

引文格式:江新利,苗慧鹏,周忠友,赵平,刘岩.玻璃体内注射色素上皮源性因子对大鼠早期糖尿病视网膜病变的保护作用[J].眼科新进展,2016,36(3):210-215. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0057

【实验研究】

玻璃体内注射色素上皮源性因子对大鼠早期糖尿病视网膜病变的保护作用[△]

江新利 苗慧鹏 周忠友 赵平 刘岩

作者简介:江新利,男,1975年9月出生,河北宁晋人,硕士,主治医师。联系电话:15533110653; E-mail: jxldr@outlook.com

About JIANG Xin-Li: Male, born in September, 1975. Master degree. Tel: 15533110653; E-mail: jxldr@outlook.com

收稿日期:2015-08-15

修回日期:2016-01-19

本文编辑:董建军

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81100607);河北省自然科学基金资助(编号:2012206069);河北省卫生计生厅课题(编号:20100099、20100356)

作者单位:050051 河北省石家庄市,河北医科大学第三医院眼科(江新利,苗慧鹏,周忠友,赵平);050051 河北省石家庄市,河北医科大学第三医院内分泌科(刘岩)

通讯作者:刘岩, E-mail: liuyan-jiangcn@hotmail.com

Received date: Aug 15, 2015

Accepted date: Jan 19, 2016

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81100607); Hebei Province Natural Science Foundation (No: 2012206069); Scientific Foundation of Department of Public Health of Hebei Province (No: 20100099, 20100356)

From the Department of Ophthalmology, the Third Hospital of Hebei Medical University (JIANG Xin-Li, MIAO Hui-Peng, ZHOU Zhong-You, ZHAO Ping), Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China; Department of Endocrinology, the Third Hospital of Hebei Medical University (LIU Yan), Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Responsible author: LIU Yan, E-mail: liuyanjiangcn@hotmail.com

Protective effects of intravitreal injection of PEDF on early stage of diabetic retinopathy

JIANG Xin-Li, MIAO Hui-Peng, ZHOU Zhong-You, ZHAO Ping, LIU Yan

[Key words] diabetic retinopathy; pigment epithelium-derived factor; vascular endothelial growth factor; intercellular cell adhesion molecule-1; monocyte chemotactic protein-1; zonula occludens-1; protein kinase B

[Abstract] Objective To observe the effects of intravitreal injection of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on the expression of PEDF, vascular endothelial growth factor (VEGF), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), zonula occludens-1 (ZO-1) and protein kinase B (PKB, also Akt) in the retina of diabetic rats, and discuss the protective effects of PEDF on early stage of diabetic retinopathy. **Methods** 6-8 weeks old male SD rats (n=60) were randomly divided into four groups: normal control group (CON group), diabetic group (DM group), diabetic group with NS injection (DM + NS group) and diabetic group with PEDF injection (DM + PEDF group). Diabetes model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). The intravitreal injection of PEDF was performed at 1 week, 2 weeks, 3 weeks after the DM models was established. Eyeballs were collected after rats were sacrificed at 4 weeks of DM. The expression of PEDF, VEGF, ICAM-1, MCP-1, ZO-1 and Akt in rat retina were assessed by immunohistochemistry, and the ultrastructure of retina was studied by transmission electron microscopy. **Results** Diabetic rats were successfully induced. 4 weeks duration of diabetes still could not result in a significant retinal neovascularization. Under transmission electron microscopy, compared with CON rats, retinal ganglion cells edema, swollen and damaged mitochondrial were all found in both DM and DM + NS rats, and these pathological ultrastructural alterations could be partly ameliorated by PEDF injection. In the present study, PEDF was mainly expressed in nerve fiber layer, retinal ganglion cells, inner plexiform layer, photoreceptor matrix and retinal pigment epithelium. While VEGF was mainly expressed in retinal ganglion cell layer. ICAM-1 was found expressed in photoreceptor layer. MCP-1 was expressed in the inner retinal cells, including ganglion cells and inner nuclear layer. ZO-1 was mainly found expressed in inner nuclear layer cells and ganglion cells. Akt was expressed in cells of inner plexiform layer and choroid. Compared with CON group, the expression of PEDF and VEGF was not statistically significant ($P > 0.05$), while the expression of ICAM-1 and MCP-1 were statistically increased, but the expression of ZO-1 and Akt were statistically reduced in both DM and DM + NS group (all $P < 0.05$). Compared with those of DM and DM + NS groups, the expression of retina PEDF and VEGF showed no alteration (all $P > 0.05$), while ICAM-1, MCP-1 were significantly reduced, but ZO-1 and Akt were significantly increased in DM + PEDF rats (all $P < 0.05$). **Conclusion** PEDF can prevent retinal ganglion cell damage and vascular hyperpermeability in early diabetic retinopathy by decreasing ICAM-1 and MCP-1 and increasing ZO-1 and Akt expression. PEDF may prevent the progression of early diabetic retinopathy.

