

骨钙素减轻糖尿病大鼠血 - 视网膜屏障的损伤 *

张全鹏¹ 周利红² 刘政海³ 劳梅丽^{1△}

(1 海南医学院解剖学教研室 海南 海口 571101 2 中南大学基础医学院解剖学与神经生物学系 湖南 长沙 410013 ;

3 南华大学医学院解剖学系 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:研究骨钙素(Osteocalcin)对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠血 - 视网膜屏障的影响。方法:取健康 SD 大鼠 24 只,随机分为正常对照组、糖尿病 1 月(DM1)组、糖尿病骨钙素干预(DM1+OCGY)组。尾静脉注射 STZ 建立 DM 模型,成模后 DM1+OCGY 组腹腔注射骨钙素($2.57 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),DM1 组腹腔注射等量生理盐水,1 个月后处死动物。用伊文思蓝方法检测大鼠血 - 视网膜屏障的改变。结果:造模 1 月后大鼠视网膜血管渗透性显著增加,共聚焦显微镜显示红色荧光斑点主要分布在视网膜血管周围,给予骨钙素后,红色荧光斑点明显减少,进一步定量显示 1M 糖尿病大鼠视网膜伊文思蓝含量为 $57.4 \pm 8.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,骨钙素能够改变这种变化,DM1+OCGY 组伊文思蓝含量为 $26.1 \pm 3.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论:骨钙素能抑制糖尿病视网膜病的血管渗漏,对糖尿病引起的血 - 视网膜屏障破坏有保护作用。

关键词: 骨钙素;血 - 视网膜屏障;伊文思蓝;糖尿病视网膜病

中图分类号:R587.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)13-2416-03

Effects of Osteocalcin in Mitigation of Blood-Retinal Barrier Damage in Diabetic Rats*

ZHANG Quan-peng¹, ZHOU Li-hong², LIU Zheng-hai³, YI Xi-nan^{1△}

(1 Department of Anatomy, Hainan Medical College, Haikou 571101, China;

2 Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya school of medicine, Central South University, Changsha 410013, China;

3 Department of anatomy, Medical college of NanHua University, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of osteocalcin on the blood-retinal barrier in streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods: 24 SD rats were randomly divided into three groups, N control group, DM1 group and DM1+OCGY group. Following inject the STZ into rat tail vein to establish DM rat model, intraperitoneal injection with osteocalcin ($2.57 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) were carried in the group DM1+OCGY, and intraperitoneal injection with the same doses saline were carried in the group DM1. All the animals survived a month and were killed then. The changes of blood-retinal barrier were detected by using Evans blue (EB). **Results:** Retinal vascular permeability was increased significantly in DM1 rats. By the confocal microscopy, the red fluorescence spots were mainly located around blood vessels in the retina, which were obviously reduced after injection with the osteocalcin. Further quantitation showed the EB content of retina was $57.4 \pm 8.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ in DM1 rats, while the EB content of retina in DM1+OCGY rats was $26.1 \pm 3.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Osteocalcin could alter the change. **Conclusions:** The osteocalcin can inhibit vascular leakage in diabetic retinopathy, and play a protective role in the blood-retinal barrier breakdown induced by diabetes.

Key words: Osteocalcin; Blood-retinal barrier; Evans blue; Diabetic retinopathy

Chinese Library Classification(CLC): R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)13-2416-03

最近研究发现骨骼能分泌一种骨钙素(osteocalcin)的蛋白质,参与机体能量代谢的负反馈调节。骨钙素能通过刺激胰岛β细胞增殖、胰岛素分泌增加和瘦素(一种脂肪细胞中对胰岛素敏感的脂肪转移因子,leptin)的表达而降低血糖和调节脂肪的代谢^[1]。糖尿病视网膜病(Diabetic retinopathy,DR)是糖尿病(Diabetesmellitus,DM)最常见的并发症之一,其主要病理改变是血 - 视网膜屏障(blood-retinal barrier,BRB)破坏,导致其对脂类、蛋白质等的通透性增加,主要临床表现为微血管瘤、出血、硬性渗出、黄斑水肿。而骨钙素对 DR 的 BRB 破坏的影响尚未见报道。因此,本文利用大鼠 DR 动物模型研究骨钙素对 DM

