达的意义

宋丽君<sup>1,2</sup>, 王 艺<sup>2,3,4</sup>, 陈 迪<sup>2,3,4</sup>, 高富军<sup>1</sup>, 丁 豪<sup>5</sup>, 李玉明<sup>5</sup>, 钟 萌<sup>5</sup>

基金项目:泰安市科技计划发展项目(No. 2015NS1119)

作者单位:<sup>1</sup>(276000)中国山东省临沂市,山东省鲁南眼科医院;

<sup>2</sup>(271000)中国山东省泰安市,泰山医学院附属医院眼科;

<sup>3</sup>(271016)中国山东省泰安市,泰山医学院眼视光学系;

<sup>4</sup>(271016)中国山东省泰安市,泰山医学院眼视光研究所;

<sup>5</sup>(271000)中国山东省泰安市,泰山医学院基础医学院

作者简介:宋丽君,女,毕业于泰山医学院,硕士研究生,住院医师,助教,研究方向:眼底病。

通讯作者:王艺,男,毕业于韩国全北大学,医学博士,副教授,副主任医师,泰山医学院眼视光学系副主任,眼视光研究所所长,研究方向:青光眼、眼底病、眼视光。346048368@qq.com

收稿日期:2018-05-19 修回日期:2018-10-11

## Retinal morphology and expression of Bcl-2, Bax and VEGF in early diabetic rats

Li-Jun Song<sup>1,2</sup>, Yi Wang<sup>2,3,4</sup>, Di Chen<sup>2,3,4</sup>, Fu-Jun Gao<sup>1</sup>, Hao Ding<sup>5</sup>, Yu-Ming Li<sup>5</sup>, Meng Zhong<sup>5</sup>

Foundation item: Tai'an Science and Technology Development Project (No. 2015NS1119)

<sup>1</sup>Shandong Lunan Eye Hospital, Linyi 276000, Shandong Province, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Taishan Medical University, Tai'an 271000, Shandong Province, China;

<sup>3</sup>Department of Optometry, Taishan Medical University, Tai'an 271016, Shandong Province, China;

<sup>4</sup>Institute of Optometry, Taishan Medical University, Tai'an 271016, Shandong Province, China;

<sup>5</sup>Basic Medical College, Taishan Medical University, Tai'an 271000, Shandong Province, China

Correspondence to: Yi Wang. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Taishan Medical University, Tai'an 271000, Shandong Province, China. 346048368@qq.com

Received:2018-05-19 Accepted:2018-10-11

## Abstract

• AIM: To investigate the expression and significance of B-cell lymphoma factor (Bcl-2), Bcl-2 Associated X protein (BAX) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retina of early diabetic rats.

• METHODS: An early diabetic retinopathy model was made in rat by intraperitoneal injection of streptozotocin (60mg/kg). The model rats were sacrificed at 4, 8, 12wk after the establishment of the model, and the eyeballs were removed to make paraffin section and retina sheets were prepared. HE staining was used to detect the retinal morphology and vascularity. Immunohistochemistry (IHC) was employed to examine

the expression of Bcl-2, Bax and VEGF in the retina. ADP enzyme staining were conducted to evaluate the retinal vascular morphologic change. Nikon-A1 laser confocal microscopy was used to detect the morphology, fluorescence intensity and distribution of Ca<sup>2+</sup> in retinal cells.

• RESULTS: In the diabetic group, the number of endothelial cells in the inner limiting membrane increased 12wk later. In diabetes mellitus group, there was no vascular area in the middle and peripheral retina, and no vascular area was significantly more than that in the blank control group ( $P < 0.05$ ). There were significant differences in the values of VEGF, Bcl-2 and Bax between diabetic rats and control group ( $P < 0.05$ ). Compared with diabetic rats at 4, 8, 12wk, the fluorescence concentration of calcium ions in RGCs increased gradually, and the ratio of fluorescence staining intensity increased significantly ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: The expressions of Bcl-2 and Bax were significantly increased, which upgraded the expression of VEGF in the retinas of early diabetic rats. Bcl-2, Bax and VEGF might play an important role in the neovascularization of the retinas in early diabetic rats.

• KEYWORDS: streptozotocin; vascular endothelial growth factor; neovascularization; retina; diabetic rats

Citation: Song LJ, Wang Y, Chen D, *et al.* Retinal morphology and expression of Bcl-2, Bax and VEGF in early diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(11):1951-1957

## 摘要

目的:探讨B-细胞淋巴瘤因子(B-cell lymphoma factor, Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-Associated X protein, Bax)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在早期糖尿病大鼠视网膜上的表达及意义。

方法:用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)腹腔注射(60mg/kg)制作大鼠早期糖尿病模型。于造模后4、8、12wk 颈椎脱臼法处死大鼠,取双眼全眼球组织做石蜡切片并做视网膜铺片,通过 HE 染色观察视网膜各层的形态学和血管分布变化;取双眼视网膜组织石蜡切片,通过免疫组化法检测 Bcl-2、Bax 和 VEGF 在视网膜组织中的表达。行 ADP 酶视网膜血管染色,观察视网膜血管形态变化。应用激光共聚焦显微镜检测视网膜细胞的形态、细胞中 Ca<sup>2+</sup> 的荧光强度和分布变化。

结果:糖尿病组造模 12wk 突破内界膜的内皮细胞核个数呈递增趋势。糖尿病组视网膜中周部和周边部可见无血

管区,无血管区面积也明显大于空白对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。糖尿病组大鼠 VEGF、Bcl-2 和 Bax 光密度值与空白对照组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。糖尿病组大鼠造模 4、8、12wk 比较, RGCs 内钙离子荧光浓度逐渐升高,荧光染色强度比值升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

