

糖皮质激素对糖尿病大鼠视网膜神经元再生的影响

刘文强, 王玉波, 左中夫, 梁汇珉, 李赵伟, 李 铮, 刘学政

基金项目: 2015年度国家自然科学基金(No. 81571383)

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 锦州医科大学基础医学院解剖学教研室

作者简介: 刘文强, 在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病视网膜病变的发病机制及治疗。

通讯作者: 刘学政, 博士, 教授, 锦州医科大学校长, 研究方向: 糖尿病视网膜病变. liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期: 2016-10-13 修回日期: 2017-02-14

Effect of glucocorticoid on the retinal neurons of diabetes mellitus rats

Wen-Qiang Liu, Yu-Bo Wang, Zhong-Fu Zuo, Hui-Min Liang, Zhao-Wei Li, Zheng Li, Xue-Zheng Liu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81571383)

Department of Anatomy, Foundation Institute of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue-Zheng Liu. Department of Anatomy, Foundation Institute of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. liuxuezheng168@vip.sina.com

Received: 2016-10-13 Accepted: 2017-02-14

Abstract

• **AIM:** To investigate the detrimental effect of glucocorticoid (GC) on the retinal neurons of diabetes mellitus (DM) rats.

• **METHODS:** The DM model was induced by intraperitoneal injection (IP) of streptozotocin in adult male rats, and the solution of RU486 was configured with dimethyl sulfoxide (DMSO). RU486 treatment group with glucocorticoid receptor antagonist RU486 and diabetic group with DMSO by intraperitoneal injection was in successful DM model. Naive rats were injected with DMSO as control group. Three months later, we detected the body weight and blood glucose and GC concentration of serum. The changes of retinal ganglion cell (RGC) density was investigated by HE staining. The expression of growth associated protein-43 (GAP-43, a marker of neuronal axon regeneration) and synaptophysin (SYN, a marker of synaptic number) were semi-quantity analyzed by the optical density of immunofluorescence and Western blot.

• **RESULTS:** Compared with the control group, the body weight and density of RGC and expression of SYN in diabetic group were significantly lower ($P < 0.01$), the blood glucose and GC concentration of serum and expression of GAP-43 in diabetic group were significantly higher ($P < 0.01$). Compared with the diabetic group, the

density of RGC and expression of GAP-43, SYN in RU486 group were significantly higher ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Inhibition of GC could ameliorate the axonal degeneration of retinal neurons in diabetic rats, and loss of the number of synapses, and restore the RGC density of retina. The results suggest that long-term elevation of GC may be involved in the occurrence and development of diabetic retinopathy.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; glucocorticoid; growth associated protein -43; synaptophysin

Citation: Liu WQ, Wang YB, Zuo ZF, et al. Effect of glucocorticoid on the retinal neurons of diabetes mellitus rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(3):418-421

摘要

目的: 探讨糖皮质激素对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠视网膜神经元的损伤作用。

方法: 选取清洁级雄性SD大鼠,腹腔注射链脲佐菌素建立DM模型,利用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配置RU486溶液。DM模型建立成功后,腹腔注射糖皮质激素受体拮抗剂RU486为RU486治疗组,腹腔注射DMSO为糖尿病组。正常大鼠腹腔注射DMSO为对照组。3mo后,检测大鼠体质量、血糖、血清糖皮质激素(glucocorticoid, GC)浓度,HE染色检测视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)密度,利用Western blot和免疫荧光结合光密度值分析的方法,对神经元轴突再生标志物生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)及突触数量标志物突触素(synaptophysin, SYN)的表达进行半定量分析。

结果: 与对照组相比,糖尿病组大鼠血糖明显升高,体质量明显下降,血清GC浓度明显升高,RGC密度明显降低,视网膜GAP-43表达增强,SYN表达明显减弱(均 $P < 0.01$);与糖尿病组相比,RU486组RGC密度明显增加,视网膜GAP-43和SYN表达明显增强(均 $P < 0.01$)。

结论: 拮抗GC的作用可能促进了糖尿病大鼠视网膜神经元轴突再生,增加了突触数量,恢复了视网膜RGC密度,结果提示GC长期升高可能参与了糖尿病视网膜病变的发生发展。

