

引文格式:张俏,刘文强,左中夫,刘学政.褪黑素通过 Müller 细胞保护糖尿病视网膜神经节细胞的机制[J].  
眼科新进展,2019,39(7):611-614. doi:10.13389/j.cnki.rao.2019.0141

【实验研究】

# 褪黑素通过 Müller 细胞保护糖尿病视网膜神经节细胞的机制<sup>△</sup>

张俏 刘文强 左中夫 刘学政

作者简介:张俏,女,1980年10月出生,硕士。研究方向:糖尿病视网膜病变的发病机制及治疗。E-mail: 594926970@qq.com; ORCID:0000-0002-9393-9185

About ZHANG Qiao: Female, born in October, 1980. Master degree. E-mail: 594926970@qq.com; ORCID: 0000-0002-9393-9185

收稿日期:2018-10-10  
修回日期:2018-12-28  
本文编辑:盛丽娜

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81571383);中国博士后科学基金资助(编号:2017M612870);辽宁省自然科学基金资助(编号:201602340)

作者单位:121001 辽宁省锦州市,锦州医科大学人体解剖学教研室(张俏,刘文强,刘学政);530021 广西壮族自治区南宁市,广西医科大学基础医学博士后流动站解剖教研室(左中夫)

通讯作者:刘学政, E-mail: liuxuezheng168@vip.sina.com; ORCID: 0000-0003-2235-4910

Received date: Oct 10, 2018  
Accepted date: Dec 28, 2018

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81571383); China Postdoctoral Science Foundation (No: 2017M612870); Natural Science Foundation of Liaoning (No: 201602340)

From the Department of Human Anatomy, Jinzhou Medical University (ZHANG Qiao, LIU Wen-Qiang, LIU Xue-Zheng), Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; Department of Human Anatomy, Postdoctoral Research Station, Guangxi Medical University (ZUO Zhong-Fu), Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Responsible author: LIU Xue-Zheng, E-mail: liuxuezheng168@vip.sina.com; ORCID: 0000-0003-2235-4910

## Protective effects of melatonin on diabetic retinal ganglion cell via Müller cell

ZHANG Qiao, LIU Wen-Qiang, ZUO Zhong-Fu, LIU Xue-Zheng

**[Abstract] Objective** To explore the effect of melatonin (MLT) on diabetic retinal Müller cell, and the protective effect on retinal ganglion cell (RGC). **Methods** Totally 54 Sprague-Dawley rats were assigned into control group, diabetic group and MLT-treated group. Rats in diabetic group and MLT-treated group were administered with streptozotocin to induce diabetic models. After diabetes onset, rats in control group or diabetic group were administered with 10% ethanol, and rats in MLT-treated group were administered with MLT (10 mg · kg<sup>-1</sup>). Three month later, we observed the content of retinal malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) by kits, the expression of retinal glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS) by Western blot, the alteration of retinal GFAP positive staining with immunohistochemistry, the level of retinal glutamate with high efficiency liquid chromatography, and the density of RGC with HE staining. **Results** GFAP positive staining was restricted located in retinal nerve fiber layer in control group and MLT-treated group, but nearly throughout the retina in diabetic group. Compared with control group, diabetic group showed increased MDA, decreased GSH, increased GFAP, decreased GS, increased glutamate as well as decreased RGC density (all *P* < 0.01), while MLT-treated group showed no alterations to control group (all *P* > 0.05). **Conclusion** MLT inhibits oxidative stress in diabetic retina, reversing the expression of GS in Müller cell and inhibiting the accumulation of glutamate, and protects RGC.