【关键词】 糖尿病视网膜病变;色素上皮源性因子;血管内皮生长因子;细胞间黏附分子-1;单核细胞趋化蛋白-1;紧密连接蛋白-1;蛋白激酶B

【摘要】 目的 观察玻璃体内注射色素上皮源性因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)对SD糖尿病大鼠视网膜PEDF、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、炎性相关因子细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)以及细胞通透性相关因子紧密连接蛋白-1(zonu-

la occludens-1,ZO-1)和蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB,又称 Akt)表达的影响,探讨 PEDF 对早期糖尿病视网膜病变的保护作用。**方法** 选取 6~8 周龄 SD 大鼠 60 只,随机分为 4 组:正常对照组(CON 组)、糖尿病组(DM 组)、糖尿病生理盐水注射组(DM+NS 组)和糖尿病 PEDF 注射组(DM+PEDF 组)。链脲佐菌素诱导建立糖尿病模型后第 1 周、2 周、3 周时,DM+PEDF 组大鼠玻璃体内注射 PEDF,而 DM+NS 组注射同样体积的生理盐水。第 4 周时处死大鼠,摘出眼球,进行视网膜组织病理学及电镜观察。并采用免疫组织化学方法检测视网膜 PEDF、VEGF、ICAM-1、MCP-1 以及 ZO-1、Akt 的表达情况。**结果** 糖尿病大鼠均造模成功。4 周糖尿病病程尚不能导致明显的视网膜新生血管形成。在透射电镜下,DM 组大鼠视网膜可见神经节细胞水肿,线粒体肿胀变大,基质肿胀明显,可见大部分或全部的嵴消失,部分双侧膜融合,粗面内质网扩张,而玻璃体内 PEDF 注射可以明显地改善这一病理改变。DM 组大鼠 PEDF 主要表达于视网膜神经纤维层、神经节细胞层以及内丛状层、光感受器基质以及色素上皮层、脉络膜等部位;VEGF 主要表达于神经节细胞层,ICAM-1 主要表达在光感受器层,MCP-1 主要表达在视网膜内层细胞,包括节细胞层和内核层,ZO-1 蛋白主要表达于内核层的细胞以及神经节细胞,Akt 主要表达于内丛状层以及脉络膜的细胞浆中。同 CON 组相比,DM 组、DM+NS 组视网膜中 PEDF、VEGF 表达差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$),而 ICAM-1、MCP-1 表达增加,ZO-1、Akt 表达减少,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。DM+PEDF 组大鼠视网膜中 PEDF、VEGF 的表达较 DM 组和 DM+NS 组差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$),但 ICAM-1、MCP-1 表达减少,ZO-1、Akt 表达增多,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。**结论** PEDF 可以明显地改善糖尿病视网膜病变早期视网膜神经节细胞的损害,通过减少炎症因子和增加细胞连接蛋白而减轻血-视网膜屏障的破坏,从而对早期糖尿病视网膜病变起一定的防治作用。

新生血管的形成是增殖性糖尿病视网膜病变的主要病理改变。新生血管膜收缩造成牵拉视网膜脱离是糖尿病视网膜病变患者致盲的主要原因。寻找安全有效的抗新生血管药物一直是糖尿病视网膜病变研究和临床工作的重要课题。

