

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2019)01-0017-04

高度近视糖尿病豚鼠视网膜中骨桥蛋白及整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体的表达

胡凌飞¹ 李晨皓² 梅立新¹ 吴昌凡¹

(1.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 眼科,安徽 芜湖 241001;2.芜湖市眼科医院 眼科,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的:通过观察糖尿病豚鼠视网膜中骨桥蛋白(OPN)及整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体的表达水平受高度近视的影响情况,初步探讨高度近视影响糖尿病视网膜病变进展的机制。方法:选取出生1周龄雄性豚鼠90只,随机分为正常对照组(I组)、高度近视组(II组)、糖尿病组(III组)、糖尿病合并高度近视组(IV组)。I组18只,余3组每组24只。II组为半透明眼罩遮盖右眼20周;III组为饲养8周时左下腹腔注射链脲佐菌素(STZ)280 mg/kg;IV组为半透明眼罩联合注射STZ。每组随机选择18只完成实验测量,摘除眼球后行HE染色、免疫组化染色,观察视网膜组织形态,并对OPN和整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体阳性细胞率完成计数。结果:各组豚鼠均造模成功。HE染色观察II、III、IV组的视网膜组织形态,与I组相比均有组织学差异,III、IV组可见发生糖尿病视网膜改变,IV组较III组程度轻。免疫组化染色观察,有糖尿病组(III组、IV组)与无糖尿病组(I组、II组)比较,OPN、整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。另IV组与III组相比,OPN及整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体阳性表达率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:OPN及整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体在糖尿病合并高度近视豚鼠视网膜组织中的表达较其在糖尿病模型中表达低,可能在高度近视影响DR进程中新生血管的发展中发挥作用。

【关键词】糖尿病;近视;整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体;骨桥蛋白**【中图分类号】**R 778.11; R 587.1; R-332 **【文献标志码】**A**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2019.01.005

Impact of severe myopia on osteopontin and integrin $\alpha v \beta 3$ expression in retina of diabetic guinea pigs

HU Lingfei, LI Chenhao, MEI Lixin, WU Changfan

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To observe the effect of severe myopia on osteopontin(OPN) and integrin $\alpha v \beta 3$ expression in the retina of diabetic guinea pigs for further investigating the association of severe myopia with diabetic retinopathy. **Methods:** Ninety male guinea pigs aged one week were randomized into group I (control group $n=18$), group II (severe myopia $n=24$), group III (diabetes $n=24$) and group IV (diabetes concomitant with severe myopia $n=24$). Animal models were developed by right eye covered with translucent mask for pigs in group II for 20 weeks, by left lower abdominal injection with streptozotocin(STZ 280 mg/kg) by the 8th week for animals in group III. Guinea pigs in group IV were treated with translucent mask and STZ injection. Then 18 pigs were randomly chosen from each group and the eyeballs were taken to undergo the test, including HE and immunohistochemical staining for observing the retina morphology as well as OPN and $\alpha v \beta 3$ expression. **Results:** Animal models were successfully established for each group. HE staining indicated histological changes in retina of pigs in group II, III and IV compared to those in group I. Diabetic retinopathy occurred in animals in group III and IV, yet the lesion was minor in guinea pigs in group IV. Immunohistochemical staining revealed significantly increased OPN and integrin $\alpha v \beta 3$ expression in animals in group III and IV ($P < 0.05$), and OPN and integrin $\alpha v \beta 3$ expression was significantly lower in animals in group IV ($P < 0.05$). **Conclusion:** OPN and its receptor integrin $\alpha v \beta 3$ expression was lower expressed in the retina of diabetic guinea pigs with severe myopia, suggesting that severe myopia may affect the neovascularization in animals with diabetic retinopathy.