大鼠 BRB 破坏的影响,探讨骨钙素对 DR 的可能作用,为眼科治疗 DR 提供理论依据。

1 材料与方法

清洁级雄性 8 周龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只,体重(200 ± 20) g,购自海南医学院动物部。随机分为 DM 1 个月(DM1)组、DM 骨钙素干预(DM1+OCGY)组及正常对照(N)组,其中,正常对照组 8 只,其余 DM1 组和 DM1+OCGY 组各 8 只。16 只大鼠按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量尾静脉一次性注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ,美国 Sigma 公司,溶解于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

* 基金项目 国家自然科学基金青年基金资助项目(30800591)

作者简介:张全鹏(1977-)男,硕士,讲师,研究方向:神经损伤与修复 电话:15595791128 E-mail:zhangquanpeng@hotmail.com

△通讯作者 劳梅丽, E-mail: lmlvast@sina.com

(收稿日期 2011-03-16 接受日期 2011-04-10)

柠檬酸缓冲液 pH 值 4.5) ,1 周后检查 ,尾静脉取血检查血糖 > 16.7mmol·L⁻¹、尿糖强阳性确定为 DM 大鼠。大鼠建模成功后随机取 8 只每天给予腹腔注射未经化骨钙素(骨钙素的提取和纯化^[1]) ,其剂量根据文献^[2]小鼠体重折算成大鼠体重为 2.57mg·kg⁻¹。实验结束时,去除中间死亡鼠及血糖恢复鼠 ,DM1 组和 DM1+OCGY 组以每组 6 只鼠作为实验统计样本。模型制作成功后 ,于相应时间点处死前 2 小时从大鼠大隐静脉注射 3 %伊文思蓝(Evans blue ,EB ;美国 Sigma 公司) (45mg·kg⁻¹) ,见动物眼睛、足趾迅速变蓝 ,指示染料均匀分布。每组各摘取 3 只大鼠视网膜组织进行铺片 ,共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)观察 ;同时每组取 3 只大鼠行伊文思蓝 BRB 通透性的测定^[3]。各组计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用 SPSS13.0 统计软件 ,行单因素方差分析(one-way ANOVA) $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

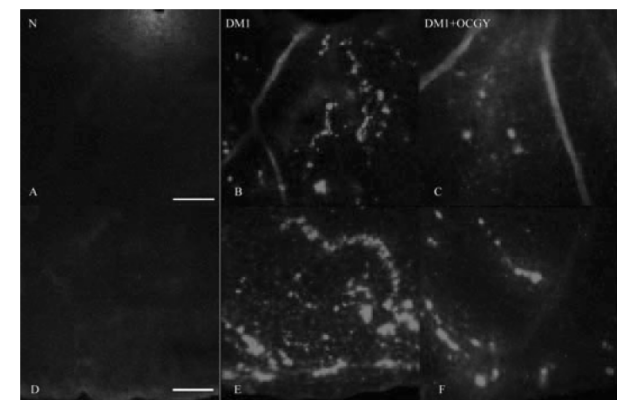


图 1 DM 大鼠视网膜铺片 EB 染色

红色荧光斑点为渗漏的 EB ,N 正常对照 ,DM1 糖尿病大鼠存活 1 个月 ,DM1+OCGY 糖尿病大鼠存活一个月并给予骨钙素干预 ;A,B,C, 各组大鼠视网膜的中央部 ,D,E,F, 各组大鼠视网膜的周围部 ,bar=50um