**[Key words]** melatonin; diabetic retinopathy; Müller cell; glutamate; retinal ganglion cell

**[摘要] 目的** 探讨褪黑素对糖尿病视网膜 Müller 细胞的影响及其对视网膜神经节细胞的保护作用。**方法** SD 大鼠 54 只随机分为对照组、糖尿病组和褪黑素治疗组,糖尿病组和褪黑素治疗组制造糖尿病模型。造模后,对照组和糖尿病组大鼠腹腔注射体积分数 10% 乙醇溶液,褪黑素治疗组大鼠腹腔注射褪黑素溶液(10 mg · kg<sup>-1</sup>)。3 个月后,试剂盒检测视网膜中丙二醛(malondialdehyde, MDA)和还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)的含量,Western blot 检测视网膜中神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)及谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)的表达变化,免疫组织化学染色观察 GFAP 阳性染色的空间分布并进行定量分析,高效液相色谱检测视网膜中谷氨酸含量变化,HE 染色计数视网膜神经节细胞密度。**结果** 对照组及褪黑素治疗组 GFAP 免疫阳性染色主要局限于视网膜神经纤维层,而糖尿病组 GFAP 阳性染色几乎贯穿视网膜全层。与对照组相比,糖尿病组视网膜 MDA 含量增加而 GSH 含量减少,GFAP 表达增加而 GS 表达减少,谷氨酸含量增加,视网膜神经节细胞密度明显下降(均为 *P* < 0.01)。褪黑素治疗组与对照组各指标相比差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05)。**结论** 褪黑素能抑制糖尿病视网膜的氧化应激反应,恢复视网膜 Müller 细胞功能酶 GS 的含量,减少视网膜内谷氨酸堆积,保护视网膜神经节细胞。

**[关键词]** 褪黑素;糖尿病视网膜病变;Müller 细胞;谷氨酸;视网膜神经节细胞

**[中图分类号]** R774.1

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病严重的并发症之一,是成年人失明的主要原因<sup>[1-2]</sup>。DR 发病机制复杂,涉及血管、炎症和神经等多种因素。Müller 细胞是视网膜中数量最多的胶质

细胞,对于维持视网膜微环境稳态和正常生理功能具有重要作用。糖尿病时视网膜 Müller 细胞氧化应激反应明显,参与并促进了 DR 的发展<sup>[3]</sup>。褪黑素具有强大的抗氧化应激作用,本研究拟观察褪黑素对糖尿病视网膜 Müller 细胞的影响,以了解其在 DR 防治中的作用。期望本研究能进一步揭示 DR 的发病机制,为 DR 的临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂 6月龄清洁级 SD 大鼠 54 只,雌雄不限,体质量 200 ~ 230 g,由锦州医科大学实验动物中心提供。褪黑素、链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)、谷氨酸标准品 (Sigma 公司,美国),丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 及免疫组织化学试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司),神经胶质酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 及谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 抗体 (Abcam 公司,美国),化学发光试剂盒 (上海硕嘉生物科技有限公司)。

1.2 动物模型的制备及分组处理 参考文献<sup>[4]</sup>配制溶液,首先以无水乙醇配制 10 g · L<sup>-1</sup> 的褪黑素溶液,待褪黑素充分溶解后,加入生理盐水 10 倍稀释,使褪黑素终浓度为 1 g · L<sup>-1</sup>。制备 pH 4.5、浓度 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的柠檬酸缓冲液,用于配制 2 g · L<sup>-1</sup> 的 STZ 溶液。使用随机数字表法将实验动物分为对照组、糖尿病组和褪黑素治疗组,每组 18 只,其中糖尿病组和褪黑素治疗组大鼠建立糖尿病模型,具体方法为:大鼠按 60 mg · kg<sup>-1</sup> 的剂量腹腔注射 STZ 溶液,48 h 后测尾静脉血糖,将血糖浓度大于 16.7 mmol · L<sup>-1</sup> 作为糖尿病模型建立成功的标准。糖尿病模型建立成功后,褪黑素治疗组腹腔注射褪黑素溶液 (10 mg · kg<sup>-1</sup>),对照组和糖尿病组均注射生理盐水稀释的体积分数 10% 乙醇溶液。给药后自由饮食,3 个月后进行以下各指标检测。

1.3 大鼠视网膜 MDA 与 GSH 含量检测 每组随机选取 6 只大鼠乌拉坦麻醉后断颈处死,取双侧眼球,移除眼前节和玻璃体,用移液器吸除眼杯内残余液体。解剖显微镜下分离视网膜,以生理盐水制备 5 g · L<sup>-1</sup> 组织匀浆,离心取上清,根据试剂盒提供的操作流程和公式测算 MDA 和 GSH 的含量。

