

· 论著 ·

生长抑素对糖尿病大鼠视网膜病变的神经保护作用及对 GFAP、突触素表达的影响

张博 李凤君 左中夫

【摘要】目的 探讨生长抑素对糖尿病大鼠视网膜病变的神经保护作用及对神经胶质酸性蛋白(GFAP)、突触素表达的影响。**方法** 清洁级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠24只,应用随机数字表法分成对照组、糖尿病组、生长抑素治疗组,每组8只。糖尿病组、生长抑素治疗组采用链脲佐菌素诱导糖尿病模型,模型诱导成功后,生长抑素治疗组给予腹腔注射鼠生长抑素($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。对照组、糖尿病组给予等剂量生理盐水。12周后,HE染色检测视网膜神经节细胞(RGC)密度,免疫荧光检测视网膜GFAP、突触素表达,Western印迹检测视网膜GFAP、突触素蛋白的相对表达量。**结果** 与对照组相比,糖尿病组RGC密度下降,GFAP荧光强度升高,突触素荧光强度降低,GFAP蛋白表达升高,突触素表达降低($F = 187.62, 226.12, 159.30, 259.09, 425.93, P < 0.01$);而与糖尿病组相比,生长抑素治疗组RGC密度增加,GFAP荧光强度降低,突触素荧光强度升高,GFAP表达下降,突触素表达增加($F = 187.62, 226.12, 159.30, 259.09, 425.93, P < 0.01$)。**结论** 生长抑素可能通过抑制胶质细胞活化,上调视网膜突触素表达,恢复视网膜RGC密度,对糖尿病视网膜病变具有神经保护作用。

【关键词】 生长抑素;糖尿病视网膜病变;神经保护;神经胶质酸性蛋白;突触素

基金项目:中国博士后科学基金项目(2017M612870);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(LJQ2015069);辽宁省自然科学基金(201602340)

The neuroprotection of somatostatin and its effects on the expression of GFAP and synaptophysin in rats with diabetic retinopathy Zhang Bo^{*}, Li Fengjun, Zuo Zhongfu. ^{*}Department of Ophthalmology, Huludao Ai'er Eye Hospital, Huludao 125001, China

Corresponding author: Zuo Zhongfu, Email: 394499576@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the neuroprotective effects of somatostatin and its effects on the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and synaptophysin (SYN) in rats with diabetic retinopathy. **Methods** A total of 24 clean male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into control group, diabetic group and somatostatin treatment group according to random number table, with 8 rats in each group. Diabetes was induced by streptozotocin in diabetic group and somatostatin treatment group. After diabetes was induced, rats in somatostatin treatment group were given somatostatin ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by intraperitoneal injection. Rats in control group and diabetic group were given the equal dose of saline. After 12 weeks, the density of retinal ganglion cells (RGC) were detected by HE staining; the expression of retinal GFAP and SYN were detected by immunofluorescence and Western blotting. **Results** Compared with control group, the fluorescence intensity of GFAP was significantly increased while the RGC density and the fluorescence intensity of SYN were decreased significantly. The expression of GFAP protein were increased and the expression of SYN protein was decreased in diabetic group compared with control group ($F = 187.62, 226.12, 159.30, 259.09, 425.93$, all $P < 0.01$). Compared with diabetic group, the fluorescence intensity of GFAP was decreased significantly while the RGC density and the fluorescence intensity of SYN were increased significantly. The expression of GFAP was decreased and the expression of SYN was increased in so-

matostatin treatment group compared with diabetic group ($F = 187.62, 226.12, 159.30, 259.09, 425.93$, all $P < 0.01$)。Conclusion Somatostatin may increase the expression of SYN and restore the density of RGC by inhibiting the activation of glial cells, which suggests that somatostatin may play a neuroprotective role in diabetic retinopathy。

【Key words】 Somatostatin; Diabetic retinopathy; Neuroprotection; Glial fibrillary acidic protein; Synaptophysin

