

糖尿病大鼠视网膜黏附连接蛋白表达的变化

王志云, 阎文柱, 李德华, 刘学政

作者单位:(121001)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院解剖学教研室
作者简介:王志云,女,硕士,助教,研究方向:糖尿病眼底病。
通讯作者:刘学政,研究方向:糖尿病视网膜病变. LiuXuezheng168@vip.sina.com
收稿日期:2010-07-08 修回日期:2010-08-16

Change of adherens junction expression in retinas of diabetes rats

Zhi-Yun Wang, Wen-Zhu Yan, De-Hua Li, Xue-Zheng Liu

Department of Anatomy, Medical College of Liaoning, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue-Zheng Liu. Department of Anatomy, Medical College of Liaoning, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. LiuXuezheng168@vip.sina.com

Received:2010-07-08 Accepted:2010-08-16

Abstract

• AIM: To study the expression of VE-cadherin and β -catenin in adherens junction in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat retina.

• METHODS: Fifty healthy adult male SD rats were chosen and randomly divided into normal control (Con), and diabetic mellitus (DM) groups. Diabetic model was established by intraperitoneal injection of STZ. After 2, 5 and 8 weeks, retinas were separated and vascular permeability was quantified by albumin leakage from blood vessels into the retina using the Evans blue method. VE-cadherin and β -catenin expression was measured in rat retinas using immunohistochemistry and Western blot analysis.

• RESULTS: Retinal vascular permeability was increased in the 2-, 5- and 8-week diabetic retina respectively, compared with that in the controls ($P < 0.05$). The localization of the expression of VE-cadherin was observed in retinal vessels of diabetic rats by immunohistochemistry. The allocation of the expression of β -catenin was observed in external limiting membrane, outer nuclear layer, outer plexiform layer, inner plexiform layer, internal limiting membrane and microvessel of rat retinas. The expression of VE-cadherin was significantly decreased in STZ-induced diabetic rat retinas with the progression of diabetes. The expression of β -catenin was significantly increased in STZ-induced diabetic rat retinas with the progression of diabetes.

• CONCLUSION: The expression of VE-cadherin is decreased and that of β -catenin is increased in DM.

• KEYWORDS: VE-cadherin; β -catenin; diabetic retinopathy; STZ

Wang ZY, Yan WZ, Li DH, et al. Change of adherens junction expression in retinas of diabetes rats. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(10):1878-1881

摘要

目的:探讨链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病视网膜黏附连接 VE-cadherin 和 β -catenin 的表达。

方法:SD 大鼠 50 只,随机分为正常对照组(Con)、糖尿病组(DM)。腹腔注射 STZ 建立 DM 模型,2,5,8wk 处死动物。用伊凡思蓝方法检测视网膜的渗透性;用免疫组织化学和 Western blot 方法检测各组大鼠视网膜 VE-cadherin 和 β -catenin 的表达情况。

结果:造模后 2,5,8wk 大鼠视网膜血管渗透性增加。免疫组化分析证实 DM 大鼠视网膜 VE-cadherin 主要表达在视网膜血管上, β -catenin 主要表达在视网膜外界膜、外核层、外网状层、内网状层和内界膜。Western blot 分析证明随着 DM 视网膜病变的发生发展,视网膜 VE-cadherin 表达量显著减少,2,5,8wk 组与 Con 组两两比较均有差异($P < 0.05$);而 β -catenin 表达量显著增加,2,5,8wk 组与 Con 组两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:STZ 诱导的 DM 大鼠 VE-cadherin 表达量减少而 β -catenin 表达量显著增加,两者成反比。