1.4 大鼠视网膜 GFAP 免疫组织化学染色 每组随机选取 6 只大鼠乌拉坦麻醉后断颈处死,取双侧眼球,以 40 g · L<sup>-1</sup> 多聚甲醛固定 2 h,300 g · L<sup>-1</sup> 蔗糖溶液中过夜脱水。冰冻切片机沿眼球矢状轴切片,制备厚 15 μm 视网膜冰冻切片。再依次经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育,正常山羊血清封闭后加入 1 : 3000 稀释的 GFAP 一抗,4 ℃ 冰箱中孵育 24 h, PBS 漂洗后再用 A594 标记的 1 : 500 稀释的二抗室温下孵育 4 h,封片,荧光显微镜下拍照,利用 Image J 软件检测各组

吸光度值 (A 值)。

1.5 Western blot 检测视网膜 GFAP 和 GS 的表达

每组随机选取 3 只大鼠乌拉坦麻醉后断颈处死,摘除眼球,解剖显微镜下剥离视网膜,加入蛋白裂解液制备视网膜组织匀浆,低温离心收集上清液蛋白,水浴使蛋白变性后电泳,转膜,脱脂牛奶 4 ℃ 封闭过夜,分别以 GFAP、GS 及 β-actin 一抗室温下孵育 2 h,再以辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,试剂盒显影,凝胶成像系统扫描分析目的条带光密度值。

1.6 高效液相色谱检测视网膜谷氨酸含量 制备乙腈-醋酸缓冲液-乙二胺四乙酸二钠 (体积比为 25 : 975 : 0.25) 的流动相 A,再制备流动相 B,即 A 相-水-乙腈 (体积比为 30 : 32 : 38),梯度洗脱,进样。取 100 μL 前述实验步骤 1.3 制备的视网膜组织匀浆,与 600 μL 无水乙醇充分混匀,离心收集上清,水浴蒸干,以衍生剂复溶,进样,在 254 nm 下检测,并利用软件 system Gold 分析校正并通过外标法计算视网膜谷氨酸浓度。

1.7 视网膜切片 HE 染色 每组取剩余的 3 只大鼠处死,取视网膜组织制备视网膜切片,将切片贴于载玻片上,苏木精浸染 2 min,分化液中浸泡 30 s,伊红染色 90 s,酒精梯度脱水,二甲苯透明,封片,观察并计数视网膜神经节细胞。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件,所有数值均以均数 ± 标准差表示,统计分析采用单因素方差分析, LSD 检验,以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜 MDA 及 GSH 含量变化 与对照组相比,糖尿病组视网膜 MDA 含量增加, GSH 含量减少,差异均有统计学意义 (均为 P < 0.01),而褪黑素治疗组与对照组相比 MDA、GSH 含量差异均无统计学意义 (均为 P > 0.05)。见表 1。

表 1 视网膜 MDA、GSH 含量及 GFAP、GS 表达变化 (x̄ ± s)

组别	GSH/mg · g <sup>-1</sup>	MDA/μmol · g <sup>-1</sup>	GFAP (/β-actin)	GS (/β-actin)
对照组	95.3 ± 7.5	0.23 ± 0.05	19.2 ± 3.8	55.7 ± 5.1
糖尿病组	73.1 ± 6.1 *	0.42 ± 0.10 *	51.6 ± 6.8 *	32.6 ± 3.8 *
褪黑素治疗组	92.6 ± 8.5	0.27 ± 0.08	22.2 ± 6.3	54.1 ± 5.5

注:与对照组相比, \* P < 0.01

2.2 视网膜 GFAP 免疫组织化学染色结果 免疫组织化学染色结果显示,对照组与褪黑素治疗组 GFAP 阳性染色主要局限于视网膜神经纤维层,而糖尿病组 GFAP 阳性染色几乎贯穿视网膜全层 (图 1)。将对照组 A 值设定为 (100.0 ± 0.0) %,定量分析显示,糖尿病组及褪黑素治疗组 A 值分别为 (356.6 ± 22.8) % 和 (110.3 ± 9.6) %。与对照组相比,糖尿病