【Key words】diabetes mellitus; myopia; integrin $\alpha v \beta 3$; osteopontin

糖尿病视网膜病变(diabetes retinopathy, DR)是糖尿病最为常见和严重的微血管并发症,是主要的

基金项目:皖南医学院中青年科研基金项目(WK2014F18)

收稿日期:2018-06-26

作者简介:胡凌飞(1983-),女,主治医师,(电话)15255381575,(电子信箱)hlf19831120@yeah.net;

吴昌凡,男,主任医师,副教授,硕士生导师,(电子信箱)wucangfan@sina.com,通信作者。

致盲眼病之一^[1]。现有研究表明高度近视与糖尿病视网膜病变的程度和分期有负关联^[2],目前尚无确切机制解释。有研究表明骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)同整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体相结合形成的黏附蛋白分子与糖尿病视网膜新生血管增生具有正相关性^[3]。本研究为验证两者表达是否与高度近视对DR进展的影响机制有关联。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 实验以1周龄英国种健康单色雄性豚鼠(体质量100~250g)为实验动物,共90只,按标准动物实验室条件饲养。随机数字表法随机分为4组,分别为I组(正常对照组)、II组[高度近视组(形觉剥夺性)]、III组(患有糖尿病组)和IV组(高度近视合并糖尿病组)。设18只正常对照组,其他实验组均为24只。造模于适应性喂养1周后开始。

1.2 建立动物模型方法

1.2.1 正常对照组 常规实验室条件饲养8周,左下腹腔注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mmol/L, pH 4.4, 280 mg/kg),建立空白对照。

1.2.2 高度近视造模方法 II组和IV组以半透明眼罩遮盖右眼(10英寸清洁不透明气球)8周后,散瞳验光(复方托吡卡胺滴眼液,带状光检影法),屈光度 ≥ -6.00 D为成模标准,II组豚鼠左下腹腔注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mmol/L, pH 4.4, 280 mg/kg),观察20周。

1.2.3 糖尿病造模方法 III组、IV组糖尿病造模待IV组高度近视模型形成后建立,左下腹腔注射5%链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)溶液280 mg/kg 3 d后,禁食禁水10 h,经针刺耳缘静脉采血测定空腹血糖,空腹血糖 ≥ 16.5 mmol/L为糖尿病成模标准,观察20周。

1.3 眼球标本制作 所有试验豚鼠完成空腹血糖测定、散瞳验光后,取各组豚鼠右眼球标本,应用心尖部穿刺体循环灌注固定法快速进行。完成后即行眼轴长度测量3次取平均值。眼球组织固定7 d后取出(4%多聚甲醛固定液),沿视神经方向经视神经切开眼球,取出晶状体,切面朝下,脱水、媒浸、包埋、切片(厚度为4 μ m)。完成若干张连续切取,并选择连续3张,在载玻片上铺展,分别行整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体、OPN免疫组化染色及HE染色,完成区别标记。

1.4 切片观察方法 使用Image Pro Plus 6.0显微镜成像计算机采集分析系统完成图像采集。视网膜

组织形态,细胞排列及数目应用HE染色,整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体、OPN阳性表达情况应用免疫组化切片观察。两者均在神经节细胞层呈胞浆表达为淡黄至棕黄色颗粒。OPN、整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体阳性表达率计算:随机观察每张免疫组化切片5个高倍镜(10 \times 40倍)视野,记录并计算视野内阳性细胞总数占总细胞数的比值。阳性细胞率0%、1%~20%、21%~50%、大于51%分别代表阴性(-)、弱阳性(+)、阳性(++)、强阳性(+++)。

1.5 统计学分析 应用SPSS 18.0软件完成统计学分析。造模后各组的屈光度、眼轴长度、空腹血糖以均数 \pm 标准差表示,总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验;各组视网膜中OPN、整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体阳性表达率以中位数和四分位数间距表示,总体差异、组间两两比较采用Kruskal-Wallis H检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

I组豚鼠存活率100%;II组豚鼠的存活率100%,造模成功率为91.7%;III组豚鼠存活率83.3%,造模成功率为83.3%;IV组豚鼠存活率为79.2%,造模成功率75%。各组随机抽取18只成模豚鼠为研究对象。造模后各组豚鼠屈光度、眼轴长度、空腹血糖比较见表1,其中无近视组(I、III组)较高度近视组(II、IV组)屈光度值低,眼轴长度短,差异均有统计学意义($P < 0.05$);无糖尿病组(I、II组)空腹血糖值比糖尿病组(III、IV组)低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 造模后各组豚鼠屈光度、眼轴长度及空腹血糖($n = 18$)