**结论:**早期糖尿病大鼠视网膜的 Bcl-2 和 Bax 表达非常明显,从而上调 VEGF 的表达。Bcl-2、Bax 和 VEGF 是糖尿病视网膜病变中新生血管形成的重要影响因素。

**关键词:**链脲佐菌素;血管内皮生长因子;新生血管;视网膜;糖尿病大鼠

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.11.02

**引用:**宋丽君,王艺,陈迪,等. 糖尿病大鼠早期视网膜形态观察和 Bcl-2、Bax 及 VEGF 表达的意义. 国际眼科杂志 2018;18(11):1951-1957

## 0 引言

糖尿病引发的眼部疾病正日益受到重视,并且已成为主要的致盲性原因之一,而糖尿病视网膜病变已经成为糖尿病全身并发症中最严重的微血管病变之一<sup>[1]</sup>。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的发生发展和生长因子关系密切,现已证实诸多细胞因子,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等参与该病理过程<sup>[2]</sup>。近年来,随着对 Bcl-2 和 Bax 在 DR 发病过程中的研究,基本确定二者是糖尿病视网膜病变的关键因子,这为今后从分子水平治疗和预防 DR 的发生和发展有重要意义。本实验旨在通过观察糖尿病大鼠视网膜形态学表现以及 Bcl-2、Bax 和 VEGF 在视网膜的表达,以确定其在 DR 发生发展过程中的作用和意义,达到寻求新的治疗领域和方向的目的。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 180~200g 雄性 SD 大鼠 60 只,购自北京斯贝福实验动物有限公司,实验过程中饲养于泰山医学院生命科学研究中心 SPF 级动物房,置于 12h 亮和 12h 暗的环境中,所有实验操作均符合泰山医学院医学伦理审查委员会的标准,遵循 ARVO 眼科学和视觉科学学会的实验动物使用规范。腺苷二磷酸酶(adenosine diphosphatase, ADPase)试剂盒(美国 Sigma 公司);100g/L 水合氯醛(泰山医学院附属医院制剂室提供);兔抗大鼠 Bax 多克隆抗体(中国 Bioworld 公司);兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体(中国 Bioworld 公司);兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体(中国 Bioworld 公司);DM 4000B 显微图像处理系统(瑞士 Leica 公司);IX-100 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 实验分为空白对照组(BC 组)和糖尿病组(DM 组),其中 BC 组大鼠 24 只,DM 组大鼠 40 只。将 STZ 溶于 0.05mol/L 柠檬酸缓冲液(pH=4.5)中,配制成 10g/L 溶液,按 60mg/kg 对 DM 组大鼠进行腹腔注射,空白对照组注射等量的生理盐水。注射 STZ 后 3d 取尾静脉血检测血糖,达 11.1mmol/L 入选 DM 组(剔除 4 只

大鼠)。实验期间自由饮食,定期测血糖、体质量。于造模后 4、8、12wk 颈椎脱臼法处死大鼠。

**1.2.2 眼球取材和固定** 分别于 4、8、12wk 每个时间点处死糖尿病组大鼠 6 只,空白对照组 4 只,完整取出大鼠的双眼球,眼球内注射 4% 多聚甲醛固定 24h。沿角膜缘环形切开,剥除晶状体和玻璃体,将眼杯以 10% 甲醛溶液固定。组织依次经过软蜡和 3 次硬蜡,最后硬蜡包埋。然后连续切片,厚度为 4 $\mu$ m,备用于 HE 染色和免疫组织化学染色。

**1.2.3 视网膜苏木精-伊红(HE)染色** 应用二甲苯对石蜡切片脱蜡,并用 99.9%、97%、75%、50% 乙醇和蒸馏水依次清洗,苏木精染色 1~3min;自来水洗 1min,1% 盐酸酒精分化 20s;自来水洗 1min;PBS 返蓝 30s;自来水洗 1min,伊红染色 1min;自来水洗 30s,梯度酒精脱水;二甲苯透明,Histomount 封片,光镜下观察高倍镜下两组大鼠视网膜神经节细胞形态和突破内界膜内皮细胞核个数并拍照。

**1.2.4 免疫组织化学染色** 将石蜡切片置于烘箱中 58 $^{\circ}$ C 烤 1~2h;石蜡切片常规二甲苯脱蜡,取出切片置入 100% 乙醇,3min 依次置入 90%~70% 各级酒精中各 3min。PBS 洗 3 次 $\times$ 3min;用 0.01mol/L 柠檬酸钠抗原修复液(pH=6.0)煮沸热修复(95 $^{\circ}$ C,15min),保温 15min,室温自然冷却,PBS 洗 3 次 $\times$ 3min;30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制内源性过氧化物酶室温孵育 20min,PBS 洗 3 次 $\times$ 3min;100mL/L 正常胎牛血清室温孵育 30min,PBS 洗 3 次 $\times$ 3min;一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗 3 次 $\times$ 3min;二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h,PBS 洗 3 次 $\times$ 3min;DAB 显色 3~5min;苏木素复染 30s,盐酸酒精分化 1s;取出切片置入 70% 乙醇,3min 依次置入 90%~100% 各级乙醇中各 3min。脱水吹干后,树脂封片;镜下观察,细胞核呈紫蓝色,阳性产物呈棕黄色或黄色颗粒。

