

米诺环素对糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡的影响

练海东¹ 任兵^{2△} 高晓唯² 郭继华³ 解玉军⁴ 张改丽⁴ 赵旭东⁴ 刘莹⁴

(1 石河子大学医学院一附院眼科 新疆 石河子 832000 2 解放军 474 医院全军眼科中心 新疆 乌鲁木齐 830013 ;
3 解放军 474 医院病理科 新疆 乌鲁木齐 830013 4 石河子大学医学院 新疆 石河子 832000)

摘要 目的 观察米诺环素对糖尿病大鼠视网膜神经细胞的凋亡的影响,研究米诺环素对糖尿病视网膜神经保护作用,对米诺环素在糖尿病视网膜疾病中抑制神经细胞凋亡提供理论支持。方法 选择健康成年雄性 SD 大鼠 30 只,随机分成正常对照组、糖尿病模型组和米诺环素治疗组,每组 10 只。腹腔内注射链脲佐菌素(STZ)诱发大鼠糖尿病。米诺环素治疗组给予米诺环素腹腔注射(45mg/kg),共注射 10d,模型组和对照组腹腔注射等体积生理盐水,于给药后 8 周的 3 组动物处死,冰浴下取其视网膜组织,随后制备视网膜石蜡切片,采用末端脱氧核糖核酸介导生物素化脱氧尿嘧啶缺口末端标记(TUNEL)法进行凋亡细胞原位标记,行视网膜神经细胞凋亡计数,对所有数据进行统计学分析。实验结果拟用均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果:相同观察时相,与阴性对照组比较,模型对照组大鼠视网膜 TUNEL 阳性细胞显著增多($P < 0.01$),在米诺环素组,大鼠视网膜 TUNEL 阳性细胞数比模型对照组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 米诺环素能有效降低糖尿病大鼠视网膜神经细胞的凋亡,对糖尿病视网膜神经细胞有保护作用。

关键词 糖尿病视网膜病变 米诺环素 凋亡

中图分类号 Q95-3 R587.1 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273 (2011) 13-2435-03

Effects of Minocycline on Apoptosis of Retinal Nerve Cells of Rats with Diabetic Retinopathy

LIAN Hai-dong¹, REN Bing^{2△}, GAO Xiao-wei², GUO Ji-hua³, XIE Yu-jun⁴, ZHANG Gai-li⁴, ZHAO Xu-dong⁴, LIU Ying⁴

(1 Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Medical college, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832000, China;

2 Ophthalmic Center, NO.474 Hospital of Chinese PLA, Urumuqi, Xinjiang, 830013, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of the Minocycline (MNC) on expression of apoptosis in retinal nerve cells of rat with diabetic retinopathy (DR). **Methods:** A total of 30 male SD rats were randomly divided into negative control group, model control group and MNC treated group. Diabetes model was established by intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin (STZ). Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL staining) was used to observe neuron apoptosis in retina. All the experimental data were expressed by Mean+standard deviation. **Results:** Compared with the negative control group, TUNEL positive cells in retina were increased significantly ($P < 0.01$) in model control group. However, TUNEL positive cells in retina in MNC treated group were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** MNC can obviously decrease the expression of apoptosis in retina with DR. It is one of path of inhibiting impairment on retinal nerve cells with DR.

Key words: Diabetic retinopathy; Minocycline; Apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 13-2435-03

前言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见且最严重的并发症之一,现已成为糖尿病患者致盲的首要原因^[1],严重影响了糖尿病患者的生活质量,虽然,近年来对 DR 的研究已取得很大进展,然而,到目前为止国内外尚无有效治疗方法。本研究旨在通过观察米诺环素对糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡的干预作用,初步探讨其对 DR 的防治作用。报告如下。

作者简介 练海东(1980),男,主治医师,硕士研究生,研究方向:眼底病,眼外肌病,电话 0993-2666596

E-mail: lianhaidong0229@163.com

△通讯作者 任兵,男,教授,主任医师,硕士生导师,

E-mail: haidong0229@163.com

(收稿日期 2011-01-20 接受日期 2011-02-15)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 米诺环素(华北制药有限公司提供)。链脲佐菌素(美国 Sigma 公司); TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒(凯基生物公司)。