Fund program: China Postdoctoral Science Foundation Project (2017M612870); Liaoning Provincial Outstanding Young Scholars Growth Plan (LJQ2015069); Natural Science Foundation of Liaoning Province of China (201602340)

糖尿病视网膜病变(DR)的患病率逐年增加,病程20年以上的糖尿病患者DR患病率约为75%,为糖尿病人群最常见眼部并发症^[1]。目前临幊上治疗多以降血糖为主,同时结合个体化治疗^[2]。但仍不能有效阻止DR的发生、发展。近年来研究发现,神经病变为微血管病变之外参与DR的重要发病机制^[3]。因此,有效预防和治疗DR神经病变亦尤为重要。生长抑素在神经病变领域一直备受关注,有研究发现,生长抑素对DR状态下小胶质细胞介导的炎性反应具有保护作用,且对DR早期电生理改变具有一定的改善作用^[4-5]。但对DR神经病变的影响还未见报道。因此,本研究通过腹腔注射生长抑素,探讨生长抑素对糖尿病大鼠视网膜神经病变的保护作用,期望为DR治疗策略的探讨提供更全面的认识。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂仪器 雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠24只[批号:0000369,购自锦州医科大学SPF级动物中心,许可证号:SCXK(辽)2014-12],体质量180~220 g,动物每天给予清洁营养丰富的饲料,环境温度稳定在20℃~25℃,相对湿度为50%~70%,实验遵循国家《实验动物管理条例》。生长抑素类似物(盐酸注射用奥曲肽)购自上海楚肽生物科技有限公司;链脲佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司;兔抗大鼠神经胶质酸性蛋白(GFAP)、兔抗大鼠突触素购自Abcam公司;HE染色试剂盒、荧光二抗及Western印迹二抗购自碧云天公司。荧光倒置显微镜为日本Olympus公司;冰冻切片机为德国SLEE公司;水平电泳仪为美国BIO-RAD公司。

1.2 动物分组及动物模型的制备 24只雄性SD大鼠,应用随机数字表法分成对照组、糖尿病组、生长抑素治疗组,每组8只。糖尿病组、生长抑素治疗组大鼠采用单次腹腔注射STZ(50 mg/kg),72 h后检测尾静脉血糖,将血糖浓度>16.7 mmol/L的大鼠

作为糖尿病模型。模型诱导成功后,生长抑素治疗组给予腹腔注射鼠生长抑素10 μg·kg⁻¹·d⁻¹^[5]。对照组、糖尿病组给予等剂量生理盐水。12周后,进行各项指标检测。

1.3 样本制备 12周后,每组取4只大鼠,水合氯醛麻醉后经心脏灌注4%多聚甲醛固定。迅速取出大鼠眼球于固定液中,4℃保存,用于免疫荧光及HE染色。每组另取4只大鼠水合氯醛深度麻醉处死,在体视解剖显微镜下剪开睑裂,将眼球完整取出。眼球置于冰袋上,剪除眼前节,去除晶体和玻璃体,可以看到半透明的视网膜在眼球壁最内层,小心将其剥除置于2.5 ml EP管中,依据重量加蛋白裂解液,冰上剪碎,4℃离心机,12 000 r/min(r=16 cm)离心25 min后取上清,-20℃保存用于Western印迹。

1.4 视网膜HE染色 将固定液中的眼球取出后用20%蔗糖溶液脱水,OCT包埋后切片,厚度为12 μm。载玻片浸于PBS洗涤3次,每次10 min;苏木素染色2 min,自来水冲洗;PBS中1 min,自来水冲洗;95%酒精1 min;伊红染色2 min,自来水冲洗;70%、80%酒精各2 min,95%、100%酒精各2次,每次5 min;二甲苯2次,PBS洗涤3次,每次20 min;中性树胶封片,显微镜观察,应用Image J软件计数RGC数量并换算成密度。