组别	屈光度/D	眼轴长度/mm	空腹血糖/(mmol/L)
I组	198.61 \pm 58.46 ^a	9.31 \pm 0.49 ^a	5.57 \pm 0.80 ^a
II组	-875.00 \pm 157.18 ^b	10.21 \pm 0.58 ^b	5.57 \pm 1.37 ^a
III组	226.94 \pm 71.13 ^a	9.30 \pm 0.51 ^a	21.05 \pm 3.01 ^b
IV组	-866.67 \pm 168.69 ^b	10.16 \pm 0.53 ^b	21.53 \pm 3.14 ^b
F	457.366	16.659	276.798
P	0.000	0.000	0.000

注:多组间两两比较,字母不同表示 $P < 0.05$ 。

2.1 HE染色切片观察 I组视网膜各层组织厚度及细胞的形态、数量均正常,细胞核呈蓝色,胞质呈红色,神经节细胞排列整齐;II组视网膜细胞排列紊乱,视网膜各层尤其是神经节细胞层变薄;III组视网膜组织形态疏松,细胞数目少,排列错乱,可见视网

膜微动脉瘤、少量小动脉栓塞及静脉血栓 提示该组豚鼠发生了糖尿病视网膜病变; IV 组视网膜组织变薄、疏松,且排列紊乱,可见少量微动脉瘤,提示发生糖尿病视网膜病变但较 III 组细胞破坏轻。

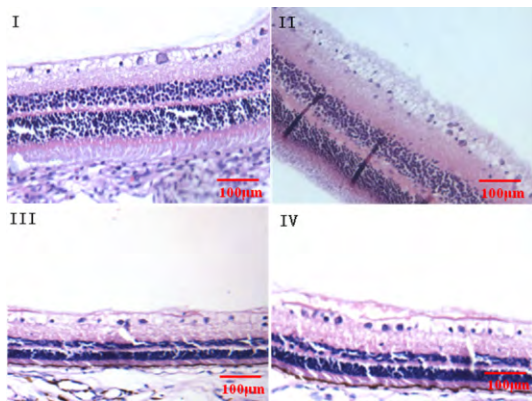


图 1 各组豚鼠视网膜组织病理学改变(EnVISION×200)

2.2 免疫组化染色 结果显示,糖尿病组(III、IV 组) OPN、整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体的表达水平较无糖尿病组(I、II 组) 增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);在 I、II 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$); IV 组 OPN、整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体的表达水平较 III 组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组豚鼠视网膜组织中 OPN、整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体的阳性表达率比较(中位数和四分位数间距)

组别	OPN 阳性细胞率/%	整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体阳性表达率/%
I 组	0(0~16.80) ^a	0(0~2.73) ^a
II 组	0(0~14.81) ^a	0(0~2.63) ^a
III 组	63.48(53.98~71.10) ^b	63.00(46.30~70.30) ^b
IV 组	49.80(40.23~57.63) ^c	53.90(42.33~60.98) ^c
χ^2	57.678	57.723
P	0.000	0.000

注:多组间两两比较,字母不同表示 $P < 0.05$ 。

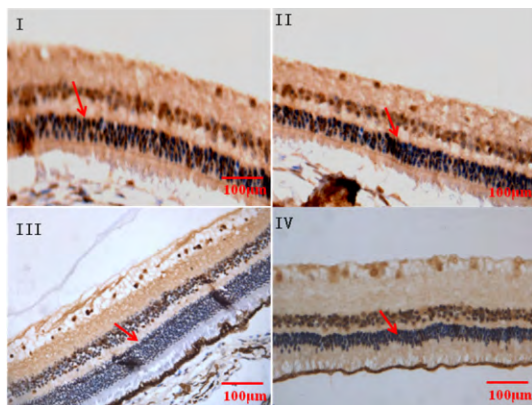


图 2 各组豚鼠视网膜 OPN 免疫组化染色(EnVISION×200)