组 A 值增高 ( $P < 0.01$ ), 褪黑素治疗组 A 值变化不明显 ( $P > 0.05$ )。

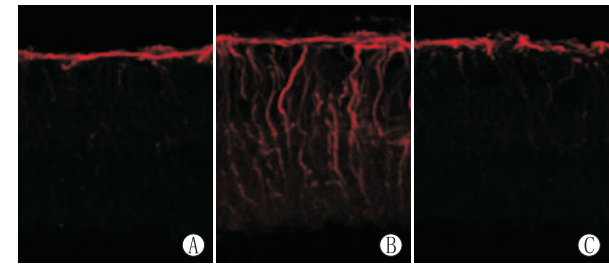


图1 各组视网膜 GFAP 免疫组织化学染色 (×400)。A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 褪黑素治疗组

**2.3 Western blot 检测视网膜 GFAP 和 GS 表达变化** 与对照组相比, 糖尿病组视网膜 GFAP 表达增加, GS 表达显著减少, 差异均有统计学意义 (均为  $P < 0.01$ ); 褪黑素治疗组与对照组相比差异均无统计学意义 (均为  $P > 0.05$ )。见表 1, 图 2。

**2.4 视网膜谷氨酸含量** 对照组、糖尿病组及褪黑素治疗组视网膜谷氨酸含量分别为 ( $34.8 \pm 5.7$ )  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 、( $44.3 \pm 5.2$ )  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 、( $35.6 \pm 6.1$ )  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。与对照组相比, 糖尿病组视网膜谷氨酸

含量明显增高 ( $P < 0.01$ ); 而褪黑素治疗组与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.5 视网膜神经节细胞计数** 各组 HE 染色结果见图 3。对照组、糖尿病组及褪黑素治疗组视网膜神经节细胞密度分别为 ( $1319 \pm 351$ )  $\text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$ 、( $886 \pm 198$ )  $\text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$ 、( $1126 \pm 348$ )  $\text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$ 。对照组及褪黑素治疗组视网膜神经节细胞排列规则, 密度均匀。与对照组相比, 糖尿病组视网膜神经节细胞数量减少, 密度下降 ( $P < 0.01$ ); 而褪黑素治疗组与对照组相比视网膜神经节细胞密度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

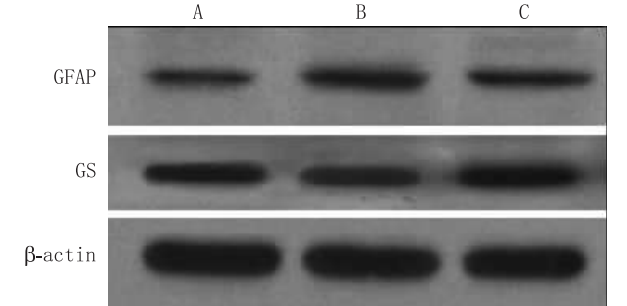


图2 Western blot 检测各组视网膜 GFAP 和 GS 表达变化。A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 褪黑素治疗组

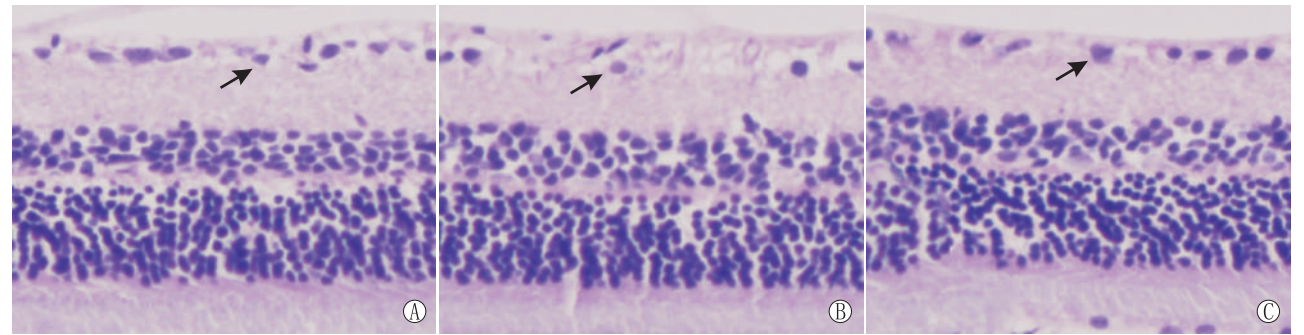


图3 各组视网膜 HE 染色 (箭头示视网膜神经节细胞, ×200)。A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 褪黑素治疗组