关键词: 糖尿病视网膜病变;糖皮质激素;生长相关蛋白-43;突触素

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.3.7

引用: 刘文强,王玉波,左中夫,等.糖皮质激素对糖尿病大鼠视网膜神经元再生的影响.国际眼科杂志2017;17(3):418-421

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿

表 1 各组大鼠血糖和体质量

 $(\bar{x} \pm s, n = 10)$

组别	血糖 (mmol/L)		体质量 (g)	
	给药前	给药后 3mo	给药前	给药后 3mo
对照组	4.40±0.10	4.47±0.15	242.00±20.88	357.33±16.44
糖尿病组	4.53±0.06	24.13±1.51 ^b	238.00±21.66	256.67±20.84 ^b
RU486 治疗组	4.43±0.06	22.07±1.10 ^b	246.67±7.51	268.00±8.89 ^b

注:^b $P < 0.01$ vs 对照组。

病患者常见并发症,为发达国家致盲的首要原因^[1]。糖尿病时下丘脑-垂体-肾上腺轴过度活化,糖皮质激素(glucocorticoid, GC)异常增加,是糖尿病的特征性表现之一^[2]。临床研究发现,应用 GC 短期治疗糖尿病性黄斑水肿效果较好,但长期应用可形成或加重白内障^[3]。在体研究也发现,长期大剂量使用 GC 可对视网膜产生毒性作用^[4]。但糖尿病状态下,GC 长期升高,对视网膜神经元的影响及作用尚不完全清楚。因此,本研究拟利用糖皮质激素受体拮抗剂 RU486,探讨 GC 对糖尿病大鼠视网膜神经元的影响,期望为 DR 的临床治疗提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 200 ~ 250g (锦州医科大学实验动物中心,编号:0000455),动物每天给予清洁营养丰富饲料,环境温度稳定在 20℃ ~ 25℃,相对湿度为 50% ~ 70%。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma);米非司酮(mifepristone, RU486, Sigma);大鼠内源性糖皮质激素(GC)ELISA 试剂盒(上海信帆生物科技有限公司);HE 染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);SYN、GAP-43 抗体(Abcam 公司);免疫荧光、Western blot 二抗(美国 Proteintech Group 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备及实验动物分组 选取清洁级雄性 SD 大鼠,随机分成 3 组:对照组、糖尿病组、RU486 治疗组。糖尿病组及 RU486 治疗组大鼠隔夜禁食水后,按 50mg/kg 腹腔一次性注射 STZ,注射后 72h 采尾静脉血糖,将血糖浓度 > 16.7mmol/L 的大鼠定为糖尿病模型。以 DMSO 溶解 RU486,参照文献^[5],RU486 治疗组 DM 大鼠腹腔注射 RU486,注射剂量为 20mg/(kg·d)。对照组及糖尿病组大鼠腹腔注射等剂量 DMSO,每组 10 只大鼠,3mo 后进行各项指标检测。

1.2.2 大鼠血清 GC 浓度测定 3mo 后,各组大鼠尾静脉取血 3mL,5 000r/min 离心 30min 后取上清,运用 ELISA 法,测定大鼠血清 GC 浓度,具体操作严格按照试剂盒说明书。

1.2.3 视网膜 HE 染色 每组取 4 只大鼠,以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.35mL/100g)。4% 多聚甲醛溶液心脏灌注固定,取双侧眼球。10%、20%、30% 梯度蔗糖溶液过夜脱水,冰冻切片切片,厚度 14μm。按 HE 染色试剂盒进行操作,检测 RGC 密度。

1.2.4 免疫荧光检测大鼠视网膜 GAP-43 和 SYN 表达 PBS 震荡洗涤 3 次,每次 5min,10% 山羊血清 + 0.3% Triton-100 室温孵育 2h,切片滴加一抗(GAP-43,1:600; SYN,1:800),4℃ 湿盒孵育过夜。PBS 震荡洗涤 3 次,每次 10min,滴加荧光素标记的二抗,室温避光湿盒孵育 4h。PBS 震荡洗涤 3 次,每次 10min,抗荧光封片剂封片,倒置显微镜下观察视网膜 GAP-43 和 SYN 阳性染色结果,利