**1.2.5 视网膜 ADP 酶血管染色** 分别于 4、8、12wk 每个时间点处死糖尿病组大鼠 3 只,空白对照组 2 只,将双眼眼球用 4% 多聚甲醛溶液固定 10min,取出视网膜再放入多聚甲醛固定液中固定过夜,4 $^{\circ}$ C 时 50mmol/L pH=7.2 的 Tris 顺丁烯二酸缓冲液漂洗 15min $\times$ 5 次,以后加入 37 $^{\circ}$ C 新鲜配制的 0.2mol/L pH=7.2 的 Tris 顺丁烯二酸缓冲液(其中含硝酸铅 3mmol/L、氯化镁 6mmol/L、ADP 1mg/mL),37 $^{\circ}$ C 孵育 15min。再用室温 50mmol/L pH=7.2 的 Tris 顺丁烯二酸缓冲液漂洗 15min $\times$ 5 次,然后加入 1:10 硫化铵显色 1min。最后用室温 50mmol/L pH=7.2 的 Tris 顺丁烯二酸缓冲液漂洗 15min $\times$ 3 次。视网膜铺片腺苷二磷酸酶(adenosine diphosphatase, ADPase)酶染色,甘油封片保存,光镜观察。NIH Image (Scion Image)软件包计算视网膜无血管区面积。

**1.2.6 激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子浓度** 分别于 4、8、12wk 每个时间点处死大鼠 3 只,空白对照 2 只,大鼠应用 7% 水合氯醛腹腔麻醉,摘除双眼眼球后,在显微镜下沿角膜缘后 2mm 剪开眼球,取出角膜、晶状体和玻璃体后,分离视网膜,并将视网膜置于事先准备好的保存溶液中(保存溶液配比:NaCl 130, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 22, MgCl<sub>2</sub> 21, HEPES 10, glucose 20, 1mol/L NaOH 调节溶液最终 pH=7.4,单位 mmol/L)。Ca<sup>2+</sup> 荧光指示剂的选择:常规选用 Fluo-3/AM/Fluo-3/AM 进入细胞后,酯基被水

解掉,Fluo-3 与细胞内游离  $Ca^{2+}$  结合,因而其荧光强度可以反映细胞内游离  $Ca^{2+}$  的浓度。 $Ca^{2+}$  荧光探针负载:以无菌 D'-Hanks 液清洗各处理标本 3 次,加入适量的 Fluo-3/AM (终浓度为  $4\mu\text{mol/L}$ ) 和 Pluronic-F127 (终浓度为 0.05%),避光,37℃ 恒温轻轻振荡,孵育 45min。负载后的标本以含 2mL/L 牛血清白蛋白的 Hanks 液清洗 2 次,Hanks 液清洗 1 次,以充分洗去细胞外未负载的残余荧光染料。按上所述,向各实验组细胞中加入相应的孵育缓冲液,室温放置 20min,按实验设计作相应检测。激光共聚焦显微镜测定 [ $Ca^{2+}$ ]:应用 Nikon-A1 型激光扫描共聚焦显微镜操作系统的 488nm 通道激光系统,扫描 Fluo-3/AM 标记的  $Ca^{2+}$  反应物。扫描选用的参数为:激发光波长为 488nm,观测光波长为  $515\pm 15\text{nm}$ ,扫描方式为点扫描,Zoom 为 (1.0),像素为  $1048\times 1048$ 。经 NIS-Elements AR 软件 (4.2.0) 摄像,观察各标本细胞的形态、细胞中  $Ca^{2+}$  的荧光强度和分布变化。

统计学分析:采用 SPSS 20.0 统计软件包进行数据统计分析。计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,不同时间点的组间均数比较采用重复测量的方差分析,多组均数比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组大鼠不同时间点血糖和体质量变化情况** 空白对照组:24 只大鼠血糖无明显变化,饮水量、尿量正常,体质量随鼠龄增加呈上升趋势。糖尿病组:40 只大鼠注射 STZ,48h 后测血糖、尿糖,空腹血糖  $>11.1\text{mmol/L}$ 、尿糖 (+++) 共 36 只,4 只剔除,其血糖值见表 1 所示。方差分析结果显示,因素 1 (分组因素) 和因素 2 (时间点因素)  $P<0.001$  ( $F_{\text{分组}}=157.852, F_{\text{时间}}=65.163$ ),交互作用分析显示  $F_{\text{分组}\times\text{时间}}=59.938$  ( $P<0.001$ )。即两因素对空腹血糖值的变化均有影响,且具有交互作用。

随鼠龄增加,糖尿病组大鼠体质量初期改变不明显,之后呈缓慢增长趋势,最终呈现消瘦状态,其体质量变化如表 2 所示,与正常对照组各时间点比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。方差分析结果显示,两因素对大鼠体质量变化的影响均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}}=157.073, P<0.001; F_{\text{时间}}=349848.721, P<0.001$ );交互作用结果为  $F_{\text{分组}\times\text{时间}}=64189.073$  ( $P<0.001$ )。即分组因素和时间点因素对大鼠体质量的变化均有影响,且具有交互作用。

**2.2 两组大鼠不同时间点视网膜 HE 染色结果** 高倍镜下 ( $\times 400$ ) 空白对照组大鼠可见视网膜表面光滑,视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGCs) 排列整齐;内丛状染色较均匀;内核层和外核层细胞排列较整齐;视锥、视杆细胞排列整齐。糖尿病组大鼠 4、8wk 时的视网膜组织结构与空白对照组无明显差异;12wk 时,可见视网膜内界膜略肿胀,表面不平、增厚,偶有毛细血管内皮细胞突出于内界膜,突破内界膜的内皮细胞核个数呈递增趋势 (表 3),RGCs 排列不整齐 (图 1)。

### 2.3 两组大鼠不同时间点视网膜血管铺片形态学观察

空白对照组大鼠视网膜被血管完全覆盖,可见视网膜动脉和静脉各有 4~6 支分支自视乳头处放射状发出,血管分布均匀,走行自然,视网膜三层血管清晰可辨。糖

表 1 两组大鼠不同时间点空腹血糖变化 ( $\bar{x}\pm s, \text{mmol/L}$ )