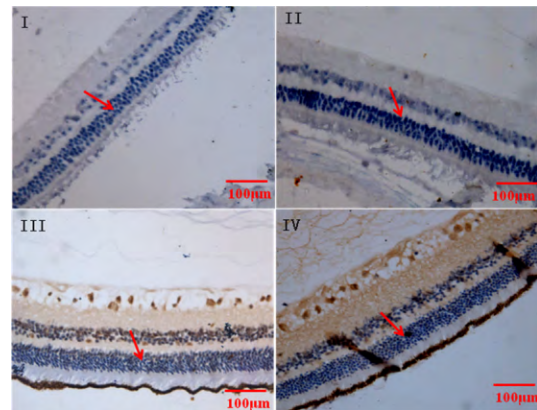


图 3 各组豚鼠视网膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体免疫组化染色(EnVISION×200)

3 讨论

DR 是糖尿病常见且严重的微血管并发症之一,是由多种细胞因子、多途径共同作用,导致视网膜新生血管形成及血-视网膜屏障破坏,引起玻璃体视网膜增生性改变,最终使糖尿病患者视力丧失。故抑制促新生血管形成因子的表达,使血管内皮损伤机制受阻,可望带来糖尿病治疗的新希望。目前掌握大量的实验证据表明,OPN 及整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体在视网膜缺血缺氧状态下产生视网膜新生血管的过程中发挥重要作用^[4]。

OPN 是一种增生相关蛋白,广泛分布于人体组织中,在炎症、肺结核、肿瘤的研究中均有表明,在新生血管形成、增生改变过程中均有 OPN 诱发作用^[5]。有研究指出,血管内皮细胞通过 OPN 介导,与细胞外基质相互作用后分化、增殖,加速新生血管形成^[6]。有学者研究结果推测增生性玻璃体视网膜病变的血管增生性改变机制与升高的 OPN 浓度存在相关性。在糖尿病视网膜病变增殖期患者玻璃体内,OPN 可具有相似的浓度升高过程^[7]。OPN 同整合素受体家族有效的结合是其生物学作用有效发挥的基础,OPN 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体是一组相结合的黏附蛋白分子,两者为配体与受体的关系,在新生血管形成过程中有协同功能。整合素可作为新生血管的标志,其高表达可用来衡量侵袭性疾病和增生性疾病在治疗过程中评价恶化的标准。本文研究结果显示 OPN 及整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体在糖尿病组(III、IV 组) 豚鼠的表达水平比血糖正常组(I、II 组) 高,且差异均有统计学意义($P < 0.05$),与其他学者研究结果一致。

近年来发现高度近视与 DR 的程度及分期有负关联,近视、眼轴长的患者 DR 的发生率低,近视程

度越高,DR 病变程度越轻,尤其是危及视力的重度 DR 发生率更低^[8]。提示近视度数高或眼轴长可能是 DR 的保护因素,已发现机制有:各种血管损伤因子和冲击损伤因血流量降低而减少,视网膜细胞透氧环境因巩膜变薄而得以改善,新生血管数量在玻璃体液化、后脱离后会降低^[9-10]。但目前具体机制的诠释尚未统一。此次研究中,糖尿病合并高度近视豚鼠视网膜中 OPN 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体阳性表达率均比糖尿病组低($P < 0.05$),观察各组豚鼠视网膜形态,糖尿病组视网膜破坏也比糖尿病合并高度近视组明显。由此推测,OPN 与整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体结合后的协同促进增生作用同新生血管增殖损伤具有相关性,降低视网膜组织破坏程度可通过抑制两者表达来实现。

通过本研究推测高度近视对糖尿病视网膜病变进展的阻滞可能是通过下调视网膜内 OPN 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体的表达。但具体调节机制尚不清楚,有待进一步研究探讨。