用光密度值进行半定量分析。

1.2.5 Western blot 检查大鼠视网膜 GAP-43 和 SYN 表达 每组取 6 只大鼠,深度麻醉后取双侧眼球,解剖显微镜下分离视网膜组织,按重量加入蛋白裂解液,冰上剪碎并超声,冰上静置 30min 后 4℃ 离心机 12 000r/min,25min,留上清。BCA 法测蛋白浓度并制样,-20℃ 保存备用。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再转入 PVDF 膜,1% BSA 室温封闭 2h。一抗(小鼠抗大鼠 GAP-43,1:20000;兔抗大鼠 SYN,1:10000;小鼠抗大鼠 β-Tubulin,1:2500),4℃ 摇床杂交过夜。二抗(HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 及山羊抗兔 IgG,1:5000),室温摇床 2h。ECL 试剂盒显色,以 β-Tubulin 为内对照,检测 GAP-43 和 SYN 蛋白相对表达量。

统计学分析:本研究采用 SPSS 17.0 统计软件进行实验结果分析,所有数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析,方差齐时采用 SNK-*q* 检验进行组间的两两比较,方差不齐时采用 Games-Howell 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量和血糖变化 三组大鼠给药前体质量之间相比($F = 0.176, P > 0.05$)和血糖之间相比($F = 2.60, P > 0.05$),两者总体均无统计学差异。3mo 后,三组之间相比,体质量($F = 34.92, P < 0.01$)、血糖($F = 298.64, P < 0.01$),总体均具有统计学差异。与对照组相比,糖尿病组及 RU486 治疗组大鼠体质量明显降低($P < 0.01$),血糖均 > 16.7mmol/L ($P < 0.01$),而糖尿病组及 RU486 治疗组之间体质量、血糖未见明显差异($P > 0.05$,表 1)。

2.2 各组大鼠血清 GC 水平检测结果 对照组、糖尿病组及 RU486 治疗组血清 GC 浓度分别为 7.51±0.07、12.43±0.29、12.30±0.10ng/mL。三组之间比较,总体具有统计学差异($F = 741.34, P < 0.01$)。与对照组相比,糖尿病组和 RU486 治疗组血清 GC 浓度明显增加($P < 0.01$),而糖尿病组和 RU486 治疗组之间未见明显统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 GC 对糖尿病大鼠视网膜 RGC 密度的影响 视网膜 HE 染色结果显示,对照组、糖尿病组和 RU486 治疗组 RGC 密度分别为 1429.67±28.01/mm²、750.00±37.99/mm²、1270.33±35.53/mm²。三组之间比较,总体具有统计学差异($F = 325.85, P < 0.01$)。对照组 RGC 呈单层排列,形态完整。糖尿病组 RGC 排列紊乱,形态不规则,较对照组密度降低($P < 0.01$)。与糖尿病组相比,RU486 治疗组 RGC 密度明显增加($P < 0.01$,图 1)。

2.4 GC 对糖尿病大鼠视网膜 GAP-43 和 SYN 表达的影响 GAP-43 免疫荧光结果显示,GAP-43 在对照组仅表达于内丛状层,但在糖尿病组和 RU486 治疗组的节细胞层也有表达。光密度值分析结果显示,三组之间相比,总体具有统计学差异($F = 643117.28, P < 0.01$),其中糖尿病组高于对照组,但低于 RU486 治疗组(均 $P < 0.01$)。SYN

