

· 论著摘要 ·

糖尿病大鼠脉络膜病变超微结构的研究

周希媛 乔岗 陈曜 马华锋 江文珊 阴正勤

【关键词】 糖尿病视网膜病/病理学; 脉络膜病/病理学

中图分类号:R774.1 R773.4

随着吲哚青绿血管造影(ICGA)和荧光素眼底血管造影(FFA)的开展,人们发现糖尿病视网膜病变(DR)发生的同时脉络膜也有相应的改变,认为糖尿病的视网膜脉络膜病变可能同时存在^[1], Saracco 等^[2]提出了糖尿病脉络膜病变(DC)的概念。我们通过建立糖尿病的动物模型,在不同病程通过透射电子显微镜从组织病理学角度进一步观察糖尿病大鼠发生脉络膜病变的超微结构改变,分析它与视网膜病变之间的关系。

1 材料和方法

雄性 Wistar 大鼠 30 只(重庆医科大学动物实验室提供),体重 200 g 左右。随机分为 2 组:实验组 20 只,对照组 10 只。实验组给予浓度 1.25% 的链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司)30 mg/kg 尾静脉注射,每周 1 次,连续 4 周,对照组大鼠尾静脉注射等量 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 值 4.5)^[3]。4 周后剪尾采血,用 ONE TOUCH II 血糖仪(美国强生有限公司)测血糖,用强生尿糖试纸测尿糖浓度,血糖浓度达 16.65 mmol/L,尿糖达 3+~4+ 即为模型建立成功。以后每周和处死大鼠前各测血糖、尿糖各 1 次。

实验组大鼠分别于动物模型建立后 2 周、1、2、3 个月,用 4% 多聚甲醛心脏灌注处死(每个时间点各处死 5 只大鼠)。对照组亦于注射后 2 周、1、2、3 个月各处死大鼠 2 只。各组动物双眼均制备电子显微镜标本。Philips EM208s 透射电子显微镜下观察大鼠全层视网膜、脉络膜超微结构的改变。

采用 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统(成都金盘电子科大多媒体技术有限公司产品)测定各病程糖尿病大鼠视网膜和脉络膜毛细血管基底膜厚度(TBM)和管腔横截面积(TA),其结果进行方差分析。

2 结果

视网膜毛细血管 TBM 值测定结果:对照组(0.073±0.018),实验组模型建立后 2 周、1、2、3 个月分别为(0.075±0.016)、(0.113±0.023)、(0.132±0.014)、(0.162±0.020);TA 值测定结果:对照组(39.60±18.15),实验组模型建立后 2 周、1、2、3 个月分别为(36.42±18.10)、(29.23±16.25)、(29.31±19.20)、(15.60±14.15);经方差分析,除 2 周组视网膜 TBM 值和 TA 值与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)外,其余各组分别与对照组比较,差异均有统计学意义

($P<0.05$)。脉络膜毛细血管 TBM 值测定结果:对照组(0.071±0.020),实验组模型建立后 2 周、1、2、3 个月分别为(0.069±0.019)、(0.076±0.015)、(0.126±0.013)、(0.172±0.021);TA 值测定结果:对照组(79.54±19.21),实验组模型建立后 2 周、1、2、3 个月分别为(76.71±20.23)、(78.63±16.34)、(59.32±16.32)、(35.44±18.25);经方差分析,2 周组和 1 个月组 TBM 值和 TA 值与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),2、3 个月组 TBM(TA)值与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