1.1.2 动物 清洁级雄性 SD 大鼠(新疆医科大学实验动物中心提供)30 只,体重 200-230g。

1.1.3 仪器 One Tuche 血糖仪及血糖试纸条(美国 Lifescan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型制备、分组与给药 将 30 只大鼠随机法分为阴性对照组 10 只、模型对照组和米诺环素治疗组共 20 只。糖尿病模型在大鼠禁食 12 h 后,采用一次性腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg, pH 4.5)的方法制作,阴性对照组注射等体积的柠

檬酸钠缓冲液。72h 后尾静脉测血糖浓度大于 16.7mmol/l 入选为糖尿病鼠。造模成功一周后每天米诺环素治疗组按 45mg/kg 腹腔注射米诺环素,共注射 10d。对照组腹腔内注射等体积生理盐水,20 只成模大鼠常规饲养,每周尾静脉采血测血糖浓度均大于 16.7mmol/l。

1.2.2 视网膜石蜡切片的制备 试验 8 周末,每组 10 只大鼠 (20 只眼) 用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.5 g/kg),眼科镊迅速摘除眼球,固定于 10 %多聚甲醛溶液中(4℃,24 h)。于锯齿缘后 0.5 mm 处沿赤道方向切开眼球,去除眼前节,余下的组织行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,全层石蜡包埋,平行于视神经矢状轴对视网膜行连续切片,制成 4μm 切片。行常规 HE 染色。

1.2.3 视网膜神经细胞凋亡采用 TUNEL 法检测 严格按试剂盒说明进行操作:(1) 切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,抗原修复,进入标记反应。(2) PBS 漂洗两次,样本滴加 50μlTdT 酶反应液,加盖玻片 37℃避光湿润反应 60min。(3) PBS 漂洗三次,样本滴加 50μlStreptavidin-HRP 工作液,加盖玻片 37℃避光湿润反应 30min。(4) PBS 漂洗三次,样本滴加 50μlDAB 工作液,室温显色反应 10min。(5) PBS 漂洗三次,苏木素轻度复染,脱水、透明后封片。(6) 阳性对照 抗原修复后,用 DNAase-1 消化组织打断所有细胞 DNA 链。阴性对照:用 PBS 缓冲液代替 TdT 酶反应液,余步骤均相同。

1.2.4 显微镜观察 TUNEL 阳性物质位于细胞核内,呈棕黄色,在 400 倍光学显微镜下在后极部分别随机选取 3 个视野,计数阳性细胞数和视网膜神经细胞总数得到平均值,计算凋亡指数 (apoptosis index, AI) = 凋亡细胞数 / 视网膜神经细胞总数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对不同组测试指标的总体差异比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 SNK-q 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜组织病理学改变

苏木精 - 伊红染色显示正常组与米诺环素组视网膜各层结构清晰,细胞排列紧密整齐,糖尿病组大鼠视网膜各层结构清晰,细胞排列疏松,细胞间隙增大,尤以内核层和神经节细胞层为著,细胞形态与正常组无明显差异。

2.2 视网膜细胞凋亡检测结果

正常大鼠视网膜在神经节层可见少量凋亡细胞,余层未见凋亡细胞 糖尿病组大鼠视网膜神经节细胞层和内核层均出现凋亡细胞,数量较正常组明显增多(P<0.01) 在米诺环素治疗组中,大鼠视网膜神经节细胞层和内核层均出现凋亡细胞,数量较模型组降低,差异有统计学意义(P<0.01)。(表 1,图1)。

表 1 米诺环素对大鼠视网膜神经细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Minocycline on apoptosis of retinal nerve cells of rats in each group

Group	n	AI
Negative control	20	3.20± 1.08
Model control	20	30.60± 10.15 ^a
Minocycline	20	16.45± 6.62 ^f
P		< 0.01

^a P < 0.01 vs respective negative control group; ^f P < 0.01 vs respective model control group (ANOVA,SNK-q test)