1.5 免疫荧光检测大鼠视网膜GFAP、突触素的表达 将固定液中的眼球取出后用20%蔗糖溶液脱水,OCT包埋后切片,厚度为12 μm。载玻片于PBS洗涤3次,每次5 min;5%山羊血清+0.1% Triton-100室温孵育30 min;不洗,直接滴加兔抗大鼠GFAP(1:700)、兔抗大鼠突触素(1:500),4℃过夜;PBS洗涤3次,每次5 min;滴加山羊抗兔二抗,室温避光2 h;PBS洗涤3次,每次5 min;封片后荧光显微镜观察。

1.6 Western印迹检测大鼠视网膜GFAP、突触素相对表达量 BCA法测定蛋白浓度,确定电泳时按

蛋白上样量为 30 μg 加入 15 μl 样品缓冲液; 配制 10% 聚丙酰胺分离胶及 5% 浓缩胶, 待胶凝固后加样, 开始电泳, 调整电压为 90 V, 待电泳条带成一条直线时, 调整电压为 120 V; 半干转膜后取目的条带, 1% BSA 室温封闭 2 h; 加入一抗(兔抗大鼠 GFAP, 1:10 000; 兔抗大鼠 SYN, 1:5 000), 4℃ 孵育过夜; TBST 洗涤 4 次, 每次 5 min; 加入 HRP 标记的二抗室温 2 h, 孵育后 TBST 洗涤 4 次, 每次 5 min; ECL 试剂盒显影, Image J 软件分析灰度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 实验中各组数据均进行正态性检验, 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色检测 RGC 密度 对照组 RGC 数目较多, 结构清晰。糖尿病组 RGC 结构紊乱, 数目较少。与对照组相比, 糖尿病组密度明显降低($P = 0.00$), 与糖尿病组相比, 生长抑素治疗组 RGC 密度明显增加($P = 0.00$), 见图 1(封 3), 表 1。

表 1 各组大鼠 RGC 密度及蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	RGC 密度 (mm ²)	GFAP 荧光 强度(%)	突触素荧光 强度(%)
对照组	4	529.62 ± 12.28	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
糖尿病组	4	348.78 ± 15.38 ^a	172.02 ± 5.74 ^a	61.41 ± 6.43 ^a
生长抑素治疗组	4	441.20 ± 10.57 ^b	135.36 ± 7.83 ^b	86.53 ± 1.80 ^b
F 值		187.62	226.12	159.30
P 值		0.00	0.00	0.00

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与糖尿病组相比, ^b $P < 0.01$; RGC: 视网膜神经节细胞; GFAP: 神经胶质酸性蛋白

2.2 免疫荧光检测结果 对照组 GFAP 主要微量表达于 RGC 层, 将对照组 GFAP 蛋白免疫荧光强度设定为 100%, 与对照组相比, 糖尿病组荧光强度明显升高($P = 0.00$), 与糖尿病组相比, 生长抑素治疗组荧光强度明显下降($P = 0.00$), 见表 1, 图 2(封 3)。突触素主要表达于视网膜节内丛状层及外丛状层, 将对照组突触素蛋白免疫荧光强度设定为 100%, 与对照组相比, 糖尿病组荧光强度明显下降($P = 0.00$), 与糖尿病组相比, 生长抑素治疗组荧光强度明显升高($P = 0.00$), 见表 1, 图 2(封 3)。

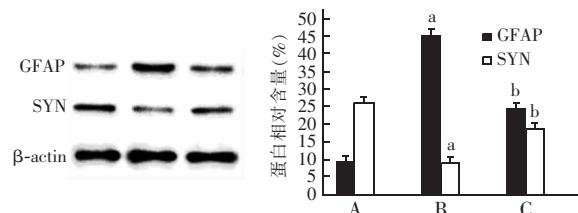
2.3 Western 印迹检测结果 与对照组相比, 糖尿病组 GFAP 表达明显增加($P < 0.01$), 与糖尿病组相比, 生长抑素治疗组 GFAP 表达明显下降