Fig. 1 Staining of EB in the DM rat retinal wholemount
Red fluorescence spots represent the leakage of EB; N, control; DM1,DM rats survived a month;DM1+OCGY, rats survived a month and was injected with osteocalcin; A,B,C, central retina of rat in each group; D,E,F, peripheral retina of rat in each group;bar=50um

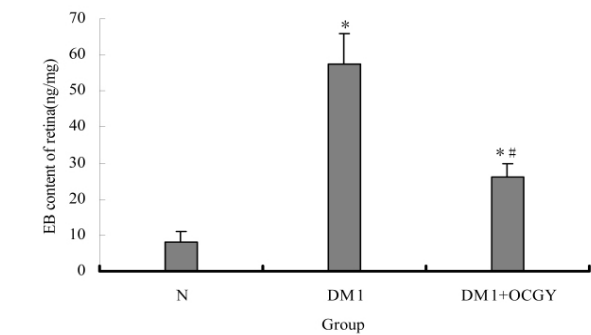


图 2 糖尿病大鼠 EB 渗漏量

DM1,糖尿病 1 月组 ,DM1+OCGY,糖尿病骨钙素干预组 ,* ,与正常对照比较 $P < 0.05$ #,与糖尿病 1 月组比较 $P = 0.001$

Fig. 2 The leakage of EB in the DM rat retina
DM1,DM rats survived a month;DM1+OCGY, rats survived a month and was injected with osteocalcin; * ,VS control group, $P < 0.05$; #,VS DM1 group, $P = 0.001$

正常大鼠视网膜未见 EB 红色荧光斑点 ,DM1 大鼠视网膜中央部(图 1 B)和周围部(图 1 E)均可见明显的 EB 红色荧光斑点 ,位于血管外 ;DM1 大鼠给予骨钙素干预后 ,视网膜中央部(图 1 C)和周围部(图 1 F)的红色荧光斑点明显减少。正常大鼠视网膜 EB 含量为 $8.2 \pm 2.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,DM1 大鼠视网膜 EB 含量为 $57.4 \pm 8.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,骨钙素能够改变这种变化 ,DM1 + OCY 组视网膜 EB 含量为 $26.1 \pm 3.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P = 0.001$,图 2)。

3 讨论

BRB 类似血脑屏障 ,可选择性调节视网膜神经组织的局部微环境 ,调节血管内外渗透平衡、离子浓度和糖、脂质、氨基酸等营养物质及代谢产物的转运 ,此外 ,还能限制免疫球蛋白、白蛋白等大分子和循环中的免疫细胞进入神经视网膜^[4] ,从而保护视网膜神经组织不受血液中炎症细胞及细胞毒性产物的影响。因此 ,BRB 对调节视网膜的局部微环境 ,维持其稳态起重要作用^[5]。BRB 破坏是 DR 发病过程的重要一环^[6] ,早在临床可见的 DR 发病之前就可以检测到 BRB 的破坏。检测 BRB 的破坏对了解 DR 具有重要的意义^[3]。伊文思蓝(Evans blue,EB)是一种四钠重氮荧光染料 ,3 %EB 静脉注射后能在血液内与白蛋白结合 ,循环到各脏器 ,从毛细血管渗透到组织间。由于正常视网膜存在 BRB ,血管中结合 EB 的白蛋白不能穿过 BRB ,而 BRB 破坏后 ,结合 EB 的白蛋白就能渗透到视网膜组织间隙中 ,因此 ,检测视网膜组织间隙中的 EB 含量 ,可间接反映 BRB 的破坏情况。本实验应用伊文思蓝作为示踪剂检测 DR 的 BRB 的破坏。结果表明 ,DM1 大鼠与正常大鼠相比 ,BRB 的渗漏明显增加 ,从视网膜铺片上可见明显的 EB 渗漏的红色荧光斑点 (图 1 B,E) ;定量显示 DM1 大鼠视网膜 EB 渗漏量是正常大鼠的 7 倍(图 2)。这与 Ishida、李艳等研究结果基本一致^[7,8]。