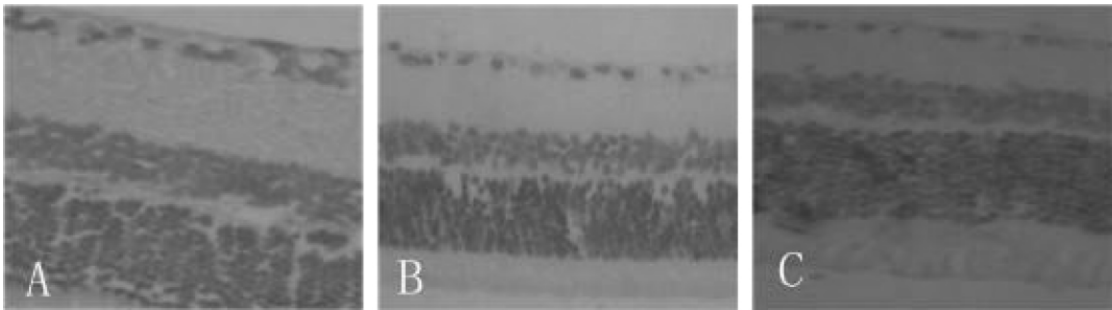


图 1 凋亡细胞在各实验组视网膜神经细胞中的表达(×400)A:对照组 B:模型组 C:治疗组

Figure 1 Expression of apoptosis in retinal nerve cells of rats in each group A: Negative control; B: Model control; C: Minocycline

3 讨论

DR 是糖尿病长期胰岛素分泌绝对或相对不足、体内糖、脂等代谢紊乱引发的一系列眼内并发症。目前认为在糖尿病引起视网膜血管发生病变前,在早期即发生了视网膜神经元的病变,糖尿病代谢紊乱可能首先影响视网膜神经元,微血管病变则是其继发影响的结果。其病变的发生与视网膜光感受器细胞与神经节细胞等神经细胞的凋亡密切相关^[2],但糖尿病诱导视

网膜细胞凋亡的机制仍不明确。山梨糖醇的聚集的降低可明显缓解视网膜神经节细胞层的损害^[3]。糖基化终产物的形成可能对视网膜产生毒性作用,通过非酶糖基化途径诱导视网膜细胞凋亡^[4,5]。另外还与蛋白激酶 C 激活^[6]、多种细胞因子的异常表达^[7]、氧化应激^[8]、炎症反应及基因多态性^[9,10]有关。有研究表明早期视网膜毛细血管周细胞和神经细胞选择性丧失可能是 DR 发生发展的始动因素,而细胞凋亡是早期细胞选择性丢失的主要原因^[11]。细胞凋亡是在生理或病理的条件下,通过细胞凋亡

外通道和细胞凋亡内通道激发了蛋白酶组成的级联反应^[12],并受细胞内部多种基因的直接调控^[13]。

米诺环素是第二代人工半合成的四环素类药,已用于皮肤科,因其可穿透血-脑屏障,对人安全,使之对中枢神经产生作用有了先决条件,近年来人们发现,米诺环素在脑缺血、脑外伤等^[14,15]中枢神经疾病和视网膜疾病^[16]动物模型中具有显著的神经保护作用。米诺环素对视网膜神经保护作用也越来越引起人们的重视。米诺环素对 DR 的神经细胞具有保护作用,其机制可能为: (1) 抑制促炎症反应因子释放而抑制细胞坏死^[17]; (2) 阻止 TNF 诱导产生的 *cox-2* 在小胶质细胞的表达,抑制小胶质细胞活化^[18]; (3) 通过抑制死亡受体途径^[19]及抑制 *capase-8*、*-1*、*-9*、*-3* 激活^[16,20]而减少细胞凋亡。

