

引文格式: 李琴, 谢婷玉, 陈雪艺, 王清, 郭乔茜, 具尔提·哈第尔. 臭氧灌肠改善糖尿病大鼠的视网膜电图表现[J]. 眼科新进展, 2014, 34 (1): 34-36. doi: 10. 13389/j. cnki. rao. 2014. 0009

【实验研究】

臭氧灌肠改善糖尿病大鼠的视网膜电图表现

李琴 谢婷玉 陈雪艺 王清 郭乔茜 具尔提·哈第尔

作者简介: 李琴, 女, 1988年5月出生, 硕士研究生在读。联系电话: 0991-4361200; E-mail: amanda_513@126.com

About LI Qin: Female, born in May, 1988. Postgraduate student. Tel: +86-991-4361200; E-mail: amanda_513@126.com

收稿日期: 2013-08-26

修回日期: 2013-10-21

本文编辑: 董建军

作者单位: 830054 新疆乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院眼科

通讯作者: 具尔提·哈第尔, E-mail: jureti_foreye@yahoo.com.cn

Received date: Aug 26, 2013

Accepted date: Oct 21, 2013

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Responsible author: JUERTI Hadier, E-mail: jureti_foreye@yahoo.com.cn

ERG features in diabetic rats after ozone coloclalysis

LI Qin, XIE Ting-Yu, CHEN Xue-Yi, WANG Qing, GUO Qiao-Qian, JUERTI Hadier

【Key words】 ozone; diabetic retinopathy; electroretinogram; rat

【Abstract】 **Objective** To investigate the electroretinogram (ERG) features in diabetic rats after ozone coloclalysis. **Methods** After experimental diabetic models were induced successfully with streptozotocin, 54 diabetic rats were averagely divided into 3 groups at random, which including ozone treatment group (group A), pure oxygen treatment group (group B) and diabetic control group (group C). Furthermore, 18 healthy rats were chosen as normal control group (group N). After 6 weeks of adapted feeding, group A was given the ozone coloclalysis, 3 times a week, and at the same time, group B was given pure oxygen, and the other two groups with no intervention. Period of treatment was one month. The ERG features including amplitudes and latencies of a-wave and b-wave were analyzed. **Results** The differences of amplitudes and latencies of a-wave and b-wave in dark and bright adaption were analyzed by one-way ANOVA. Amplitudes of a-wave and b-wave in dark adaption of group B [(10.44 ± 0.97) μV, (32.91 ± 2.61) μV], group C [(10.72 ± 1.06) μV, (33.43 ± 2.76) μV] were both lower than those of group N [(39.61 ± 1.30) μV, (99.45 ± 2.77) μV], and group A [(18.68 ± 0.92) μV, (46.86 ± 2.53) μV] decreased no obviously, there were statistical differences (all $P < 0.05$). Latencies of a-wave in dark adaption of group B [(30.10 ± 2.42) ms], group C [(30.30 ± 2.58) ms] were longer than those of group N [(13.44 ± 2.55) ms], group B (19.81 ± 2.71) ms extended no obviously, there were statistical differences (all $P < 0.05$). Latencies of b-wave in dark adaption of group A [(42.91 ± 4.72) ms]

was slightly shorter than those of group C [(54.60 ± 2.27) ms] and group B [(53.40 ± 4.97) ms], but there was no statistical difference ($P > 0.05$). In bright adaption, there was no statistical difference in the amplitudes of a-wave ($F = 0.28, P > 0.05$); Amplitude of b-wave of group B [(15.01 ± 0.87) μV], group C [(14.18 ± 0.79) μV] was lower than those of group N [(25.41 ± 1.25) μV], group A [(21.82 ± 0.78) μV] decreased no obviously, there was statistical difference ($P < 0.05$); Latencies of a-wave of group A [(15.72 ± 1.90) ms], group B [(15.40 ± 2.01) ms] and group C [(15.30 ± 1.63) ms] were all slightly extended, but there was no statistical difference for any two groups (all $P > 0.05$); Latencies of b-wave of group B [(65.20 ± 1.54) ms], group C [(65.30 ± 1.94) ms] were obviously extended than those of group N [(43.00 ± 2.82) ms], group A extended slightly [(51.63 ± 2.87) ms], there were statistical differences (all $P < 0.05$). **Conclusion** Functional damages of retinal nerve are appeared in the early stages in diabetic rats, and ozone coloclalysis may show protective effects on the nerve function in diabetic retina.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34 (1): 34-36]