骨钙素 (osteocalcin) 亦称骨 γ - 羧基谷氨酸蛋白 (bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein ,BGP) 或骨依赖维生素 K 蛋白 (bone vitamin K dependent protein) ,是非增殖期成骨细胞特异合成与分泌的一种非胶原蛋白^[9] ,文献报道^[2]长时程给予小鼠骨钙素 ,可明显减轻 DM 小鼠高糖和高脂肪饮食对身体的损害、减轻 DM 的发展。但骨钙素是否对 DR 的 BRB 有影响 ,目前尚不清楚。因此 ,本实验应用 DM1 大鼠模型 ,给予未经化骨钙素干预 ,结果发现骨钙素能明显减轻 DM1 大鼠 BRB 的渗漏。从视网膜铺片上看 ,与 DM1 大鼠比较 ,视网膜上的红色荧光斑点明显减少(图 1 C,F) ,进一步定量显示 DM1 大鼠视网膜 EB 含量为 $57.4 \pm 8.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,骨钙素能够改变这种变化 ,DM1+OCGY 组大鼠视网膜 EB 含量为 $26.1 \pm 3.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P = 0.001$,图 2)。因此 ,骨钙素能减轻 DR 的 BRB 的破坏 ,对 DR 的视网膜损伤具有保护作用。贾红蔚等^[10]报道 STZ 诱导的糖尿病大鼠血中骨钙素水平显著减低。机体缺乏骨钙素时胰岛素分泌和敏感性降低 ,葡萄糖耐量降低 , β 细胞量和 leptin 表达降低 ,导致糖尿病的发生发展^[9] ,从而加剧并发症 DR 的发病。糖尿病大鼠体外给予骨钙素干预后 ,骨钙素能代偿 STZ 诱导的糖尿病大鼠骨钙素水平减少 ,并可能通过使胰岛素分泌和敏感性的升高、葡萄糖耐量的变化、 β 细胞量和 leptin 表达增加 ,从而延缓 DM 的发生发展而间接减轻 DR 的 BRB 的破坏 ,其具体机制以及骨钙素是否直接作用于 BRB 仍需进一步研究证实。

参考文献(References)

- [1] Lee N K, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton[J]. Cell, 2007, 130 (3): 456-469
- [2] Mathieu Ferron, Eiichi Hinoi, Gerard Karsenty, et al. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice[J]. PNAS, 2008, 105(13):5266-5270
- [3] Xu QW, Qaum TM, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(3):789-794
- [4] Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA. Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions[J]. Angiogenesis, 2007, 10 (2):103-117
- [5] Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier in hypoxic ischemic conditions: Basic concepts, clinical features and management [J]. Prog Retin Eye Res, 2008, 27(6):622-647
- [6] Frank RN. Diabetic Retinopathy[J]. N Engl J Med, 2004, 350(1):48-58
- [7] Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(5):2155-2162
- [8] 李艳, 李筱荣, 刘巨平等. 糖尿病大鼠血 - 视网膜屏障损伤观察[J]. 中华眼底病杂志, 2007, 23(4):289-290
- Li Yan, Li Xiaorong, Liu Juping et al. Observation on blood-retinal barrier damage of diabetic rat [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2007, 23(4): 289-290
- [9] 刘裕, 黄贵心. 骨钙素与糖尿病关系的研究现状[J]. 广东医学院学报, 2010, 28(1):75-77
- Liu Yu, Huang Guixin. Progress on the relationship between osteocalcin and diabetes [J]. Journal of Guangdong Medical College, 2010, 28 (1):75-77
- [10] 贾红蔚, 崔瑾, 张鑫等. 链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠骨转换变化及其分子机制的研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26(2):99-103
- Jia Hongwei, Cui Jin, Zhang Xin, et al. Bone turnover and its related molecular mechanism in STZ-induced diabetic rats[J]. Chin J Endocrinol Metab. 2010, 26(2):99-103

· 重要信息 ·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法 and 应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。