关键词:VE-cadherin; β -catenin; 糖尿病视网膜病变;链脲佐菌素

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.10.012

王志云,阎文柱,李德华,等.糖尿病大鼠视网膜黏附连接蛋白表达的变化.国际眼科杂志 2010;10(10):1878-1881

0 引言

糖尿病视网膜病变是糖尿病(DM)最常见最严重的并发症,几乎涉及 50% 糖尿病患者^[1,2]。血-视网膜屏障的破坏是 DM 早期特征之一,这种改变直接造成血管渗漏,形成黄斑水肿,引起视力下降和失明^[3,4]。黏附连接是视网膜毛细血管内皮细胞间连接的最主要方式。其中 VE-cadherin 介导内皮细胞间钙依赖性同质黏附,是一种跨膜蛋白,通过 α -catenin 和 β -catenin 与 F-肌动蛋白连接,维持着细胞之间连接的稳定性和细胞间隙的通透性。我们探讨链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的 DM 视网膜 VE-cadherin 和 β -catenin 的表达,观察视网膜渗透性破坏与黏附连接表达的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma 公司);强生 lifescan 公司 One Touch II 型血糖仪;辣根酶标记链霉卵白素试剂盒(SP Kit)及 DAB 显色剂(北京中杉生物技术有限公司);兔抗大鼠 VE-cadherin 多克隆抗体和小鼠抗大鼠 β -catenin mAb(Santa Cruz 公司)。健康成年雄性 SD 大鼠 50 只(辽宁医学院实验动物中心提供),鼠龄 6~8wk,体质量 180~220g,随机分为正常对照组 24 只和 DM

表 1 大鼠质量、血糖和 EB 渗透量的变化

($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分组	体质量(g)			血糖(mmol/L)			EB 渗透量($\mu\text{g/g}$)		
	2wk	5wk	8wk	2wk	5wk	8wk	2wk	5wk	8wk
Con	329 \pm 27	377 \pm 20	414.6 \pm 19	3.7 \pm 0.5	3.6 \pm 4.8	3.7 \pm 0.5	12.3 \pm 4.3	12.4 \pm 4.4	12.4 \pm 4.2
DM	238 \pm 28	314 \pm 18	362.436	24.3 \pm 4.2	24.4 \pm 4.4	24.5 \pm 4.3	21.7 \pm 3.7	25.3 \pm 4.4	29.8 \pm 4.3

组 26 只。在饲养过程中,DM 组 2 只死亡,1 只死于踩踏,另 1 只死因不明。造模前进行全身及眼部检查以排除原发性疾病。动物适应性饲养 2d,禁食水 12h 后,按体质量一次性尾静脉注射新鲜配制并预冷的 STZ (溶于 10mmol/L 柠檬酸钠缓冲液中 pH=4.5) 诱导 DM 模型。注射完毕后大鼠自由进食水,48h 后将血糖浓度 > 16.7mmol/L、尿糖阳性者认为 DM 诱导成功。2,5,8wk 后,分别处死 8 只大鼠。动物分笼喂养,不限食水,自然昼夜光线照明。

1.2 方法

1.2.1 血管渗透性测定 两组大鼠造模后 2,5,8wk 分别取 4 只,水合氯醛麻醉,按 45mg/kg 尾静脉注射 EB,循环 2h 后,右颈总动脉插管(充肝素化生理盐水),灌注预热至 37℃ 的柠檬酸缓冲液配制的 10g/L 多聚甲醛溶液,持续 2min。灌注后立即取出大鼠眼球体式镜下分离视网膜,视网膜真空干燥 5h,电子天平称重,将单个视网膜置于 10g/L 甲酰胺 100 μL 中,70℃ 水浴抽提 18h 后至超滤离心管中,4℃,12000r/min 离心 45min,取上清液 50 μL 。用分光光度计测量视网膜萃取物在 620nm 和 720nm 的吸光度值(每个样品测 3 次取平均值)。净吸光度值 = A620-A720。两种物质的 EB 浓度通过 EB 标准曲线测定。用视网膜质量(mg)标准化 EB (ng) 含量,结果表示为: $\mu\text{g/g}$ ^[5]。