3 讨论

视网膜微血管病变是临床诊治 DR 的主要参考依据, 但 DR 病理变化不仅局限于微血管病变, 还伴有视网膜 Müller 细胞活化、视网膜神经节细胞凋亡、光感受器异常等变化<sup>[5]</sup>。  
糖尿病易导致氧化应激<sup>[4,6]</sup>。GSH 具有抗氧化应激能力, 而 MDA 是氧化应激反应的重要产物。本研究发现, 糖尿病大鼠视网膜 GSH 含量减少, MDA 含量增加, 这表明糖尿病 3 个月时的视网膜抗氧化应激能力下降, 氧化应激产物堆积, 发生了氧化应激反应。糖尿病大鼠给予褪黑素后, 视网膜 GSH 含量提高, MDA 含量下降, 这表明褪黑素能减轻糖尿病视网膜的氧化应激反应。  
氧化应激是视网膜 Müller 细胞结构和功能受损

的重要原因之一<sup>[7-8]</sup>。Müller 细胞占视网膜胶质细胞的 90% 以上, 几乎贯穿视网膜全层, 在维持细胞外环境稳态、维持血-视网膜屏障完整性中发挥重要作用<sup>[9-11]</sup>。GFAP 是胶质细胞特有的标志性蛋白, 但生理状态下 Müller 细胞几乎不表达 GFAP, 病理状态下 Müller 细胞活化, 可见 GFAP 表达<sup>[11-12]</sup>。本研究观察到, 对照组与褪黑素治疗组仅视网膜神经纤维层有少量 GFAP 蛋白表达, 但糖尿病组 GFAP 表达明显增加, 几乎视网膜全层均可见 GFAP 表达, 其范围与 Müller 细胞空间分布相吻合。这提示褪黑素抑制了糖尿病视网膜的氧化应激反应, 减轻了 Müller 细胞的损伤。

Müller 细胞是视网膜中唯一能合成 GS 的细胞, 能利用 GS 将谷氨酸转化为谷氨酰胺<sup>[13-14]</sup>。谷氨酸是一种重要的神经递质, 但过多的谷氨酸堆积能产

生细胞毒性,诱导神经元凋亡<sup>[15-16]</sup>。本研究结果显示,糖尿病大鼠 Müller 细胞 GS 表达减少,谷氨酸含量增加,视网膜神经节细胞密度降低,可能与 Müller 细胞清除谷氨酸能力下降,导致谷氨酸堆积,对视网膜神经节细胞产生了毒性作用有关。褪黑素治疗组 GS 表达增加,可能通过促进谷氨酸转化,降低谷氨酸含量,减轻细胞毒性的机制保护了视网膜神经节细胞,恢复了视网膜神经节细胞密度。视网膜神经节细胞的轴突形成视神经,是传导视觉冲动的主要细胞。因此,我们推测褪黑素在 DR 防治中有一定作用。

本研究探讨了褪黑素对糖尿病大鼠视网膜氧化应激的抑制作用,进而恢复 Müller 细胞的功能,增强 Müller 细胞清除谷氨酸的能力,保护并恢复了视网膜神经节细胞密度。该结果进一步揭示了 DR 的发病机制,为褪黑素在 DR 防治中的应用提供了参考依据。

参考文献

[1] MOZETIC V, FREITAS C G, RIERA R. Statins and fibrates for diabetic retinopathy: protocol for a systematic review [J]. *JMIR Res Protoc*, 2017, 6(2): e30.  
[2] TING D S, CHEUNG G C, WONG T Y. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 44(4): 260-277.  
[3] LI Z W, LIANG H M, LI Z, ZUO Z F, LIU X Z. The protective effect of rosiglitazone on diabetic retinal Müller cells and its effects on the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and inflammatory factors in Müller cells [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38(9): 825-828.  
李赵伟, 梁汇珉, 李铮, 左中夫, 刘学政. 罗格列酮对糖尿病视网膜 Müller 细胞的保护作用以及对 Müller 细胞胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 及炎症因子表达的影响 [J]. 眼科新进展, 2018, 38