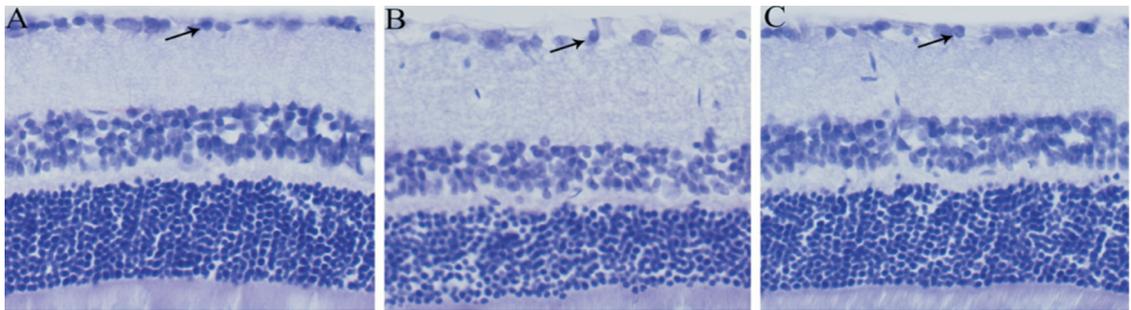


图1 视网膜 HE 染色 (×400) A:对照组;B:糖尿病组;C:RU486 治疗组(箭头示 RGC 细胞)。

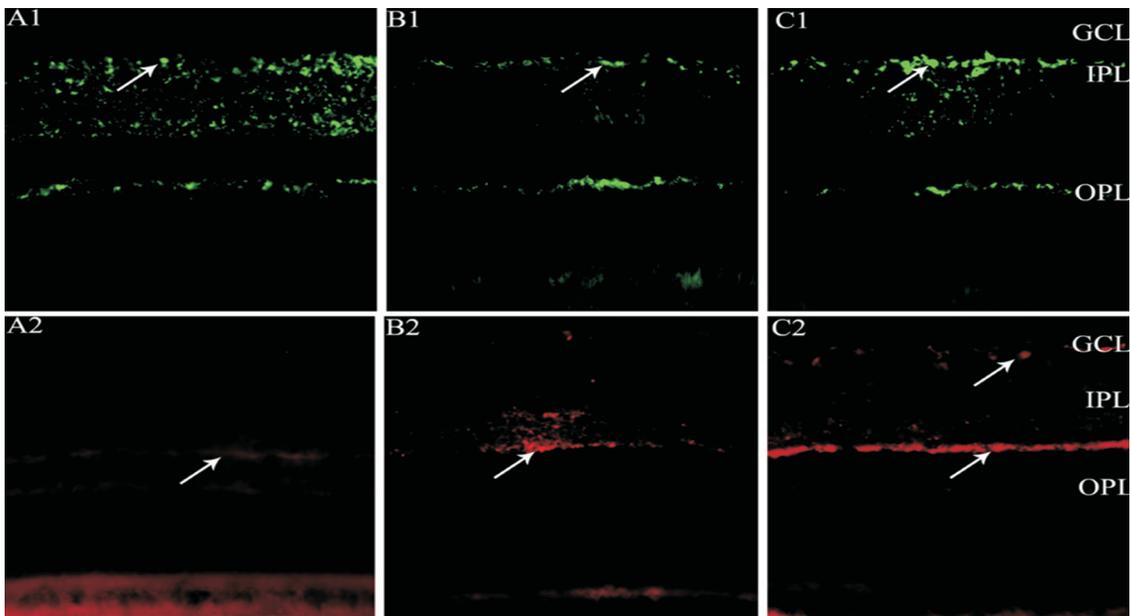


图2 免疫荧光检测 SYN(绿色)和 GAP-43(红色)在视网膜的表达(箭头示阳性表达,×400) A1、A2:对照组; B1、B2:糖尿病组;C1、C2:RU486 治疗组;GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;OPL:外丛状层。

表2 各组大鼠视网膜免疫荧光和 Western blot 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	免疫荧光光密度值		相对光密度值(%)	
	GAP-43	SYN	GAP-43	SYN
对照组	81.12 ± 0.08	231.41 ± 10.68	7.44 ± 0.65	30.98 ± 0.09
糖尿病组	152.37 ± 0.01 ^b	135.80 ± 4.17 ^b	12.42 ± 0.11 ^b	22.29 ± 0.29 ^b
RU486 治疗组	224.31 ± 0.24 ^d	186.21 ± 1.11 ^d	21.75 ± 0.05 ^d	27.66 ± 0.08 ^d