1.2.2 VE-cadherin 和 β -catenin 表达的检测 两组大鼠造模后 2,5wk 和 8wk 时分别取 2 只大鼠,水合氯醛麻醉,分离左侧颈静脉,夹闭近心端,远离远心端,远心端插管,灌注 40g/L 多聚甲醛(4℃) 中。12h 后,取出眼球,流水冲洗,去除眼前节和玻璃体。余下的眼球壁逐级乙醇脱水,二甲苯透明,全层石蜡包埋,切 5~6 μm 切片。常规脱蜡脱水,过氧化氢气温孵育,抗原修复,100mL/L 山羊血清封闭内源性抗原,滴加小鼠抗大鼠 VE-cadherin 抗体(1:100),4℃ 过夜,加二抗,DAB 显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。观察 VE-cadherin 和 β -catenin 在视网膜中的表达位置和强弱情况。另冰上分离视网膜,放入 EP 管中冻存于 -90℃。将冻存的视网膜组织用预冷的 TBS 和蒸馏水冲洗,用干净的剪刀将 EP 管中的视网膜组织尽量剪碎,加入裂解缓冲液,使用超声破碎仪打碎细胞,匀浆,置冰上 30min 后在 4℃ 下 12000r/min 离心 30min,取上清液于 1.5mL 离心管中。Bradford 法测定蛋白含量,上样缓冲液调节蛋白浓度,煮沸 5min, -20℃ 冻存。在 120g/L SDS-PAGE 凝胶电泳中进行电泳分离后,电转移法将蛋白质转移至 PVDF 膜。将膜在含 50g/L 脱脂奶粉的 TBS-T 缓冲液中 37℃ 封闭 90min,依次加入 1:500 兔抗大鼠 VE-cadherin 抗体和小鼠抗大鼠 1:200 β -catenin mAb,4℃ 孵育过夜,加二抗,37℃ 作用 1h, TBST 洗 3 次,10min/次,然后显色。实验重复 3 次,观察结果,进行凝胶图像分析。观察 VE-cadherin 和 β -catenin 在视网膜中的表达量。

统计学分析:用统计软件 SPSS 14.0 进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较用方差分析及 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 空腹血糖和体质量变化 同对照组相比较,DM 组大鼠血糖显著升高 ($P < 0.01$),而体质量则显著下降 ($P < 0.01$,表 1)。

2.2 视网膜血管渗透性 计算出伊凡思蓝在甲酰胺中的标准曲线公式为 $Y = 0.0818X + 0.0023$,以此计算出各种样品比色值对应的伊凡思蓝浓度。结果显示,实验组 DM 大鼠视网膜 EB 含量较正常对照组显著增加 ($P < 0.01$,表 1)。

2.3 VE-cadherin 和 β -catenin 的表达 实验组 DM 大鼠视网膜 VE-cadherin 表达较正常对照组显著增加,VE-cadherin 主要分布在视网膜血管(图 1)。随着 DR 时间的延长,逐渐减少。Western blot 分析显示 VE-cadherin 的表达量随着糖尿病视网膜病变的延长显著减少,DM 组低于 Con 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2A)。 β -catenin 的表达量逐渐增加,DM 组高于 Con 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2B)。

3 讨论

视网膜脉管系统的内皮细胞间连接维持着血视网膜屏障的功能,包括紧密连接和黏附连接。钙黏附蛋白家族,有 80 多个成员,是黏附连接最重要的组成部分^[5]。其中 VE-cadherin 介导内皮细胞间钙依赖性同嗜性黏附,这是一种跨膜蛋白,通过 β - and γ -catenin 与胞质中的细胞骨架连接。除了作为一种机械力学附属物,VE-cadherin 还能够调节内皮细胞的活动性,形态建成,对生长因子的反应性以及细胞寿命等多个方面有重要作用。人们认为,相邻内皮细胞之间黏附连接的完整性在维持屏障功能上起着关键的作用。在本研究中,我们观察到:(1)随着血管渗透性的不断增加,VE-cadherin 蛋白的表达逐渐下降。(2)辛伐他汀明显的抑制 DM 中血管渗透性破坏,增加 VE-cadherin 蛋白的表达量。黏附连接功能下降是 DM 血-视网膜屏障破坏的关键因素。我们观察到随着 DM 视网膜血管渗透性的增加,VE-cadherin 表达量逐渐下降。在非增殖性 DM 性视网膜病,视网膜 VE-cadherin 的表达也有同样的趋势。在本次研究中,我们观察到,随着血管渗透性的不断增加,VE-cadherin 蛋白的表达逐渐下降。而且我们首次发现在 DM 发病早期阶段,VE-cadherin 蛋白就出现下降趋势。这与 Navaratna 等^[6]的研究结果一致。VE-cadherin 蛋白可能与 occludin 蛋白和 claudin 家族蛋白存在着密切的联系,它们共同通过特殊的胞内信号分子来调节自身的功能和内皮细胞间的屏障作用^[7]。另外,高血糖和其他的糖尿病代谢产物,包括 AGEs,都对视网膜微血管有负作用。很多研究表明无论是人还是鼠的视网膜微血管和基底膜积聚了大量的 AGEs。这些因子影响 MMP 的表达和激活。王占华等^[8]发现 AGEs 上调 MMP 表达,引起 VE-cadherin 的降解。本研究的另一个发现就是 STZ 诱导的 DM 大鼠,视网膜及微血管 β -catenin 表达显著增加,通过免疫组化证明正常大鼠视网膜表达 β -catenin,主要分布在视网膜光感受器、外纵状层、内纵状层、神经节细胞层、内界膜及视网膜微血内皮细胞和周细