【参考文献】

[1] NAKAJIMA M, COONEY MJ, ALEXANDER HT *et al.* Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 42: 2110-2114.
 [2] 赵菊莲,王婵婵,毛新帮,等.高度近视与非对称性糖尿病视网

膜病变的关系[J].*中华眼底病杂志* 2012 28(3) : 286-287.
 [3] CHIDLOW G, WOOD JP, MANAVIS J, *et al.* Expression of osteopontin in the rat retina: effects of excitotoxic and ischemic injuries [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 49(2) : 762-771.
 [4] TAKAGI H, SUZUMA K, OTANI A, *et al.* Role of vitronectin receptor type integrins and osteopontin in ischemia-induced retinal neovascularization [J]. *Jpn J Ophthalmol* 2002 46: 270-278.
 [5] FAN LIN, YUYUAN LI, JIE CAO, *et al.* Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma and its relationships with metastasis, invasion of tumor cells [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011 38 (8) : 5205-5210.
 [6] SAIKA S, SUMIOKA T, OKADA Y, *et al.* Wakayama symposium: modulation of wound healing response in the corneal stroma by osteopontin and tenascin-C [J]. *The Ocular Surface* 2013 1(11) : 12-15.
 [7] KASE S, YOKOI M, SAITO W, *et al.* Increased osteopontin levels in the vitreous of patients with diabetic retinopathy [J]. *Ophthalmic Res* 2007 39: 143-147.
 [8] LIRA LS, LALNOUREUX E, SAW SM, *et al.* Are myopic eyes less likely to have diabetic retinopathy [J]? *Ophthalmology*, 2010, 117: 524-530.
 [9] 安建斌,韩瑶,张彤迪.糖尿病视网膜病变各期血流动力学研究[J].*眼科研究* 2005 23(1) : 79-82.
 [10] DUJIC M, MISAILOVIC K, NIKOTICL J, *et al.* Occurrence of changes in the eye in diabetic retinopathy with significant myopia [J]. *Srp Arh Celok Lek*, 1998, 126 (11-12) : 457-460.

(上接第 11 页)

本文结果显示 OSCI 造模方法可对雌雄鼠同时进行抑郁/焦虑症模型造模,不仅在实验方法学上有一定的价值,可被用于失恋导致的抑郁患者相关病情和治疗研究等。同时两性别模型鼠的相似行为学表现,对抑郁/焦虑症的性别差异研究也有一定的意义,如在其他类型的抑郁症(CCMD-3) 的男女患者中,男性的病理异常更为严重^[9],提示抑郁/焦虑症中患者的性别差异及机制可能仍需进一步探索与讨论。

【参考文献】

[1] HAMET P, TREMBLAY J. Genetics and genomics of depression [J]. *Metabolism: Clinical & Experimental* 2005 54(1) : 10-15.
 [2] 曹晓燕,钟振环,潘丽敏.大学生抑郁症的临床表现及中医辅助治疗[J].*河北中医* 2007 29(1) : 33-35.

[3] YANG L, SHI LJ, TANG B, *et al.* Opposite sex contact and isolation: A novel depression/anxiety model [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2016 32(1) : 92-98.
 [4] 付锦华.新型抗抑郁中药舒肝解郁胶囊对抑郁模型大鼠的作用机制研究[D].长沙:中南大学湘雅二医院,2014.
 [5] 符源才.一例失恋抑郁的心理咨询案例报告[J].*华人时刊*, 2013(10) : 292-293.
 [6] SCHULTZ W. Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology [J]. *Current Opinion in Neurobiology* 2004 14(2) : 139-147.
 [7] INSEL TR. Is social attachment an addictive disorder [J]? *Physiology & Behavior* 2003 79(3) : 351-357.
 [8] HODGES TE, MCCORMICK CM. Adolescent and adult male rats habituate to repeated isolation, but only adolescents sensitize to partner unfamiliarity [J]. *Hormones & Behavior*, 2015(69) : 16-30.
 [9] 陈建新,吕淑云,杨超.抑郁症患者临床特征的性别差异[J].*中国健康心理学杂志* 2008 16(10) : 1177-1178.