【关键词】 臭氧; 糖尿病视网膜病变; 视网膜电图; 大鼠

【摘要】 **目的** 观察臭氧灌肠对糖尿病大鼠视网膜电图的影响。 **方法** 取18只正常大鼠为正常对照组(N组), 另54只以链脲佐菌素(STZ)造模成功的糖尿病大鼠分为臭氧治疗组(A组)、氧气治疗组(B组)、模型对照组(C组), 每组18只于造模成功后6周将A组大鼠行臭氧灌肠, 每周3次, 以同样频率和剂量将B组行纯氧灌肠, 其余两组不干预, 1个月应用闪光视网膜电图(F-ERG)检测视网膜功能。 **结果** 用单因素方差分析4组大鼠暗适应及明适应视网膜电图a波、b波振幅及潜伏期差异。暗适应a波及b波振幅: 与N组[a波: (39.61 ± 1.30) μV; b波: (99.45 ± 2.77) μV]相比, B组[a波: (10.44 ± 0.97) μV; b波: (32.91 ± 2.61) μV]和C组[a波: (10.72 ± 1.06) μV; b波: (33.43 ± 2.76) μV]均明显下降, 而A组[a波: (18.68 ± 0.92) μV; b波: (46.86 ± 2.53) μV]下降不明显, 差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。暗适应a波潜伏期B组为(30.10 ± 2.42) ms, C组为(30.30 ± 2.58) ms, 均较N组的(13.44 ± 2.55) ms延长, A组为(19.81 ± 2.71) ms, 较N组延长不明显, 但差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$); 暗适应b波潜伏期A组为(42.91 ± 4.72) ms, 与C组的(54.60 ± 2.27) ms和B组的(53.40 ± 4.97) ms相比较略缩短, 但其差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。明适应a波振幅各组差异无统计学意义($F = 0.28, P > 0.05$); 而明适应b

波振幅 B 组为 $(15.01 \pm 0.87) \mu\text{V}$, C 组为 $(14.18 \pm 0.79) \mu\text{V}$, 均较 N 组的 $(25.41 \pm 1.25) \mu\text{V}$ 下降, A 组为 $(21.82 \pm 0.78) \mu\text{V}$, 较 N 组下降不明显, 但差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$); a 波潜伏期 A 组为 $(15.72 \pm 1.90) \text{ms}$, 与 B 组的 $(15.40 \pm 2.01) \text{ms}$ 及 C 组的 $(15.30 \pm 1.63) \text{ms}$ 相比, 均略延长, 三组间两两比较差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$); b 波潜伏期 B 组为 $(65.20 \pm 1.54) \text{ms}$, C 组为 $(65.30 \pm 1.94) \text{ms}$, 均较 N 组的 $(43.00 \pm 2.82) \text{ms}$ 明显延长, A 组为 $(51.63 \pm 2.87) \text{ms}$, 较 N 组延长不明显, 但差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。结论 糖尿病大鼠病程早期即出现视网膜神经功能损害, 直肠灌注臭氧对大鼠视网膜功能有一定改善作用。

[眼科新进展, 2014, 34 (1): 34-36]