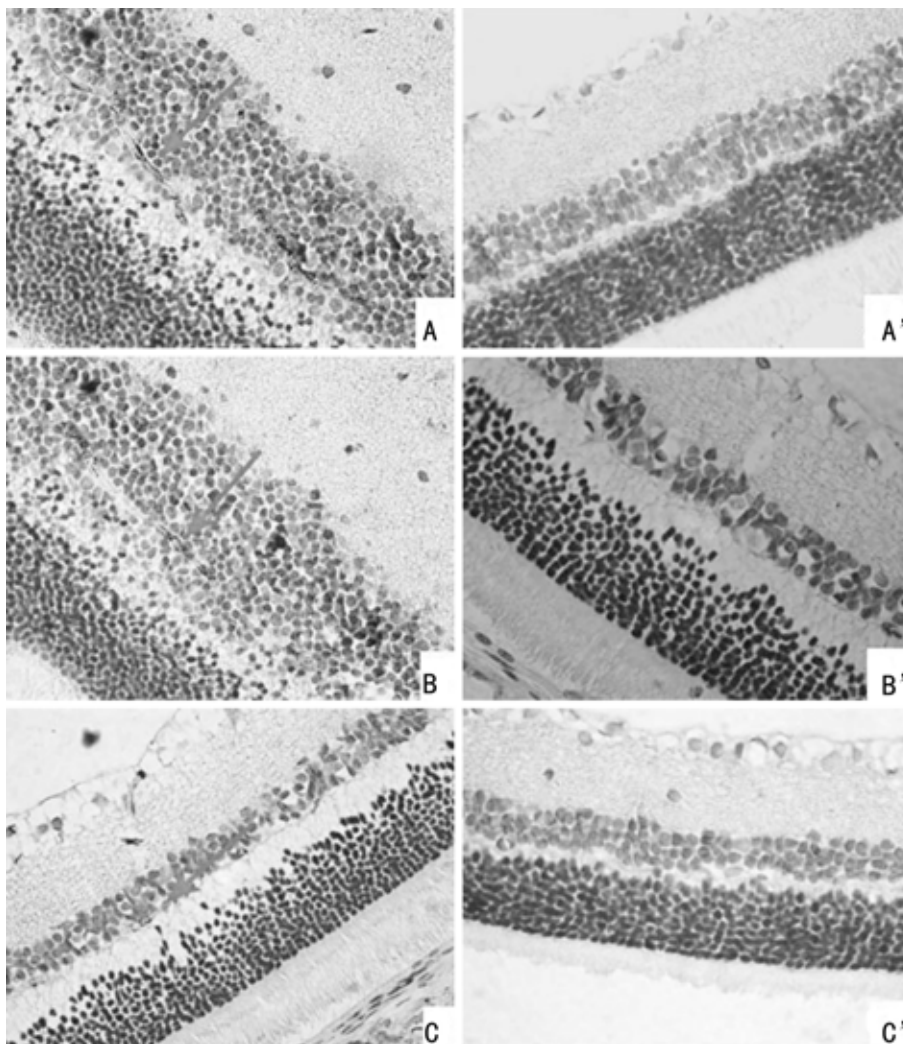


图1 DM大鼠视网膜VE-cadherin(A,B,C)和 β -catenin(A1,B1,C1)表达变化 A,A':2wk;B,B':5wk;C,C':8wk。