($P = 0.00$)。与对照组相比, 糖尿病组突触素表达明显下降($P = 0.00$), 而与糖尿病组相比, 生长抑素治疗组突触素明显增加($P = 0.00$), 见表 2, 图 3。

表 2 各组大鼠视网膜蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GFAP 蛋白相对表达量(%)	SYN 蛋白相对表达量(%)
对照组	4	9.46 ± 1.63	25.94 ± 1.04
糖尿病组	4	45.17 ± 1.21 ^a	8.76 ± 1.14 ^a
生长抑素治疗组	4	24.16 ± 1.41 ^b	18.40 ± 1.21 ^b
F 值		259.09	425.93
P 值		0.00	0.00

注: GFAP: 神经胶质酸性蛋白; SYN: 突触素; 与对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与糖尿病组相比, ^b $P < 0.01$



注: A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 生长抑素治疗组; GFAP: 神经胶质酸性蛋白; SYN: 突触素; 与对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与糖尿病组相比, ^b $P < 0.01$

图 3 Western 印迹检测 GFAP、SYN 蛋白相对表达量

3 讨论

本研究发现, DR 状态下, RGC 密度明显降低, 而应用生长抑素治疗后, 与糖尿病组相比, RGC 密度明显升高, 提示生长抑素对 DR 状态下受损的 RGC 具有保护作用。生长抑素是视网膜色素上皮合成的最重要的神经保护剂之一, 糖尿病时合成量大大减少。研究发现, 外用生长抑素可预防糖尿病大鼠视网膜神经退行性疾病, 且具有强大的抗血管生成作用^[6-7]。生长抑素可通过多种途径对视网膜起到神经保护作用, 包括细胞内钙信号、一氧化氮功能及与光感受器释放谷氨酸关系密切。RGC 为轴突组成的主要成分, 其损伤为 DR 的主要机制之一。最近研究发现, DR 患者 RGC 凋亡增加, 导致渐进性视网膜神经元丢失^[8]。本研究在动物体内验证了上述类似效应, 说明生长抑素对 DR 状态下受损的 RGC 具有保护作用。

Müller 细胞占视网膜胶质细胞的 90% 左右, 在视网膜贯穿全层。Müller 细胞具有支持及营养神经元的作用, 其结构和功能异常与 DR 发病关系密切^[9]。GFAP 是胶质细胞特有的标志性蛋白, 特异性表达于胶质细胞, Müller 细胞占视网膜中胶质细胞数量的 90%, 但几乎不表达 GFAP, 仅当 Müller 细胞结构和功能异常时可见 GFAP 的表达^[10]。本研究发现, 正常情况下仅在视网膜神经节细胞层中有少量的 GFAP 蛋白表达, 但 DR 状态下不仅视网膜

神经节细胞层 GFAP 的表达明显增加,而且免疫荧光观察到视网膜 GFAP 阳性染色纤维分布空间范围广泛,几乎贯穿视网膜神经组织全层,其分布范围与 Müller 细胞空间位置相同。而应用生长抑素治疗后糖尿病大鼠视网膜内 GFAP 的表达明显减少,同时伴随着 RGC 密度的增加。提示生长抑素可能通过有效抑制 DR 状态下视网膜胶质细胞活化,保护受损的 RGC。

突触素是一个完整的膜蛋白突触小泡,为突触数量标志物^[11]。其与突触发生和突触可塑性密切相关^[12-13]。突触素主要分布于视网膜内丛状层和外丛状层。DR 状态下突触素的数量明显减少,进而引起突触早期功能障碍,但具体机制不清^[14]。本研究发现 DR 状态下,视网膜突触素的表达明显降低,进而说明突触活动已受抑制,因而突触数量明显降低。应用生长抑素治疗后,GFAP 的表达下降,突触素的表达增加,RGC 密度增加。提示生长抑素可能通过抑制胶质细胞活化,增加视网膜突触数量,保护受损的 RGC。