色素上皮源性因子(pigment epithelium-derived factor,PEDF)属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超基因家族,是目前发现的最强大的抑制血管再生的因子,具有很强的新生血管抑制作用,还是一种细胞外神经营养因子,对神经组织的发育和分化发挥重要作用^[1]。动物实验发现,全身及玻璃体内注射 PEDF 可明显抑制高浓度氧或缺血诱导的视网膜新生血管形成,抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)诱导的血管内皮细胞增殖与迁移^[2]。研究表明 PEDF 可以抑制增殖性糖尿病视网膜病变新生血管的形成。但有关早期糖尿病视网膜病变的研究尚少。本研究通过在玻璃体内注射 PEDF,观察糖尿病大鼠视网膜 PEDF、VEGF、炎症相关因子细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1,ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1,MCP-1)以及细胞通透性相关因子紧密连接蛋白-1(zonula occludens-1,ZO-1)和蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB,又称 Akt)的表达,探讨 PEDF 对早期糖尿病视网膜病变的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 取 60 只雄性 6~8 周龄清洁级健康 SD(Sprague Dawley)大鼠(购自河北医科大学动物实验中心,体质量 200~220 g)。眼部经裂隙灯和检眼镜检查屈光间质清晰,眼底无病变。随机分为正常对照组(CON 组)、糖尿病组(DM 组)、糖尿病生理盐水注射组(DM+NS 组)、糖尿病 PEDF 注射组(DM+PEDF 组),每组 15 只。各组间大鼠体质量、血糖无显著差异。实验期间各组喂养饲料相同。实验遵循国家实验动物管理条例。

1.1.2 试剂和仪器 链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ,美国 Sigma 公司);PEDF(美国 Upstate 公司);PEDF 抗体、ZO-1 抗体、MCP-1 抗体(武汉博士德生物工程有限公司);VEGF 抗体、ICAM-1 抗体、Akt 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);血糖仪(美国 Roche 公司);显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病动物模型建立 SD 大鼠适应性喂养 5 d 后,制作 1 型糖尿病模型,大鼠禁食 12 h 后腹腔内注射链脲佐菌素($65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。48 h 后尾静脉取血测血糖,血糖大于 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诊断为糖尿病。

1.2.2 PEDF 玻璃体内注射 糖尿病模型建立 1 周后,DM+PEDF 组大鼠在显微镜下进行双眼 PEDF 玻璃体内注射。操作方法如下:大鼠经氯胺酮($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔内注射麻醉后,俯卧位固定四肢,眼局部用爱尔卡因滴眼液表面麻醉。用微量注射器自角膜缘外 2 mm 处与眼球表面呈约 45° 进针,避免损伤晶状体,缓慢注射 PEDF($2 \mu\text{g}/8 \mu\text{L}$),注射完后停留 3~4 s 以防止注射液外漏,注射完成后用妥布霉素滴眼液滴眼以预防感染。DM+NS 组大鼠注射同样体积的生理盐水。每周注射 1 次,连续 3 周。CON 组和 DM 组大鼠不予任何处理。

1.2.3 数据以及标本收集 各组大鼠在实验期间每周监测血糖、体质量变化以及生命状态变化。在第 3 次眼内注射 PEDF 1 周后予以过量水合氯醛麻醉,轻压眼眶,使眼球脱出,摘出眼球,分别置于 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛或体积分数 30% 戊二醛中,用于免疫组织化学以及电镜观察。

1.2.4 电镜检查 每组取 6 只眼球用于透射电镜观察。处死大鼠摘出眼球,体积分数 30% 戊二醛固定 10 min,剖开眼球,剥离视网膜,体积分数 30% 戊二醛固定 24 h,四氧化锇固定 1 h,电镜标本常规程序脱水,EPON 包埋,半薄片片定位,超薄切片厚约 70 nm,醋酸双氧铀和硝酸铅对比染色,透射电镜观察神经节细胞的形态和超微结构变化。

1.2.5 组织学研究 眼球标本梯度脱水包埋,石蜡切片,厚 5 μm ,常规脱蜡至水,分别进行 HE 染色常规形态学研究以及免疫组织化学染色。(1)HE 染色:每个眼球随机选取 5 张切片,每张切片随即选取 10 个高倍视野,观察每只眼球标本中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数。(2)免疫组织化学染色:石蜡切片常规脱蜡入水,孵育 5 ~ 10 min,抗原修复,室温孵育 10 min;PEDF 抗体、ZO-1 抗体、MCP-1 抗体、VEGF 抗体、ICAM-1 抗体、Akt 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,二抗室温孵育 30 min。DAB 显色。PBS 清洗,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片,光镜观察。