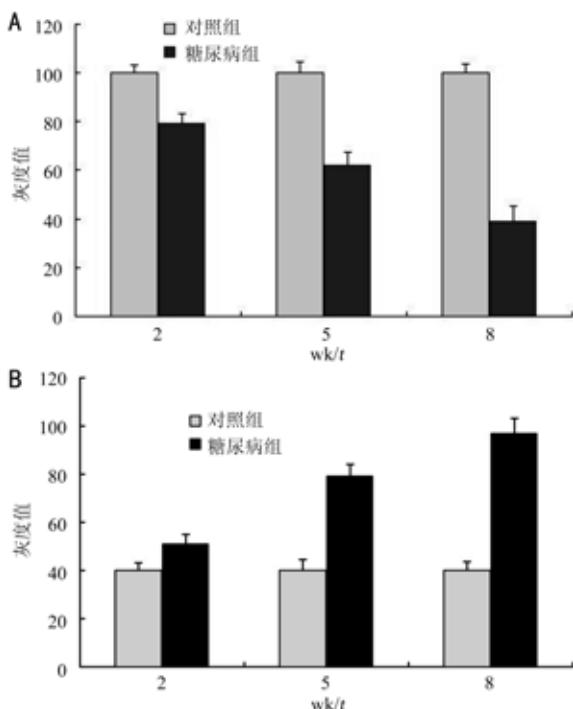


图2 大鼠视网膜VE-cadherin和 β -catenin分析 A:VE-cadherin;B: β -catenin。

胞。这与李养军等^[9]的结果基本一致。我们首次发现在

DM2周阶段, β -catenin即开始升高。 β -catenin的表达增加参与早期DM视网膜血管屏障的破坏和视网膜的损伤,可能通过所调控的黏附连接发生改变,尤其使视网膜微血管内皮细胞和周细胞之间相互作用及与细胞外基质的相互作用发生改变,细胞肌动蛋白细胞骨架重构,使视网膜血管屏障破坏;或者由于 β -catenin的表达增加与周细胞的功能障碍和丧失有关,因为STZ诱导的DM鼠视网膜周细胞丧失在4~8wk^[10],而 β -catenin过表达能诱导肿瘤抑制蛋白p53的聚集或 β -catenin直接结合到FOXO且增强FOXO的转录活性^[11],进一步促进周细胞的凋亡。在VE-cadherin和 β -Catenin的相关分析中,我们发现二者有着很强的负相关性,究其原因,或许是由于VE-cadherin被蛋白酶降解而 β -Catenin产生了代偿性的增加。总之,VE-cadherin和 β -Catenin是高糖状态下血-视网膜屏障重要的保护卫士,发挥了重要的角色。本研究尚有局限性,DM如何破坏黏附连接的完整性,机制尚不明确。

参考文献

- 1 Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004;350(1):48-58
- 2 Saaddine JB, Honeycutt AA, Narayan KM, et al. Projection of diabetic retinopathy and other major eye diseases among people with diabetes mellitus; United States, 2005-2050. *Arch Ophthalmol* 2008;126(12):1740-1747
- 3 Funatsu H, Noma H, Mimura T, et al. Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2009;116(1):73-79

4 Navaratna D, Menicucci G, Maestas J, et al. A peptide inhibitor of the urokinase / urokinase receptor system inhibits alteration of the blood-retinal barrier in diabetes. *FASEB J* 2008;22(9):3310-3317
5 Resink TJ, Philippova M, Joshi MB, et al. Cadherins and cardiovascular disease. *Swiss Med Wkly* 2009;139(9-10):122-134
6 Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G, et al. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes* 2007;56(9):2380-2387
7 Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction; a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(6):C1213-1228

8 王占华,郭晓华,刘香兰,等.晚期糖基化终末产物诱导内皮细胞黏附连接改变及其机制. *中国动脉硬化杂志* 2008;16(7):505-509
9 李养军,惠延年,王雨生. STZ 诱导的糖尿病鼠视网膜 β -连环蛋白表达上调. *国际眼科杂志* 2007;7(1):56-60
10 Hammes HP, Lin J, Wagner P, et al. Angiopoietin-causes pericyte dropout in the normal retina; evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2004;53(4):1104-1110
11 Essers MA, deVries LM, Barker N, et al. Functional interaction between β -catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 2005;308(5725):1181-1184

· 短篇报道 ·

角膜缘干细胞移植联合贝复舒眼液治疗复发性翼状胬肉的临床观察

龙波,李恒

作者单位:(629000)中国四川省遂宁市中心医院眼科
作者简介:龙波,男,主治医师,研究方向:眼表疾病、青光眼。
通讯作者:龙波. longzhixi@163. com
收稿日期:2010-07-23 修回日期:2010-09-01

龙波,李恒. 角膜缘干细胞移植联合贝复舒眼液治疗复发性翼状胬肉的临床观察. *国际眼科杂志* 2010;10(10):1881

0 引言

翼状胬肉是眼科一种常见眼表疾病^[1],手术是唯一治疗方法,但术后复发率高。复发性翼状胬肉还可致睑球粘连,眼球运动受限。复发后再次手术难度加大,且更易复发^[2]。2008-01/2010-01 我院采用角膜缘干细胞移植联合贝复舒眼液治疗复发性翼状胬肉 33 例 35 眼,取得满意效果,现报告如下。