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病严重的并发症之一。目前我国 DR 致盲率仍呈上升趋势^[1]。DR 严重程度与糖尿病病程密切相关, 因此, 早期发现及治疗尤为重要。在早期 DR 的防治中, 除控制血糖、血压等危险因素外, 有针对性的药物治疗受到了重视。臭氧 (O_3) 是一种强氧化剂, 医用臭氧自 1935 年首次应用于临床以来, 越来越广泛地运用于多种疾病的预防及治疗, 并得到认可^[2]。目前尚没有其对 DR 的研究报道, 因此本研究通过建立大鼠 DR 模型, 观察臭氧治疗对早期 DR 视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 的影响, 探讨 O_3 对早期 DR 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠 (清洁级) 72 只, 体质量 300 g 左右, 由新疆医科大学实验动物中心提供。严格按照 ARVO 关于实验动物使用的规定进行实验。

1.1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司); SumStep 血糖仪 (美国强生公司); HealOzone 臭氧发生仪 (德国卡瓦公司); 罗兰电生理系统 (高视远望公司)。

1.2 方法

1.2.1 STZ 制造大鼠糖尿病模型 72 只大鼠适应性喂养 1 个月, 随机数字表法抽取 54 只大鼠以自制高脂高糖饲料喂养, 每周测体质量, 监测血糖。6 周后禁食不禁水 12 h, 以 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 新鲜配置 STZ (以 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.3 ~ 4.5 的柠檬酸盐缓冲液稀释) 快速一次性左下腹腔注射建立大鼠糖尿病模型, 给药后 24 h 及 1 周时分别断尾取血测血糖, 两次血糖均 $> 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者视为糖尿病模型造模成功 (共得到糖尿病大鼠 54 只), 为提高动物模型的稳定性, 成模后大鼠再高脂高糖饲料喂养 4 周, 后改为普通饲料喂养并将这些大鼠随机分为臭氧治疗组 (A 组)、氧气治疗组 (B 组)、模型对照组 (C 组) 各 18 只, 正常对照组 (N 组) 大鼠给予持续普通饲料喂养。

1.2.2 O_3 与 O_2 混合气制备与干预 以 O_3 发生仪制备医用 O_3 (O_3 与 O_2 的混合气), 设定 O_3 浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 A 组大鼠进行医用 O_3 直肠灌注, 每周 3 次, 灌注剂量以 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 计算^[3-4], B 组大鼠以同样频率及浓度进行纯 O_2 直肠灌注, 以 1 个月为 1 疗程, C 组及 N 组大鼠不给予任何干预。

1.2.3 O_3 灌肠方法 大鼠排空直肠后, 1 mL 注射器 (管径与大鼠直肠相仿) 插入大鼠直肠深度约 4 cm 缓慢灌入, 按压肛门 5 min, 防止气体泄出。氧气灌肠方法同 O_3 灌肠, 气体体积换算至与 O_3 等量。

1.2.4 ERG 检测方法

1.2.4.1 检测步骤 大鼠麻醉后, 以自制包布包裹大鼠身体进行保暖; 暗适应 60 min 后, 复方托吡卡胺滴眼液 (美多丽滴眼液) 滴被检眼充分散瞳; 于被检眼同侧颊囊皮下置参考电极, 尾部皮下置针状接地电极, 大鼠眼表面滴卡波姆眼用凝胶保护角膜, 将金丝环形电极安置于被检眼角膜上, 保持电极持续稳定接触角膜, 各电极阻抗控制在 10Ω 以内 (弱红光下安置电极, 由同一人操作以减小操作引起的误差); 以 RETI-port 系统行 ERG 检测。

1.2.4.2 设备参数 F-ERG 为白色闪光刺激, 闪光强度为 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, 闪光间隔为 15 s。通频带 0.1 ~ 500.0 Hz, 扫描时间 250 ms, 叠加次数 4 次。闪光强度 $2.398 \text{ cd} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, 闪光间隔为 15 s, 通频带 100 ~ 500 Hz, 扫描时间 250 ms, 叠加次数 8 次。