有棕黄色颗粒染色细胞即为阳性细胞。每个标本选取 5 张切片,每个切片随机取 5 个高倍视野输入计算机,经软件 Image-Pro Plus 6.0 在同一光线强度和相同放大倍数下检测每个视野阳性细胞染色的平均光密度值(OD)以表示抗原的表达量。最后对每组切片进行统计。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 17.0 软件统计数据,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用方差分析组间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖与眼部检查 制作糖尿病大鼠模型前,各组大鼠的体质量和血糖差异均无统计学意义。造模后 CON 组、DM 组、DM + NS 组和 DM + PEDF 组的空腹血糖水平分别为(7.04 \pm 0.95) mmol \cdot L $^{-1}$ 、(24.26 \pm 6.25) mmol \cdot L $^{-1}$ 、(23.55 \pm 5.65) mmol \cdot L $^{-1}$ 、(24.73 \pm 7.45) mmol \cdot L $^{-1}$ 。糖尿病大鼠均造模成功。各组大鼠裂隙灯显微镜和眼底镜检查结果显示:大鼠的晶状体和玻璃体透明无混浊,眼底清晰,视盘边界清楚,视网膜无出血、渗出等病理改变。

2.2 视网膜 HE 染色 CON 组大鼠视网膜结构清晰,各层细胞排列整齐,细胞结构完整(图 1)。DM 组、DM + NS 组以及 DM + PEDF 组大鼠视网膜结构均未见明显异常。

图 1 正常大鼠视网膜的结构完整、分层清晰($\times 400$)

正常情况下,视网膜血管位于内界膜下。若视网膜血管进入内界膜或出现在视网膜表面,甚至进入玻璃体,或向下生长,进入视网膜下,则称之为视网膜新生血管。在本实验中,CON 组偶可见到突破内界膜的血管内皮细胞细胞核,每眼球(0.71 \pm 0.18)个,而 DM 组、DM + NS 组、DM + PEDF 组中突破内界膜的血管内皮细胞细胞核分别为(0.81 \pm 0.33)个、(0.79 \pm 0.10)个以及(0.75 \pm 0.18)个,同 CON 组相比差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。以上数据表明,在本实验中 4 周糖尿病病程尚不能导致明显的新生血管增生。

2.3 视网膜电镜检查 CON 组:神经节细胞层细胞内细胞核大,椭圆形,粗面内质网结构清晰,有个别线粒体嵴消失(可能与操作时间长,细胞自溶有关)(图 2A)。DM 组:神经节细胞水肿,线粒体肿胀变大,基质肿胀明显,可见大部分或全部的嵴消失,部分双侧膜融合。粗面内质网扩张,膜旁核糖体融合或脱颗粒明显,游离核糖体减少,部分核周隙扩张(图 2B)。DM + NS 组:细胞质水肿,粗面内质网扩张,脱颗粒明显(图 2C)。DM + PEDF 组:神经节细胞轻度水肿,部分线粒体嵴消失,粗面内质网轻度水肿,但较 DM 组以及 DM + NS 组明显减轻(图 2D)。

图 2 视网膜神经节细胞超微结构($\times 20\,000$)。A:CON 组;B:DM 组;C:DM + NS 组;D:DM + PEDF 组

2.4 免疫组织化学检测结果 DM 组大鼠 PEDF 主要表达于视网膜神经纤维层、神经节细胞层、内丛状层、光感受器基质以及色素上皮层、脉络膜等部位;VEGF 主要表达于神经节细胞层,ICAM-1 主要表达

在光感受器层,MCP-1 主要表达在视网膜内层细胞,包括节细胞层和内核层,ZO-1 蛋白主要表达于内核层的细胞以及神经节细胞,Akt 主要表达于内丛状层以及脉络膜的细胞浆中(图 3)。同 CON 组相比,DM