1 临床资料

收集 2008-01/2010-01 我院眼科住院治疗的复发性翼状胬肉患者 33 例 35 眼,男 10 例,女 23 例。年龄 26 ~ 68 岁。胬肉侵入角膜缘内 3 ~ 8mm,翼状胬肉角膜缘处宽度 4 ~ 8mm。术前准备:手术在上次术后 0.5a 进行。术前 3d 患眼用妥布霉素/地塞米松眼液滴眼,3 次/d。手术均在显微镜下操作,5g/L 爱尔凯因球结膜表面麻醉,20g/L 利多卡因加微量肾上腺素行翼状胬肉部结膜下局部浸润麻醉。在距胬肉头部 0.5mm 正常角膜处开始,沿其外周浅层切开角膜上皮层,前弹力层及基质浅层,切除病变组织,确保角膜上不残留血管及纤维组织。继续分离胬肉下组织至泪阜,将巩膜面的变性组织削除干净。浅层分离结膜下病变组织至泪阜,剪除全部翼状胬肉及肥厚增生的结膜下组织。巩膜创面暴露,轻度烧灼止血。角膜缘干细胞结膜瓣移植:于术眼上方分离球结膜与结膜下组织,取带有 0.5mm 浅层基质层透明角膜组织的结膜瓣。略大于胬

肉切除缺损处。移植瓣要不带筋膜组织。植片上皮面向上将其对位移植到巩膜创面,角膜缘相对。以 10-0 无创缝线缝合固定角膜缘侧与植床的角膜缘间断缝合 2 针,然后将移植瓣的其他面与结膜、浅层巩膜分别缝合固定。移植瓣下不能有积血或积液,使植片紧密贴合在植床上。术后以典必殊眼膏涂术眼,加压包扎。术后贝复舒眼液点眼,4 次/d,共 5d。结果:术后移植片均在位成活。术后 1 ~ 2d 角膜上皮开始修复,术后第 1d 均有不同程度的异物感、流泪等刺激症状,第 2d 减轻,第 3d 明显减轻,角膜创面上皮修复。术后 3 ~ 4d 上方取材处结膜伤口新生上皮覆盖,术后 5d 角膜染色均为阴性。术后随访 6mo ~ 2a,33 例 35 眼中仅 1 眼复发,复发率为 3%。余 34 眼角膜光滑,无新生血管及异常翼状胬肉组织生长,无明显并发症发生。

2 讨论

翼状胬肉被认为是一种局限性角膜缘缺陷症,角膜缘干细胞缺乏或功能下降可使角膜缘功能被破坏,致使结膜组织长入和新生血管形成。角膜缘干细胞存在于角膜缘基底部,能增生、分化为角膜上皮细胞,阻止结膜上皮细胞移行至角膜表面,保持角膜的透明性与正常生理功能^[3]。单纯切除法破坏完整的角膜缘屏障,增生活跃的结膜成纤维细胞向角膜方向生长,导致翼状胬肉复发,复发率为 30% ~ 50%。翼状胬肉多次手术使角膜缘干细胞遭到破坏,使角膜上皮表型不能重建,角膜上皮结膜化,纤维血管组织过度增生,所以复发性胬肉术后更易复发。采用自体角膜缘干细胞移植为受损的角膜缘提供健康的干细胞来源,手术安全、取材方便,不存在术后排斥反应。术后应用贝复舒眼液使上皮修复时间缩短,并且可减少术后炎症反应,对阻止复发更有效^[4]。采用自体角膜缘干细胞移植联合应用贝复舒治疗复发性翼状胬肉是治疗复发性翼状胬肉的理想方法,值得临床应用。

参考文献

- 1 刘家琦,李凤鸣.实用眼科学.北京:人民卫生出版社 2000;36
- 2 谢立信,胡隆基,张怡,等.角膜缘上皮和球结膜移植治疗翼状胬肉. *中国实用眼科杂志* 1996;14:538-539
- 3 孙秉基,徐锦堂.角膜病的理论基础与临床.北京:科学技术出版社 1994;16
- 4 黄洁成,刘文舟,梁祖忠.贝复舒滴眼液在翼状胬肉术后的应用. *眼外伤职业病杂志* 2003;25(4):281