在研究 DR 的发病机制、预防治疗及形态学等方面目前主要使用是用链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型,本研究成功建立了链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型,成模率达 100%并且结果显示糖尿病早期的视网膜血管无明显变化,未见凋亡细胞在血管的阳性表现,早期糖尿病大鼠视网膜凋亡主要发生在内层视网膜,主要是在神经节细胞层与内核层,正常的大鼠所表现的视网膜细胞凋亡也仅仅在神经节细胞层有少量表达,表明糖尿病大鼠的视网膜细胞的凋亡首先从神经节细胞层出现,然后逐渐由内而外遍布整个视网膜,神经节细胞层相对与其他的细胞对于环境的改变也更敏感,更容易出现病理性改变。由此而影响视网膜的功能,视网膜神经组织的凋亡早于血管组织的异常,寻找对抗凋亡作用的药物是非常必要,在本研究中,米诺环素组视网膜各层结构清晰,细胞排列紧密整齐,糖尿病组大鼠视网膜各层,细胞排列疏松,细胞间隙增大,尤以内核层和神经节细胞层为著,在米诺环素治疗组中,大鼠视网膜神经节细胞层和内核层均出现凋亡细胞,数量较模型组显著降低 ($P < 0.01$)。说明对于早期糖尿病的视网膜的神经细胞,米诺环素可通过减少神经细胞的凋亡而抑制神经细胞的损害,尤其是在糖尿病早期减少神经节细胞层、内核层细胞的凋亡,从而改善视功能。本研究对米诺环素在糖尿病视网膜疾病中神经细胞的保护作用提供了一定的理论依据,但其抗细胞凋亡的具体机制可能在多个层面、多个环节发挥作用,还需要进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] Studhome S. Diabetic retinopathy[J]. J Perioper Pract, 2008, 18(5): 205-210
- [2] Park S H, Park J W, Park S J, et al. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina[J]. Diabetologia, 2003, 46(9): 1260-1268
- [3] Cheung AK, Fung MK, Lo AC, et al. Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice [J]. Diabetes, 2005 Nov, 54(11): 3119-3125
- [4] Kaji Y, Usui T, Ishida S, et al. Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007 Feb, 48(2): 858-865
- [5] Yatoh S, Mizutani M, Yokoo T, et al. Antioxidants and an inhibitor of advanced glycation ameliorate death of retinal microvascular cells in diabetic retinopathy[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2006, 22(1): 38-55
- [6] Harhaj NS, Felinski EA, Wolpert EB, et al. VEGF activation of protein kinase C stimulates occluding phosphorylation and contributes to endothelial permeability [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006 Nov, 47(11): 5106-5115
- [7] Zhu B, Wang W, Gu Q, et al. Erythropoietin protects retinal neurons and glial cells in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Exp Eye Res, 2008 Feb, 86(2): 375-382
- [8] Al-Shabraway M, Batroli M, EL-Remessy A, et al. Role of NADPH Oxidase and STAT3 in Statin-mediated Protection Against Diabetic Retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008 Mar, 31
- [9] Takase A, Yasukawa T, Kato A, et al. Suppressive effect of short-in-terfering RNA on hyperglycemia-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on cultured vascular endothelial cells [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008 Mar, 26
- [10] Malecki MT, Cyganek K, Mirkiewicz-Sieradzka B, et al. Alanine variant of the Prol-Ala polymorphism of the PPARgamma gene might be associated with decreased risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008 Apr, 80(1): 139-145
- [11] Zheng L, Gong B, Hatala DA, et al. Retinal ischemia and reperfusion cause capillary degeneration: similarities to diabetes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(1): 361-7
- [12] Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak[J]. Biochem J, 2007, 405: 407-415
- [13] Carrasco E, Hernandez C, Miralles A, et al. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration[J]. Diabetes Care, 2007, 30(11): 2902-2908
- [14] Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice [J]. Nature, 2002, 417(6884): 74-78
- [15] Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease [J]. Nat Med, 2000, 6(10): 797-801
- [16] Hani Levkovitch-Verbin, Maia Kalev-Landoy, Zohar Habet-Wilner, Shlomo Melamed. Minocycline Delays Death of Retinal Ganglion Cells in Experimental Glaucoma and After Optic Nerve Transection [J]. Arch Ophthalmol, 2006 124(4): 520-526
- [17] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis[J]. Science, 2006; 311: 847-851
- [18] Puyal J, Vaslin A, Mottier V, Clarke PG. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy [J]. Ann Neurol, 2009, 66: 378-389
- [19] Kelly KJ, Sutton TA, Weathered N, Ray N, Caldwell EJ, Plotkin Z, et al. Minocycline inhibits apoptosis and inflammation in a rat model of ischemic renal injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287(4): 760-766
- [20] Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, et al. Minocycline inhibits caspase-independent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(18): 10483-10487