时间	BC 组	DM 组
0wk	4.14±0.86	4.52±0.79
2wk	5.17±0.68 <sup>a</sup>	5.30±2.00
4wk	5.45±1.35 <sup>a</sup>	16.19±4.49 <sup>b,d</sup>
6wk	5.45±0.81 <sup>a</sup>	19.58±1.52 <sup>b,d</sup>
8wk	5.36±0.62 <sup>a</sup>	22.15±1.78 <sup>b,d</sup>
10wk	4.88±0.66 <sup>a</sup>	25.65±2.11 <sup>b,d</sup>
12wk	5.14±0.91 <sup>a</sup>	29.17±2.00 <sup>b,d</sup>

注:DM 组:糖尿病组;BC 组:空白对照组。<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.001$  vs 同组内 0wk; <sup>d</sup> $P<0.001$  vs BC 组同时间点。

表 2 两组大鼠不同时间点体质量变化 ( $\bar{x}\pm s, \text{g}$ )

时间	BC 组	DM 组
0wk	265.87±4.49	264.63±6.92
1wk	280.92±4.58 <sup>b</sup>	270.74±6.94 <sup>a,d</sup>
2wk	295.98±4.64 <sup>b</sup>	276.73±6.97 <sup>b,d</sup>
3wk	310.93±4.48 <sup>b</sup>	282.69±7.04 <sup>b,d</sup>
4wk	325.76±4.62 <sup>b</sup>	288.67±6.99 <sup>b,d</sup>
5wk	341.05±4.61 <sup>b</sup>	294.63±6.91 <sup>b,d</sup>
6wk	355.98±4.58 <sup>b</sup>	300.76±6.84 <sup>b,d</sup>
7wk	370.93±4.62 <sup>b</sup>	306.80±7.02 <sup>b,d</sup>
8wk	385.83±4.59 <sup>b</sup>	312.72±7.00 <sup>b,d</sup>
9wk	400.83±4.57 <sup>b</sup>	318.53±6.93 <sup>b,d</sup>
10wk	415.88±4.54 <sup>b</sup>	324.66±6.98 <sup>b,d</sup>
11wk	430.86±4.57 <sup>b</sup>	330.63±6.98 <sup>b,d</sup>
12wk	446.02±4.68 <sup>b</sup>	336.74±7.00 <sup>b,d</sup>

注:DM 组:糖尿病组;BC 组:空白对照组。<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.001$  vs 同一处理组内 0wk; <sup>d</sup> $P<0.001$  vs 同一时间点 BC 组。

表 3 两组大鼠不同时间点突破内界膜的内皮细胞核个数

组别	4wk	8wk	12wk
BC 组	8.95±0.76	7.76±0.50	7.76±1.13
DM 组	17.40±0.44 <sup>a</sup>	19.79±0.18 <sup>a</sup>	22.90±0.21 <sup>a,c,e</sup>

注:DM 组:糖尿病组;BC 组:空白对照组。<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 同一时间点 BC 组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs DM 组 4wk; <sup>e</sup> $P<0.05$  vs DM 组 8wk。

尿病组大鼠视网膜中周部和周边部可见无血管区,血管迂曲、扩张,分布紊乱,渗漏严重;血管分层不清,可见异常交通支;无血管区面积也明显大于空白对照组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ , 图 2, 表 4)。

**2.4 两组大鼠不同时间点免疫组织化学结果观察** 在各期糖尿病组和空白对照组大鼠视网膜都观察到明显 Bax、VEGF 和 Bcl-2 的表达。除 Bcl-2 蛋白外均以糖尿病组表达最高,空白对照组最低。空白对照组大鼠视网膜有部分 Bcl-2、Bax 和 VEGF 表达 (图 3~5); 而糖尿病组大鼠视网膜各层可见部分 Bcl-2、Bax 和 VEGF 的阳性表达,视网膜血管和内核层散在 VEGF 阳性表达 (图 3~5)。图像分析结果表明,糖尿病组大鼠 VEGF、Bcl-2 和 Bax 光密度值与空白对照组比较,差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ , 表 5)。糖尿病组大鼠 4、8、12wk 均可见位于视网膜内核层的弱阳性染色,在部分切片的内界膜亦可见浅黄色阳性反应。