组、DM + NS 组视网膜中 PEDF、VEGF 表达差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),而 ICAM-1、MCP-1 表达增加,ZO-1、Akt 表达减少,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。DM + PEDF 组大鼠视网膜中

PEDF、VEGF 的表达较 DM 组和 DM + NS 组差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),但 ICAM-1、MCP-1 表达减少,ZO-1、Akt 表达增多,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$,见图 4)。

图3 PEDF、VEGF、ICAM-1、MCP-1、ZO-1、Akt 在 DM 组大鼠视网膜组织中的表达

图4 PEDF、VEGF、ICAM-1、MCP-1、ZO-1、Akt 在各组大鼠视网膜组织中的表达。与 CON 组比较,* $P < 0.05$;与 DM + PEDF 组比较,# $P < 0.05$

3 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病微血管的一种病变,严重时可导致失明,是目前发达国家工作年龄人群致盲的首要原因。糖尿病视网膜病变的发病机理目前尚无定论,多种细胞因子在此过程中发挥着重要的作用。在新生血管生成和抑制因子中,VEGF 和

PEDF 被研究的最多。有研究发现^[3],大鼠视网膜 VEGF 阳性表达颗粒主要位于神经节细胞层、内核层及内层光感受器基质,亦表达于视网膜毛细血管。VEGF 可以提高血管通透性,促进内皮细胞的迁移、增生和血管形成,改变细胞外基质,上调 ICAM-1 的基因表达^[4]。此外,VEGF 可诱导紧密联接蛋白 ZO-1 的快速磷酸化,从而导致血管的通透性增加。

因此,有效地抑制 VEGF,或其下游相关的因子,是目前研究早期防治糖尿病视网膜病变的焦点。

VEGF 与 PEDF 的平衡对于维持视网膜血管通透性与新生血管的形成具有重要作用,糖尿病时视网膜内皮细胞表达 VEGF 与 PEDF 失调,PEDF 表达减少而 VEGF 的表达增加。调节二者的平衡状态是治疗糖尿病视网膜病变的关键。

PEDF 是目前发现的最有效的眼内新生血管抑制因子,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂基因家族,在 1989 年由 TOMBRAN-TINK 等^[5]从培养的胎儿视网膜色素上皮细胞培养基中分离获得。研究发现,PEDF 主要由视网膜色素上皮细胞产生,在视网膜内核层、神经节细胞层、脉络膜、睫状体、角膜上皮细胞和内皮细胞等均有表达。研究发现,它不仅能预防新生血管形成,消退已形成的新生血管,还具有神经营养、神经保护作用。因此它在血管增生性疾病、视网膜脉络膜退行性疾病的治疗中具有重要的作用。值得注意的是,PEDF 抑制视网膜新生血管的作用具有一定的特异性以及剂量依赖性。早在 2001 年 STELLMACH 等^[6]人就发现,PEDF 可以促进正在形成的血管内皮细胞凋亡,且不影响正常血管。而 APTE 等^[7]人发现,PEDF 对于新生血管的作用与其剂量有关,在体内低剂量 PEDF ($0.5 \sim 5.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以抑制内皮细胞迁移及新生血管形成,而高剂量 PEDF ($2.5 \sim 50.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 则可以刺激内皮细胞迁移及新生血管的形成和 VEGF 的产生。故 PEDF 的抗血管增生作用是在相对低浓度时实现的。

在对动物的研究中,PEDF 可以通过全身以及局部来给药。全身给药需要的剂量较大,有可能干扰全身血管的状态,且到达眼球局部的药物浓度不能保证。眼部位置表浅,局部注射有一定的优势。我们采用玻璃体内注射,可以避免全身并发症的同时很好地维持眼内的药物浓度。实验结束后大鼠玻璃体透明,眼底清晰,表明该种局部用药方法有效。

在本研究中,实验结束后 CON 组与 DM 组、DM + NS 组及 DM + PEDF 组大鼠均未见明显的糖尿病眼底改变,视网膜 HE 染色也未见突破内界膜层的内皮细胞核数目在各组间存在差异,表明糖尿病 4 周的病程尚不能引起视网膜大体形态学改变,未发现明显的视网膜新生血管形成。