1.2.4.3 测量指标 测量 F-ERG 暗适应 a、b 波峰值潜伏期及振幅, 明适应 a、b 波峰值潜伏期及振幅。a 波峰值潜伏期为刺激开始到 a 波波谷的时间, 振幅为基线到波谷的电位值; b 波峰值潜伏期为刺激开始到 b 波波峰的时间, 振幅为 a 波波谷到 b 波波峰的电位值。

1.2.5 统计学方法 对 4 组 ERG a 波、b 波潜伏期和振幅的比较在统计学软件 SPSS17.0 下进行计量资料方差分析及多组均数间两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠暗适应 ERG a 波及 b 波的振幅及潜伏期 四组间 a 波、b 波的振幅比较及 a 波、b 波潜伏期比较见表 1, B 组、C 组较 N 组 a 波、b 波的振幅均下降, A 组 a 波、b 波的振幅下降不明显, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$), 而 B 组与 C 组比较振幅无明显改变, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); b 波潜伏期 A 组与 B 组及 C 组比较略缩短, 但其差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$), B 组、C 组较 N 组 a 波潜伏期均延长, A 组 a 波潜伏期延长不明显, 但差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠明适应 ERG a 波及 b 波的振幅及潜伏期 四组间 a 波及 b 波的振幅比较及 a 波潜伏期

比较见表2,四组间a波振幅差异无统计学意义($P>0.05$);B组及C组较N组b波振幅均明显下降,A组下降不明显,且明显高于B组,差异有统计学意义($P<0.05$),而B组与C组差异无统计学意义($P>0.05$);A组、B组及C组a波潜伏期均略延长,三组间两两比较差异无统计学意义($P>0.05$);B组、C组较N组b波潜伏期明显延长,A组潜伏期延长不明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表1 各组闪光视网膜电图暗适应时a波及b波的振幅及潜伏期比较

Table 1 Comparison of amplitudes and latencies of a-wave and b-wave in dark adaption of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Amplitudes (μV)		Latencies (t/ms)	
	a-wave	b-wave	a-wave	b-wave
N	39.61 \pm 1.30	99.45 \pm 2.77	13.44 \pm 2.55	41.78 \pm 1.99
A	18.68 \pm 0.92	46.86 \pm 2.53	19.81 \pm 2.71	42.91 \pm 4.72
B	10.44 \pm 0.97	32.91 \pm 2.61	30.10 \pm 2.42	53.40 \pm 4.97
C	10.72 \pm 1.06	33.43 \pm 2.76	30.30 \pm 2.58	54.60 \pm 2.27
F	1543.43	1548.69	98.31	31.17
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表2 各组闪光视网膜电图明适应时a波及b波的振幅及潜伏期比较

Table 2 Comparison of amplitudes and latencies of a-wave and b-wave in bright adaption of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Amplitudes (μV)		Latencies (t/ms)	
	a-wave	b-wave	a-wave	b-wave
N	16.17 \pm 1.37	25.41 \pm 1.25	12.77 \pm 1.71	43.00 \pm 2.82
A	15.79 \pm 1.45	21.82 \pm 0.78	15.72 \pm 1.90	51.63 \pm 2.87
B	16.28 \pm 1.31	15.01 \pm 0.87	15.40 \pm 2.01	65.20 \pm 1.54
C	15.86 \pm 1.44	14.18 \pm 0.79	15.30 \pm 1.63	65.30 \pm 1.94
F	0.28	327.02	5.20	203.62
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

DR通常被认为是一种以视网膜微血管发生病理变化所致的疾病,但近年来的很多研究都支持糖尿病早期就发生了视神经损害这一观点^[5-6]。DR的发展主要是视网膜缺血缺氧导致神经胶质细胞损伤,使正常的视网膜结构遭到破坏,继而发生视网膜血管出血、增生性玻璃体视网膜病变等一系列不可逆转的致盲性改变。ERG的a波起源于视网膜感光细胞层,是一种超极化动作电位,反映感光细胞的生物电活动;ERG的b波起源于视网膜双极细胞,其变化反映视网膜内核层细胞(主要是双极细胞)的电活动,在视网膜功能的诊断中是一个灵敏度及可靠度较高的客观指标^[7-8]。本次实验中,糖尿病大鼠造模成功后6周暗适应ERG a波、b波潜伏期较对照组明显延长,振幅明显下降,说明在糖尿病早期,视网膜神经元和(或)神经胶质细胞的功能已发生改变,这与近年来关于糖尿病早期就存在视神经损害的研