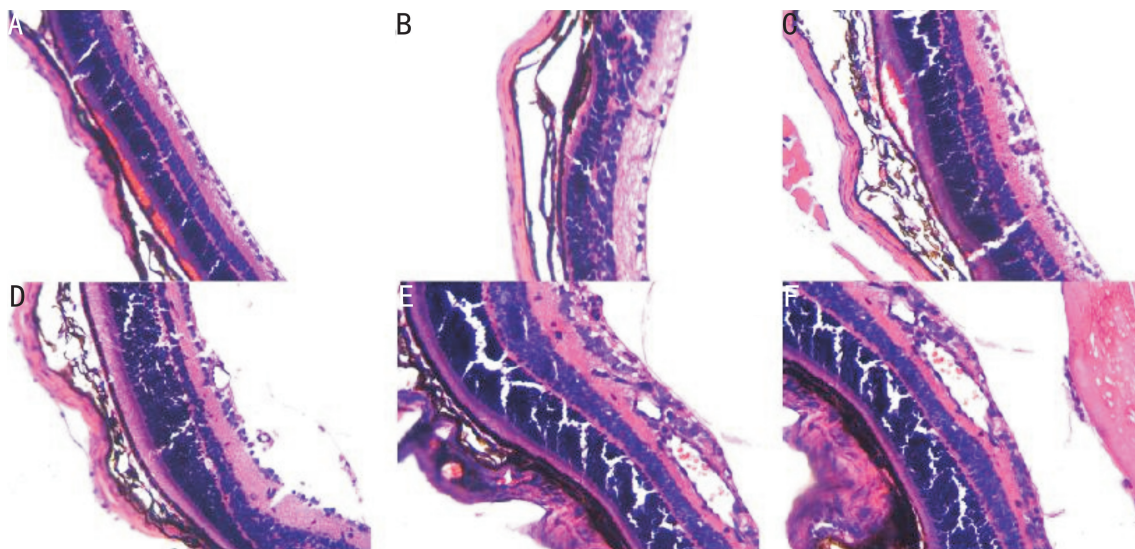


图1 两组大鼠视网膜 HE 染色结果(×100) A:空白对照组 4wk;B:空白对照组 8wk;C:空白对照组 12wk;D:糖尿病组 4wk;E:糖尿病组 8wk;F:糖尿病组 12wk。

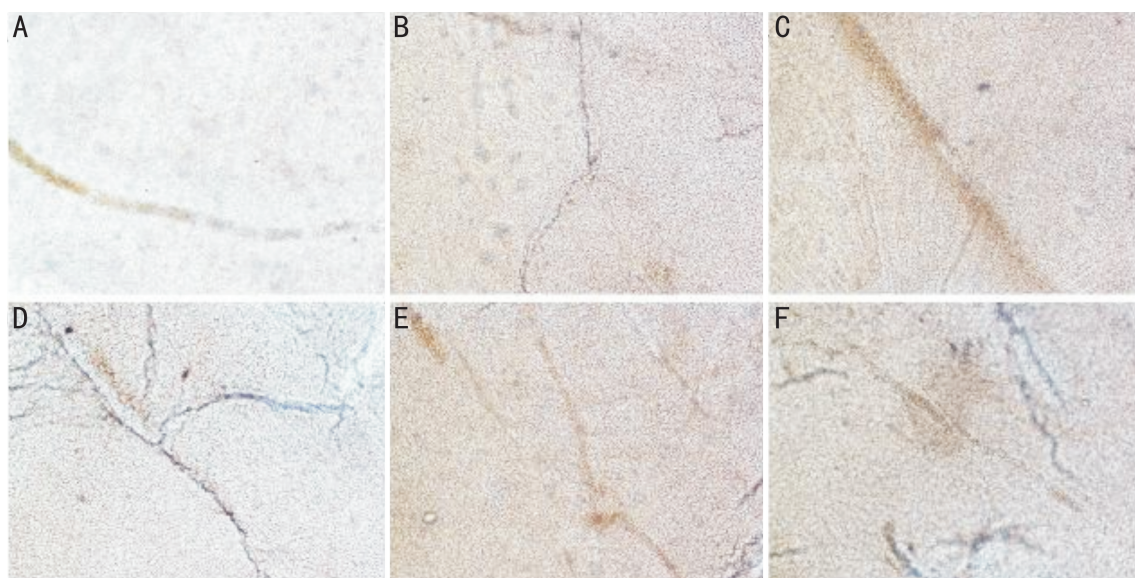


图2 两组大鼠不同时间点视网膜血管 ADP 酶染色形态学观察(×100) A:空白对照组 4wk;B:空白对照组 8wk;C:空白对照组 12wk;D:糖尿病组 4wk;E:糖尿病组 8wk;F:糖尿病组 12wk。

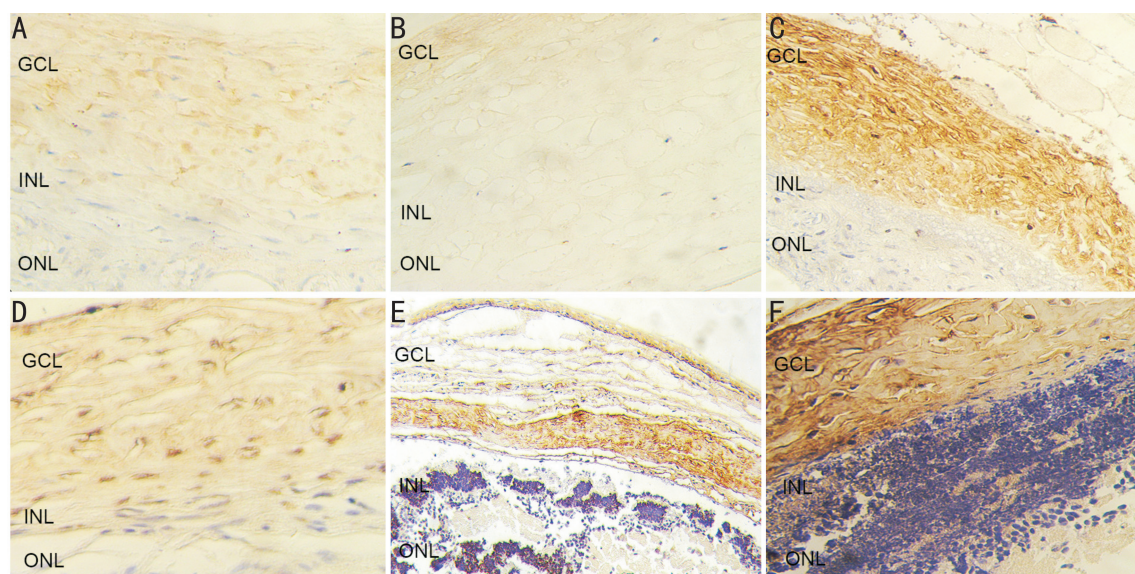


图3 两组大鼠不同时间点视网膜各层 Bax 表达(×200) A:空白对照组 4wk;B:空白对照组 8wk;C:空白对照组 12wk;D:糖尿病组 4wk;E:糖尿病组 8wk;F:糖尿病组 12wk。GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层。