(9): 825-828.  
[4] JIANG T, CHANG Q, CAI J, FAN J, ZHANG X, XU G. Protective effects of melatonin on retinal inflammation and oxidative stress in experimental diabetic retinopathy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1-13.  
[5] SIMÓ R, STITT A W, GARDNER T W. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter [J]? *Diabetologia*, 2018, 61(9): 1902-1912.  
[6] HAMMES H P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(1): 29-38.  
[7] TOFT-KEHLER A K, GURUBARAN I S, DESLER C, RASMUSSEN L J, SKYTT D M, KOLKO M. Oxidative stress-induced dysfunction of Müller cells during starvation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(6): 2721-2728.  
[8] PETERS S, GRIEBSCH M, KLEMM M, HAUEISEN J, HAMMER M. Hydrogen peroxide modulates energy metabolism and oxidative stress in cultures of permanent human Müller cells MIO-M1 [J]. *J Biophotonics*, 2017, 10(9): 1180-1188.  
[9] HAMON A, ROGER J E, YANG X J, PERRON M. Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems [J]. *Dev Dyn*, 2016, 245(7): 727-738.  
[10] MADELAINE R, MOURRAIN P. Endogenous retinal neural stem cell reprogramming for neuronal regeneration [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(11): 1765-1767.  
[11] COUGHLIN B A, FEENSTRA D J, MOHR S. Müller cells and diabetic retinopathy [J]. *Vision Res*, 2017, 139: 93-100.  
[12] WANG L, LI P. Expressions of nestin and glial fibrillary acidic protein in rat retina after optic nerve transection [J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(10): 1510-1515.  
[13] DAI M, XIA X B, XIONG S Q. BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Müller cells [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(2): 596-603.  
[14] BARNETT N L, POW D V, ROBINSON S R. Inhibition of Müller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light [J]. *Glia*, 2000, 30(1): 64-73.  
[15] ZHOU W, ZHU X, ZHU L, CUI Y Y, WANG H, QI H, et al. Neuroprotection of muscarinic receptor agonist pilocarpine against glutamate-induced apoptosis in retinal neurons [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(2): 263-275.  
[16] BI M M, HONG S, MA L J, ZHOU H Y, LU J, ZHAO J, et al. Chloride channel protein 2 prevents glutamate-induced apoptosis in retinal ganglion cells [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(7): 705-711.

《眼科新进展》杂志征订启事

《眼科新进展》杂志是由新乡医学院主办的眼科学高级学术刊物,创刊于1980年,大16开,100页,国内外公开发行。1999年加入国家科技部《万方数据系统科技期刊群》和《中国学术期刊(光盘版)》,1997年被上海医科大学图书馆选定为医学类核心期刊,2000年被美国《化学文摘》收录,2001年被俄罗斯《文摘杂志》收录,自2002年连续入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),自2008年连续入选中国中文核心期刊,并连续被评为河南省二十佳科技期刊。2009年入选WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM),并被评为RCCSE中国核心学术期刊。国际标准连续出版物号为:ISSN 1003-5141,国内统一刊号:CN 41-1105/R,邮发代号:36-42。

本刊辟有名家讲坛(述评)(Editorial)、实验研究(Experimental study)、应用研究(Applied study)、文献综述(Review article)、海外信息(Overseas information)、消息(News)、读者来信(Letters)等栏目。本刊读者对象主要是眼科学临床、科研和教学工作者。欢迎国内外眼科医学工作者踊跃投稿和订阅。国内每期定价10.00元,全年定价120.00元。如错过邮局订阅,可直接汇款到我刊编辑部。联系地址:河南省新乡市金穗大道601号,新乡医学院期刊社《眼科新进展》杂志编辑部,邮编:453003。联系电话:0373-3029404;E-mail: ykxjz@xxmu.edu.cn、ykxjz@163.com;网址: <http://www.ykxjz.com>