注:^b $P < 0.01$ vs 对照组;^d $P < 0.01$ vs 糖尿病组。

主要表达于内丛状层及外丛状层,光密度值分析结果显示,三组之间相比,总体具有统计学差异($F = 155.29, P < 0.01$),其中 RU486 治疗组高于糖尿病组,但低于对照组(均 $P < 0.01$,表2,图2)。

2.5 Western blot 检测各组大鼠视网膜 GAP-43 和 SYN 表达 GAP-43 检测结果显示,三组之间相比,总体具有统计学差异($F = 1077.56, P < 0.01$)。对照组 GAP-43 微量表达,糖尿病组表达增多($P < 0.01$),而 RU486 治疗组显著增多($P < 0.01$);SYN 检测结果显示,三组之间相比,总体具有统计学差异($F = 1732.36, P < 0.01$)。同对照组比较,糖尿病组视网膜 SYN 表达显著减少($P < 0.01$),同糖尿病组比较, RU486 治疗组 SYN 表达明显增多($P < 0.01$,表2,图3)。

3 讨论

糖尿病已成为一种全球流行病,预计全球的糖尿病患者人数将从2013年的2.8亿增加到2035年的5.9亿^[6]。

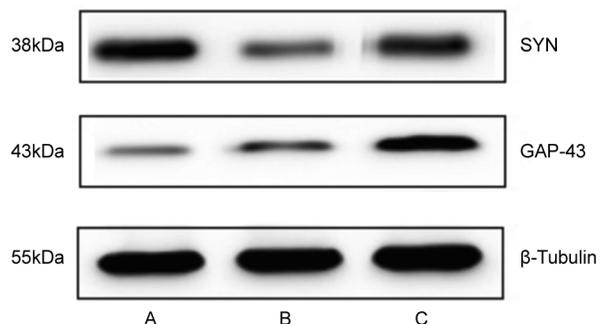


图3 Western blot 检测 GAP-43 和 SYN 蛋白相对表达量 A:对照组;B:糖尿病组;C:RU486 治疗组。

DR 发病率占2型糖尿病患者20%~40%,其中8%出现视力丧失,严重影响患者生活质量^[7]。糖尿病早期即发生视网膜神经病变,可见 RGC 损伤、凋亡及功能障碍等病理

改变。RGC 是形成视神经的细胞,RGC 的再生修复在 DR 的发生发展中显得尤为重要。

生理状态下,过多的 GC 可以反馈作用于下丘脑、垂体,使 GC 合成减少。但糖尿病时,HPA 轴灵敏度下降,GC 对 HPA 轴负反馈调节敏感性降低,致 GC 合成不断增加^[8]。GC 异常增加是糖尿病的特征之一。临床研究发现,应用 GC 短期治疗糖尿病性黄斑水肿效果较好,但长期应用可形成或加重白内障^[3]。在体研究也发现,长期大剂量使用 GC 可对视网膜产生毒性作用^[4]。但糖尿病状态下,GC 长期升高,对视网膜神经元的影响及作用尚不完全清楚。RU486 是 GC 的竞争性抑制剂,能抑制 GC 与受体的结合,从而抑制 GC 的作用。本研究发现,糖尿病状态下,血清 GC 浓度明显增加,RGC 排列紊乱,形态不规则,密度降低。由此我们推断,RGC 密度的降低一方面可能由于随着糖尿病大鼠病程的延长,糖尿病本身对 RGC 具有损害作用,另一方面可能是由于血清中 GC 浓度的升高对 RGC 的伤害性作用。而应用 RU486 处理后,RGC 密度较糖尿病组有所增加,提示拮抗 GC 的作用对 RGC 具有一定的保护作用。

GAP-43 是一种膜结合蛋白,神经元损伤后表达异常增加,是神经元生长发育的首选分子标志物^[9]。体外诱导 RGC 受损后,GAP-43 表达增强,且可持续 28d 左右^[10]。这提示 GAP-43 有助于受损的神经元修复,能加速轴突生长^[11]。本研究发现,糖尿病时 GAP-43 不仅在内丛状层表达增强,同时节细胞层的表达也反应性增强,这可能为 RGC 对损伤的反应,为 RGC 再生打下了基础。同时 RGC 密度也有所增加,提示拮抗 GC 的作用后 RU486 治疗组 GAP-43 较糖尿病组明显增高。因此,抑制 GC 的作用可能有利于神经元轴突的生长,减少 RGC 死亡数目。