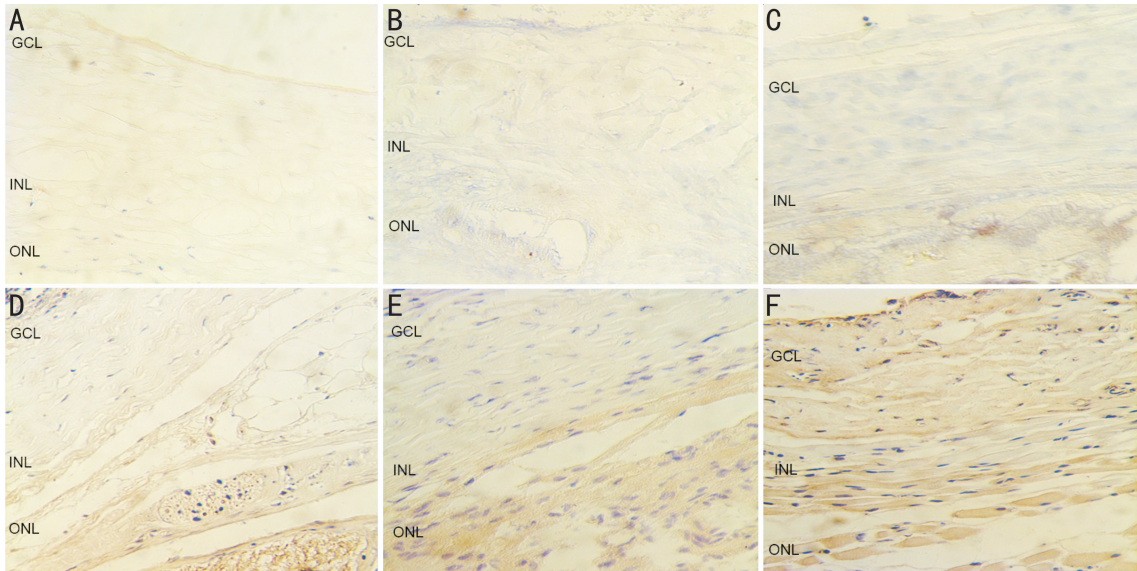


图4 两组大鼠不同时间点视网膜各层 Bcl-2 表达 (×200) A:空白对照组 4wk;B:空白对照组 8wk;C:空白对照组 12wk;D:糖尿病组 4wk;E:糖尿病组 8wk;F:糖尿病组 12wk。GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层。

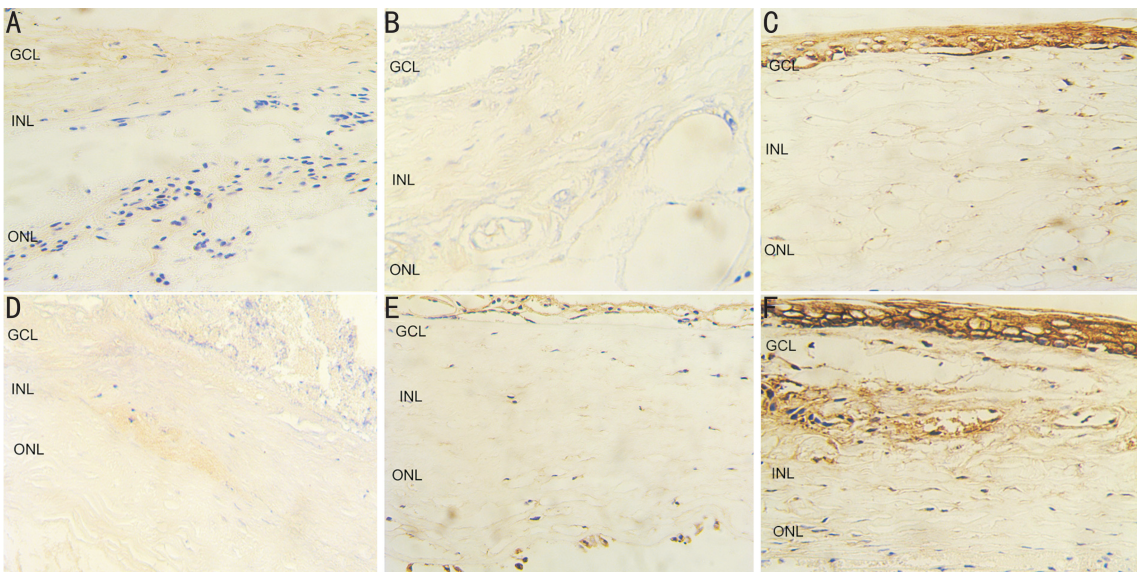


图5 两组大鼠不同时间点视网膜各层 VEGF 表达 (×200) A:空白对照组 4wk;B:空白对照组 8wk;C:空白对照组 12wk;D:糖尿病组 4wk;E:糖尿病组 8wk;F:糖尿病组 12wk。GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层。

表4 两组大鼠不同时间点无血管区面积测定指标 ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$ )

组别	0wk	4wk	8wk	12wk
BC 组	3.74±0.40	3.19±0.18	3.08±0.72	3.25±0.31
DM 组	3.74±0.31	5.53±0.72 <sup>a</sup>	9.77±2.56 <sup>a,c</sup>	10.28±0.70 <sup>a,c,e</sup>

注:DM 组:糖尿病组;BC 组:空白对照组。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同一时间点 BC 组;<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs DM 组 0wk;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs DM 组 4wk。