本研究发现,相对于正常同龄对照组大鼠,糖尿病病程并不能改变视网膜 PEDF 以及 VEGF 在蛋白水平的表达,这与一些早期的研究相符,即正常大鼠视网膜无或仅微量表达 VEGF,当病程发展到一定阶段后,VEGF 才显著表达^[8]。同时本研究发现,同 DM 组大鼠相比,玻璃体内注射似乎不能导致视网膜 PEDF 的表达增加以及 VEGF 的表达减少。可能在早期糖尿病视网膜病变时,玻璃体内注射 PEDF 不是通过直接改变视网膜 PEDF 以及 VEGF 的蛋白水平实现对糖尿病视网膜病变的保护作用。

在糖尿病视网膜病变的早期,血-视网膜屏障的破坏及血管通透性的增高是其主要的病理基础。目前的研究观点认为,血-视网膜屏障的破坏与白细胞的异常黏附、浸润有密切关系,而在此过程中,介导炎症细胞趋化、聚集则是由 MCP-1 和 ICAM-1 蛋白完成的。ICAM-1 是免疫球蛋白超家族中的成员,主要表达于炎症和免疫反应部位的活化淋巴细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、各种上皮细胞及成纤维细胞等表面。MIYAMOTO 等^[9]人发现,玻璃体内注射 VEGF,可以导致视网膜组织中异常的白细胞聚集、浸润,毛细血管的通透性增加,这与视网膜中表达 ICAM-1 增加有关,抑制 ICAM-1 可以极大地减少 VEGF 这一效应。MCP-1 的主要作用为激活和趋化单核/巨噬细胞,在视网膜缺血等病变过程中表达明显增加^[10],在视网膜炎症反应中也发挥着重要的作用。本实验中,相对于 CON 组大鼠,DM 组大鼠视网膜 ICAM-1 以及 MCP-1 的表达明显增加,表明 ICAM-1 以及 MCP-1 可能参与了早期糖尿病视网膜病变的发生,导致毛细血管通透性增加。玻璃体内注射 PEDF 可以明显地降低这些因子在蛋白水平的表达,这同以往的研究相符,即 PEDF 具有一定的抗炎作用。JIN 等^[11]人发现,PEDF 在体内以及体外都可以抑制炎症相关因子如 ICAM-1 以及 MCP-1 表达,表明 PEDF 对早期糖尿病视网膜病变的保护作用在某种程度上是通过抑制炎症因子表达实现的。

ZO-1 是多域蛋白家族膜结合鸟苷酸激酶同系物中的一员,在包括肾、胎盘、血脑屏障等许多组织中表达,可与紧密连接上的很多跨膜蛋白相互作用^[12]。ZO-1 的改变与细胞通透性的增加有关。SHEIKPRANBABU 等^[13]人在研究中发现,PEDF 可以通过增加 ZO-1 的表达抑制糖基化修饰的牛血清白蛋白诱导的内皮细胞通透性,而这一过程是通过 PI3K/Akt 信号途径实现的。在本研究中,视网膜 ZO-1 在 DM 组以及 DM + NS 组表达明显减少,而 PEDF 玻璃体内注射可以明显增加 ZO-1 的表达,表明糖尿病早期,在视网膜出现形态学改变之前,已经存在视网膜内皮细胞通透性增加。因此玻璃体内注射 PEDF 可能通过增加 ZO-1 的表达改善视网膜内皮细胞通透性。

Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞存活和凋亡中起重要作用。Akt 表达的增加往往有助于细胞在一些病理情况下存活^[14-15]。目前研究发现,PI3K/Akt 参与了细胞通透性和紧密连接的调节。在对小肠内皮细胞的研究中发现,其通透性的增加往往伴随着 ZO-1 以及 Akt 的表达减少^[16]。在本实验中,糖尿病大鼠的视网膜中 Akt 的表达量明显减少,这与该时期 ZO-1 表达减少相符。PEDF 玻璃体内注射能明显增加视网膜 Akt 的表达。