综上所述,本研究发现生长抑素可通过抑制 DR 状态下视网膜胶质细胞活化,上调视网膜突触素的表达,恢复视网膜 RGC 密度。提示生长抑素对糖尿病视网膜病变神经损伤具有保护作用。这一发现为研究 DR 的治疗策略提供了新的方向。但因 DR 的发病机制复杂,生长抑素对 DR 的作用可能涉及众多途径,因此,生长抑素对 DR 的影响及机制仍待深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Mozetic V, Freitas CG, Riera R. Statins and fibrates for diabetic retinopathy: protocol for a systematic review [J]. JMIR Res Protoc, 2017, 6(2): e30. DOI: 10.2196/resprot.6650.
- [2] 赵红燕,李蓉.糖尿病个体化医疗的研究进展[J].国际内分泌代谢杂志,2017,37(3):174-177. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.03.008.
- [3] Altmann C, Schmidt MHH. The role of microglia in diabetic retinopathy: inflammation, microvasculature defects and neurodegeneration[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): pii: E110. DOI: 10.3390/ijms19010110.
- [4] Mazzeo A, Arroba AI, Beltramo E, et al. Somatostatin protects human retinal pericytes from inflammation mediated by microglia [J]. Exp Eye Res, 2017, 164: 46-54. DOI: 10.1016/j.exer.2017.07.011.
- [5] 孙亚东,马彦,姜艳静,等.生长抑素对糖尿病大鼠早期视网膜电图的影响[J].吉林大学学报(医学版),2014(6):1192-1196. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20140614.
- [6] Beltramo E, Lopatina T, Mazzeo A, et al. Effects of the neuroprotective drugs somatostatin and brimonidine on retinal cell models of diabetic retinopathy [J]. Acta Diabetol, 2016, 53(6): 957-964. DOI: 10.1007/s00592-016-0895-4.
- [7] Hernández C, García-Ramírez M, Corraliza L, et al. Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes [J]. Diabetes, 2013, 62(7): 2569-2578. DOI: 10.2337/db12-0926.
- [8] Ng DS, Chiang PP, Tan G, et al. Retinal ganglion cell neuronal damage in diabetes and diabetic retinopathy [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2016, 44(4): 243-250. DOI: 10.1111/ceo.12724.
- [9] Chohan A, Singh U, Kumar A, et al. Müller stem cell dependent retinal regeneration [J]. Clin Chim Acta, 2017, 464: 160-164. DOI: 10.1016/j.cca.2016.11.030.
- [10] Martinez-De Luna RI, Ku RY, Aruck AM, et al. Müller glia reactivity follows retinal injury despite the absence of the glial fibrillary acidic protein gene in Xenopus [J]. Dev Biol, 2017, 426(2): 219-235. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.03.005.
- [11] Gudi V, Gai L, Herder V, et al. Synaptophysin is a reliable marker for axonal damage [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2017, [Epub ahead of print]. DOI: 10.1093/jnen/nlw114.
- [12] D'Cruz TS, Weibley BN, Kimball SR, et al. Post-translational processing of synaptophysin in the rat retina is disrupted by diabetes [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44711. DOI: 10.1371/journal.pone.0044711.
- [13] Ilha J, Centenaro LA, Broetto Cunha N, et al. The beneficial effects of treadmill step training on activity-dependent synaptic and cellular plasticity markers after complete spinal cord injury [J]. Neurochem Res, 2011, 36(6): 1046-1055. DOI: 10.1007/s11064-011-0446-x.
- [14] Zhou L, Wang H, Luo J, et al. Regulatory effects of inhibiting the activation of glial cells on retinal synaptic plasticity [J]. Neural Regen Res, 2014, 9(4): 385-393. DOI: 10.4103/1673-5374.128240.

(收稿日期:2018-03-14)