表5 两组大鼠不同时间点视网膜 Bax、Bcl-2 及 VEGF 的表达  $\bar{x} \pm s$

组别	Bax			Bcl-2			VEGF		
	4wk	8wk	12wk	4wk	8wk	12wk	4wk	8wk	12wk
BC 组	0.129±0.013	0.119±0.008	0.122±0.011	0.213±0.013	0.224±0.016	0.206±0.011	0.133±0.013	0.121±0.011	0.127±0.009
DM 组	0.158±0.012 <sup>a</sup>	0.184±0.013 <sup>a,c,e</sup>	0.211±0.016 <sup>a,c,e</sup>	0.152±0.014 <sup>a</sup>	0.136±0.011 <sup>a,c</sup>	0.105±0.017 <sup>a,c,e</sup>	0.201±0.012 <sup>a</sup>	0.241±0.014 <sup>a,c</sup>	0.296±0.019 <sup>a,c,e</sup>

注:DM 组:糖尿病组;BC 组:空白对照组。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同一时间点 BC 组;<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs DM 组 4wk;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs DM 组 8wk。

表6 两组大鼠不同时间点 RGCs 内钙离子荧光染色强度比值变化  $\bar{x} \pm s$

组别	4wk	8wk	12wk
BC 组	1052.97±64.12	1054.18±58.73	1055.54±70.28
DM 组	1071.35±72.36	1381.42±137.28 <sup>a,c</sup>	1467.58±123.62 <sup>a,c,e</sup>

注:DM 组:糖尿病组;BC 组:空白对照组。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同一时间点 BC 组;<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs DM 组 4wk;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs DM 组 8wk。

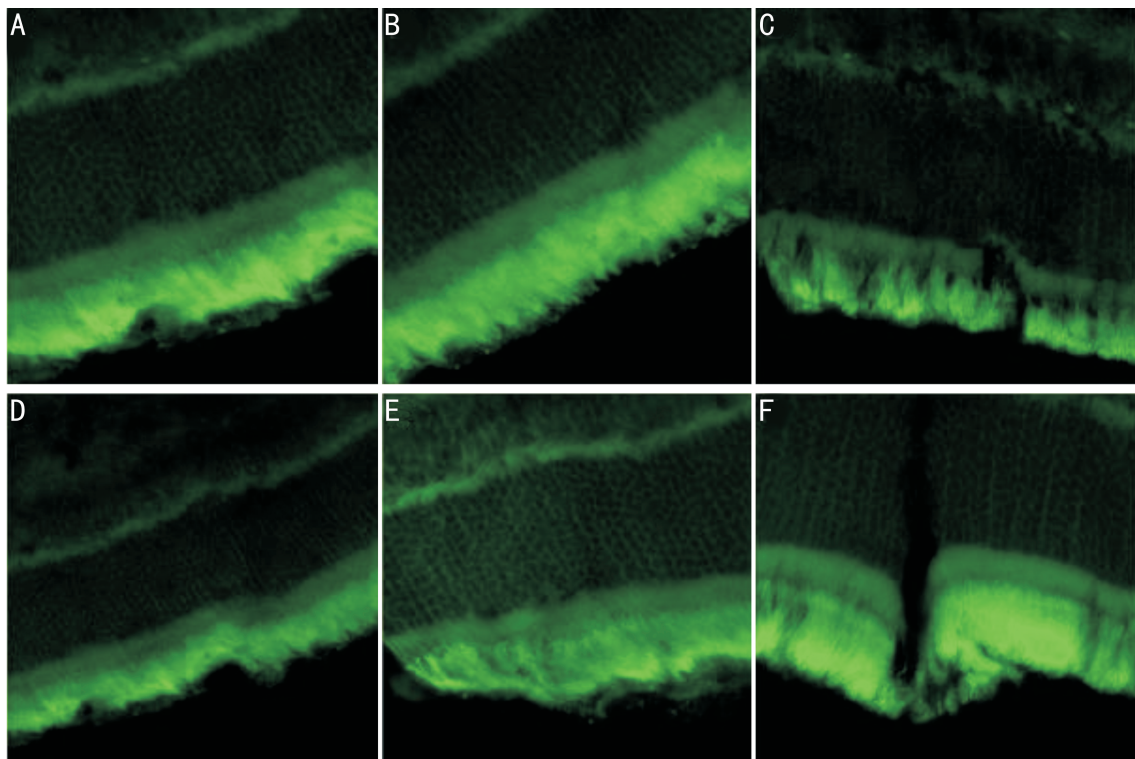


图6 两组大鼠不同时间点视网膜Fluo-3/AM染色( $\times 200$ ) A:空白对照组4wk;B:空白对照组8wk;C:空白对照组12wk;D:糖尿病组4wk;E:糖尿病组8wk;F:糖尿病组12wk。

**2.5 两组大鼠不同时间点视神经节细胞内钙离子浓度变化** 空白对照组大鼠RGCs内钙离子荧光染色强度无明显改变。糖尿病组大鼠8、12wk组与同时期空白对照组比较,RGCs内钙离子荧光染色强度与正常对照组比值差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图6,表6)。糖尿病组大鼠4、8、12wk比较,RGCs内钙离子荧光浓度逐渐升高,荧光染色强度比值的升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

本研究中,糖尿病组大鼠可见细胞增殖,排列紊乱,并可见新生血管芽,有些毛细血管腔中可见红细胞。这一结果表明,大鼠糖尿病视网膜病变随着糖尿病病程的延长而加重,血管增殖更为明显。各种因素导致氧化应激是共同致病因素,氧化应激可产生活性氧,破坏氧化和抗氧化平衡,激活下游信号传导通路而产生视网膜膜蛋白损伤因子,视网膜新生血管的形成与引起血管生成抑制因子和刺激因子这一对拮抗因子原有平衡被打破有关<sup>[3-6]</sup>。