神经细胞的功能紊乱也是糖尿病视网膜病变的早期表现。糖尿病视网膜在发生任何可见的形态学

异常之前,视网膜电图、对比敏感度等已发生改变,表现为振荡电位的潜伏期延长、振幅降低,对比敏感度降低等,说明视网膜病变时发生了神经退行性改变。PEDF 是一种细胞外神经营养和保护因子,对神经组织的发育、分化及功能维持有重要作用。我们的实验表明糖尿病视网膜病变的早期,视网膜神经节细胞的超微结构已经发生了明显的改变,玻璃体内注射 PEDF 可以降低糖尿病时视网膜神经节细胞的损伤程度。因此,PEDF 对视网膜神经节细胞具有一定的保护作用。

综上所述,糖尿病视网膜病变的早期,尽管尚未出现明显的视网膜新生血管增生,但视网膜神经节细胞的超微结构已经发生了明显的改变,同时伴随着炎症因子表达的增多以及细胞通透性相关因子表达的减少。PEDF 可以明显地改善糖尿病时视网膜神经节细胞的损害,减少炎症相关因子的表达,增加细胞的紧密连接,从而减少糖尿病对视网膜的损伤。由此,可以很大程度上改善早期的糖尿病视网膜病变。

参考文献

- [1] 江新利,赵平,刘岩. PEDF 在眼部疾病中的研究进展[J]. 眼科新进展,2013,33(5):485-488,496.
- [2] DUH EJ, YANG HS, SUZUMA I, MIYAGI M, YOUNGMAN E, MORI K, *et al.* Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002,43(3):821-829.
- [3] MURATA T, NAKAGAWA K, KHALIL A, ISHIBASHI T, INOMATA H, SUEISHI K. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas[J]. *Lab Invest*, 1996,74(4):819-825.
- [4] PENN JS, MADAN A, CALDWELL RB, BARTOLI M, CALDWELL RW, HARTNETT ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008,27(4):331-371.
- [5] TOMBRAN-TINK J, JOHNSON LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989,30(8):1700-1707.
- [6] STELLMACH V, CRAWFORD SE, ZHOU W, BOUCK N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001,98(5):2593-2597.
- [7] APTE RS, BARREIRO RA, DUH E, VOLPERT O, FERGUSON TA. Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004,45(12):4491-4497.
- [8] HAMMES HP, LIN J, BRETZEL RG, BROWNLEE M, BREIER G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat[J]. *Diabetes*, 1998,47(3):401-406.
- [9] MIYAMOTO K, KHOSROF S, BURSELL SE, MOROMIZATO Y, AIELLO LP, OGURA Y, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) [J]. *Am J Pathol*, 2000,156(5):1733-1739.
- [10] JONAS JB, TAO Y, NEUMAIER M, FINDEISEN P. Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration[J]. *Arch Ophthalmol*, 2010,128(10):1281-1286.
- [11] ZHANG SX, WANG JJ, GAO G, SHAO C, MOTT R, MA JX. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor[J]. *FASEB J*, 2006,20(2):323-325.
- [12] PULLER C, DE SEVILLA MULLER LP, JANSSEN-BIENHOLD U, HAVERKAMP S. ZO-1 and the spatial organization of gap junctions and glutamate receptors in the outer plexiform layer of the mammalian retina [J]. *J Neurosci*, 2009,29(19):6266-6275.
- [13] SHEIKPRANBABU S, HARIBALAGANESH R, LEE KJ, GURUNATHAN S. Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end products-induced retinal vascular permeability[J]. *Biochimie*, 2010,92(8):1040-1051.
- [14] NAKAMURA S, CHIKARAISHI Y, TSURUMA K, SHIMAZAWA M, HARA H. Ruboxistaurin, a PKC β inhibitor, inhibits retinal neovascularization via suppression of phosphorylation of ERK1/2 and Akt[J]. *Exp Eye Res*, 2010,90(1):137-145.
- [15] FARRELL SM, GROEGER G, BHATT L, FINNEGAN S, O'BRIEN CJ, COTTER TG. bFGF-mediated redox activation of the PI3K/Akt pathway in retinal photoreceptor cells [J]. *Eur J Neurosci*, 2011,33(4):632-641.
- [16] ZHANG DK, HE FQ, LI TK, PANG XH, CUI DE J, XIE Q, *et al.* Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis[J]. *J Pathol*, 2010,222(2):213-222.