SYN 是突触末梢囊泡中完整的膜蛋白,参与突触囊泡和神经递质的形成和释放,作为突触形成的标志,被广泛应用于神经元损伤后突触可塑性的研究^[12]。正常大鼠视网膜神经元之间具有复杂的突触联系。视网膜内丛状层和外丛状层是突触密集的区域,突触内含大量突触小泡,是信息传递的重要部位,其数量和结构的变化均可影响视觉功能^[13]。糖尿病时突触素蛋白糖基化可引起突触的早期退化,进而导致 SYN 含量减少,但机制不清^[14]。本研究发现糖尿病时内丛状层 SYN 表达显著减少,由此推断突触结构可能被破坏,导致内丛状层突触大量丢失。这提示 SYN 数量的减少有可能是导致 DR 视力减退的重要因素。而拮抗 GC 的作用后 RU486 治疗组 SYN 含量较糖尿病组明显升高,这提示 GC 可能参与了糖尿病状态下突触数量的变化,而突触数量的变化与神经元损伤后再生密切相关。

综上所述,拮抗 GC 的作用能上调 GAP-43 和 SYN 在糖尿病大鼠视网膜的表达,促进 RGC 轴突的再生,恢复了 RGC 密度,使其恢复正常结构功能,这提示了糖皮质激素长期升高可能参与了糖尿病视网膜病变的发生发展。但因 GC 作用机制繁琐,且拮抗 GC 的同时可能会导致内环境的紊乱,因此 RU486 在糖尿病状态下能够保护 RGC 的具体机制有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Cheung N, Mitchell P, and Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010;376:124-136
- 2 Martinac M, Pehar D, Karlovic D, et al. Metabolic syndrome, activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and inflammatory mediators in depressive disorder. *Acta Clinica Croatica* 2014;53(1):55-71
- 3 Beck RW, Edwards AR, Aiello LP, et al. Three-year follow-up of a randomized trial comparing focal/grid photocoagulation and intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 2009;127(3):245-251
- 4 张艳琼,徐格致,王文吉.糖皮质激素兔视网膜的毒性研究.中国眼耳鼻喉科杂志 2005;5(1):12-13
- 5 de Almeida TF, De CPT, Monte - Alto - Costa A. Blockade of glucocorticoid receptors improves cutaneous wound healing in stressed mice. *Exp Biol Med* 2016;241(4):353-358
- 6 Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pr* 2014;103(2):137-149
- 7 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版).中国糖尿病杂志 2014;88(8):26-89
- 8 Sun SY, Hwang IK, Shin JH, et al. Regulatory mechanism of hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and neuronal changes after adrenalectomy in type 2 diabetes. *J Chem Neuroanat* 2010;40(2):130-139
- 9 Afarid M, Torabi-Nami M, Zare B. Neuroprotective and restorative effects of the brain-derived neurotrophic factor in retinal diseases. *J Neurol Sci* 2016;363:43-50
- 10 Sánchez-Chávez G, Hernández-Ramírez E, Osorio-Paz I, et al. Potential Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Neurochem Res* 2015;41(5):1-9
- 11 Bikbova G, Oshitari T, Baba T, et al. Neurotrophic factors for retinal ganglion cell neuropathy - with a special reference to diabetic neuropathy in the retina. *Curr Diabetes Rev* 2014;10(3):166-176
- 12 Ilha J, Centenaro LA, Cunha NB, et al. The Beneficial Effects of Treadmill Step Training on Activity-Dependent Synaptic and Cellular Plasticity Markers After Complete Spinal Cord Injury. *Neurochem Res* 2011;36(6):1046-1055
- 13 Huang J. Regulatory effects of inhibiting the activation of glial cells on retinal synaptic plasticity. *Neural Regen Res* 2014;9(4):385-393
- 14 D'Cruz TS, Weibley BN, Kimball SR, et al. Post-translational processing of synaptophysin in the rat retina is disrupted by diabetes. *Plos One* 2012;7(9):e44711