本实验结果表明,高血糖能通过上调VEGF的表达,参与糖尿病视网膜病变新生血管的形成。所以,即使在糖尿病视网膜病变的非缺血期,也存在视网膜新生血管形成的危险因素:高血糖。这为糖尿病视网膜病变的治疗和研究提供了一个新的思路和方向。糖尿病早期大鼠RGCs发生了凋亡,最早发生于成模后第4wk,并且随病程延长,凋亡的RGCs逐渐增多。通过激光共聚焦显微镜检测钙离子浓度,在第4、8、12wk时,糖尿病组RGCs内的钙离子浓度较对照组均升高,并且通过糖尿病组内第4、8、12wk之间比较发现,RGCs内钙离子浓度逐渐升高。细胞内钙离子浓度的升高会激活一些生物酶,通过引起一系列的神经毒性作用,有可能最终导致RGCs的凋亡。随着糖尿病病程的延长,凋亡的RGCs逐渐增多,RGCs内钙离子浓度逐渐升高,所以我们推测,在糖尿病大鼠

模型早期RGCs内钙离子浓度的升高可能是导致RGCs凋亡的机制之一。

VEGF几乎参与了所有眼部新生血管性疾病进程的各个阶段,在糖尿病视网膜病变的发生和发展中也起着关键性作用<sup>[7]</sup>。血管内皮生长因子通过细胞增殖、细胞迁移和毛细血管形成的作用,促进新生血管的生长<sup>[8]</sup>。而对Bcl-2在这方面的研究报道颇为少见。所以,随着对Bcl-2进一步深入地研究,有可能为糖尿病视网膜病变的预防和治疗找到全新的干预靶点。高糖导致培养的内皮细胞DNA损伤,细胞复制延迟<sup>[9]</sup>。Bcl-2属细胞存活基因<sup>[10]</sup>。有观点认为,当Bcl-2被活化、表达升高后可以反过来下调VEGF<sup>[11]</sup>。本研究中观察到的一个重要现象是,在糖尿病视网膜同一标本上既有VEGF的表达又有Bcl-2的表达。高糖环境诱导的DNA损伤刺激导致VEGF表达升高,同时在此作用过程中,Bcl-2所起作用被认为是阻止视网膜血管内皮细胞的凋亡,与VEGF表达升高共同作用以抵御高糖的损害,维持细胞相对稳定。Bax与Bcl-2协同作用,分别促进或抑制细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。当Bax的量高于Bcl-2时,促进细胞凋亡;反之,细胞凋亡被抑制。VEGF具有刺激血管内皮细胞增生和维持细胞存活的特异作用<sup>[13]</sup>。

因此,VEGF的抑制剂将成为治疗DR的新方向。近年来,对于VEGF的基础和临床研究已取得了较大的进展,VEGF的表达与视网膜新生血管形成存在密切关系,VEGF已被认为是新生血管形成的关键因子,但不是唯一因子。

#### 参考文献

- 1 Lu L, Lu Q, Chen W, et al. Vitamin D<sub>3</sub> protects against diabetic retinopathy by inhibiting high-glucose-induced activation of the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway. *J Diabetes Res* 2018; 2018:8193523

- 2 Safi H, Safi S, Hafezi – Moghadam A, *et al.* Early Detection of Diabetic Retinopathy. *Surv Ophthalmol* 2018;63(5):601–608
- 3 Mohammad G, AlSharif HM, Siddiquei MM, *et al.* Rho-associated protein kinase – 1 mediates the regulation of inflammatory markers in diabetic retina and in retinal Müller cells. *Ann Clin Lab Sci* 2018;48(2):137–145
- 4 Huang YC, Liao WL, Lin JM, *et al.* High levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with diabetic retinopathy are positively associated with ARHGAP22 expression. *Oncotarget* 2018;9(25):17858–17866
- 5 Sawada O, Ichiyama Y, Obata S, *et al.* Comparison between wide-angle OCT angiography and ultra-wide field fluorescein angiography for detecting non-perfusion areas and retinal neovascularization in eyes with diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2018;256(7):1275–1280
- 6 Elshaer SL, Lemtalsi T, El-Remessy AB. High glucose-mediated tyrosine nitration of PI3-kinase: A molecular switch of survival and apoptosis in endothelial cells. *Antioxidants (Basel)* 2018;7(4):47
- 7 Holekamp NM, Campbell J, Almony A, *et al.* Vision outcomes following anti-vascular endothelial growth factor treatment of diabetic macular edema in clinical practice. *Am J Ophthalmol* 2018;191:83–91
- 8 Kiss S, Liu Y, Brown J, *et al.* Clinical utilization of anti-vascular endothelial growth-factor agents and patient monitoring in retinal vein occlusion and diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol* 2014; 8:1611–1621
- 9 Ehlers JP, Wang K, Singh RP, *et al.* A prospective randomized comparative dosing trial of ranibizumab in bevacizumab-resistant diabetic macular edema: The REACT Study. *Ophthalmol Retina* 2018;2(3):217–224
- 10 Klaassen I, de Vries EW, Vogels IMC, *et al.* Identification of proteins associated with clinical and pathological features of proliferative diabetic retinopathy in vitreous and fibrovascular membranes. *PLoS One* 2017;12(11):e0187304
- 11 Goruk NY, Devenci E. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor and B-cell lymphoma 2 in the uterine tissue of rats treated with melatonin in the estrus phase1. *Acta Cir Bras* 2018;33(7):629–640
- 12 Cai J, Ahmad S, Jiang WG, *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes* 2003;52(12):2959–2968
- 13 Sirtl S, Knoll G, Trinh DT, *et al.* Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors. *Oncogene* 2018;37(30):4122–4136