究结果相一致^[8]。ERG暗适应O₃治疗组较对照组振幅降低,潜伏期延长,但与氧气治疗组及模型对照组相比,其振幅降低及潜伏期延长的幅度均不明显,这说明O₃灌肠治疗后能够改善DR引起的ERG a波、b波振幅下降及潜伏期延长。明适应ERG b波振幅及潜伏期O₃治疗组亦有向正常对照组靠拢的趋势,说明O₃灌肠治疗后能够改善DR引起明适应ERG b波振幅下降及潜伏期延长,而对a波的影响不明显。以上均体现了O₃治疗能够改善DR大鼠的视网膜功能。O₃作用于机体时能够增加红细胞糖酵解速率,从而导致2,3-二磷酸甘油酸增多,促进氧的合成,进而使释放入组织的氧增加;还能够通过增强丙酮酸的氧化羧化作用来激活克雷布斯循环,刺激产生ATP;它还导致NADH显著减少并且有助于氧化细胞色素c,并刺激一系列作为自由基的清道夫的酶类,这些酶类可降解自由基;此外,O₃还能够使前列腺素生成增多^[9-11],扩张血管,改善循环。O₃治疗可能通过以上机制的综合作用改善血液流变学,使组织携氧能力增强,从而降低了视网膜组织病理改变的程度,继而改善了以ERG为代表的视网膜功能。

本研究结果显示,O₃可能对DR大鼠具有一定视神经保护作用,但O₃对糖尿病大鼠视网膜神经功能保护作用的具体机制,以及O₃治疗以何种给药方式、给药浓度进行治疗能够达到最优的效果等还需进一步研究。

参考文献

- 1 刘巨平,李筱荣.糖尿病视网膜病变的流行病学研究[J].医学综述,2006,12(20):102-103.
- 2 Elvis AM,Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review[J]. *Nat Sci Biol Med*,2011,2(1):66-70.
- 3 崔玉国.高压臭氧治疗高脂血症的临床研究[J].中国当代医药,2009,16(10):40-41.
- 4 Calunga JL,Zamora ZB,Borrego A,Río Sd,Barber E,Menéndez S,et al. Ozone therapy on rats submitted to subtotal nephrectomy: role of antioxidant system[J]. *Mediators Inflamm*,2005,8(4):221-227.
- 5 Gavrilova NA,Lanevskaia NI,Antiferova NG. A marker of early stage of diabetic retinopathy[J]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*,2002,11(6):705-709.
- 6 Fernyhough P,Huang TJ,Verkhratsky A. Mechanism of mitochondrial dysfunction in diabetic sensory neuropathy[J]. *Peripher Nerv Syst*,2003,8(4):227-235.
- 7 Kizskielis M,Lubiński W,Penkala K. The photopic negative response as a promising diagnostic tool in glaucoma. A review[J]. *Klin Oczna*,2012,114(2):138-142.
- 8 Vincent A,Robson AG,Holder GE. Pathognomonic (diagnostic) ERGs. A review and update[J]. *Retina*,2013,33(1):5-12.
- 9 邓周录,李强.臭氧的临床应用[J].中国综合临床,2008,24(2):188-190.
- 10 Bocci V,Zanardi I,Travagli V. Ozone: a new therapeutic agent in vascular diseases[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*,2011,11(2):73-82.
- 11 Kuz'mina VYu,Khokhlov IuK,Savin AA. The effect of ozone therapy on the activity of the autonomic nervous system[J]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*,2012,112(10):18-23.