对照组大鼠视网膜毛细血管由内皮细胞、周细胞和基底膜构成。内皮细胞和周细胞核异染色质分布均匀。基底膜连续,电子密度均一,并且管腔较大,内皮细胞成熟。与正常对照组比较,实验组大鼠模型建立 2 周以后的视网膜及脉络膜毛细血管超微结构无明显改变,即内皮细胞和周细胞均无改变。实验组大鼠模型建立 1 个月以后视网膜毛细血管内皮及周细胞核的异染色质凝聚靠边,内皮细胞细胞质内饮泡增多,线粒体肿胀,细胞质向管腔突出,但管腔变形不明显。毛细血管扩张,周细胞线粒体肿胀,嵴消失,甚至空泡性变,出现这类变化有 8 只眼(8/10),其 TBM 和 TA 值与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);6 只眼(6/10)脉络膜毛细血管基底膜略增厚,内皮细胞和周细胞核膜略凹陷,异染色质开始聚集、靠边,其 TBM 和 TA 值与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。实验组大鼠模型建立 2 个月以后,6 只眼(6/10)视网膜毛细血管改变更明显,出现了内皮细胞及周细胞核变形,线粒体肿胀显著,并见空泡性改变,基底膜显著增厚,电子密度增加,内皮细胞向管腔突出严重,管腔变形、狭窄,几近闭塞;同时,7 只眼(7/10)脉络膜毛细血管出现了相应的改变,内皮细胞及周细胞核变形,线粒体略肿胀,管腔变化不显著,其 TBM 和 TA 值与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。实验组大鼠模型建立 3 个月以后,8 只眼(8/10)视网膜血管变化同前;6 只眼(6/10)脉络膜毛细血管改变加重,出现了内皮细胞及周细胞核变形,内皮细胞向管腔突出严重,管腔变形、狭窄,甚至几近闭塞等类似变化,并且与正常脉络膜内皮细胞窗孔比较明显增大,提示渗漏增强。

3 讨论

DC 近年来逐渐受到国内外学者的重视,但国内对其研究尚少。我们通过建立糖尿病的动物模型观察糖尿病大鼠脉络膜血管的形态学改变,初步探讨了糖尿病脉络膜的改变与其视网膜的改变之间的时间关系,在糖尿病 1 个月时 DR 改变已开始出现,TBM 和 TA 值与对照组比较有显著差异($P<0.05$),随

着病程延长 DR 改变愈加显著。而脉络膜毛细血管的 TBM 和 TA 值在 2 个月时与对照组比较也出现了统计学差异 ($P < 0.05$), 提示 DC 开始发生, 并随病程发展, 出现了与 DR 类似的变化。因此初步推论 DC 的改变是存在的, 并且略迟于 DR 的改变。这与临床上通过 ICGA 和 FFA 的观察基本一致, Shiragami 等^[4] 就认为 DC 的危险因数就是严重的 DR 以及未控制好的高血糖。

但也有学者通过 ICGA 观察认为 DC 早于 DR 的改变, 甚至 DC 出现在没有任何视网膜血管改变之前^[5]。其中的差异可能与糖尿病的类型有关, 我们采用 STZ 小剂量多次注射诱导的糖尿病大鼠是 1 型糖尿病, 而临床资料中有的 2 型糖尿病或没有严格区分糖尿病类型。因此, 这还是一个值得进一步探讨的问题。

总之, DC 同 DR 一样是一个较复杂的过程, 本研究结果限

于样本量和方法的局限只能为该病的机制提供一个初步的线索, 更多的研究有待进行。

4 参考文献

- 1 Amalric P. Evolution of the conceptualization of diabetic retinopathy. Bull Acad Natl Med, 1991, 175:1017-1032.
- 2 Saracco JB, Gastaud P, Ridings B, et al. Preliminary study on diabetic choroidopathy. Bull Soc Ophthalmol Fr, 1982, 82:451-454.
- 3 刘霆, 张桂珍, 卜丽莎, 等. STZ 小剂量多次注射诱导大鼠胰岛素依赖性糖尿病动物模型探讨. 白求恩医科大学学报, 2001, 27:578-580.
- 4 Shiragami C, Shiraga F, Matsuo T, et al. Risk factors for diabetic choroidopathy in patients with diabetic retinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2002, 240:436-442.
- 5 阴正勤, 孟晓红, 余涛, 等. 1 型糖尿病患者吲哚青绿血管造影的观察. 中华眼底病杂志, 2000, 16:160-161.

(收稿日期: 2004-09-01)

(本文编辑: 朱敏)

脉络膜黑色素瘤蜡块组织中提取 DNA 方法的改良

吴宏 苏冠方 刘早霞

【关键词】 脉络膜肿瘤/病理学; 黑色素瘤/病理学; 脱氧核糖核酸; 病理学/方法

中图分类号: R739.7 R361.2

目前, 对于脉络膜黑色素瘤的分子生物学研究日新月异。但是, 脉络膜黑色素瘤新鲜组织来源有限, 制约了研究工作的发展。为了解决这一问题, 我们拟从蜡块组织中提取 DNA, 因为蜡块标本相对好保存, 来源充足。但是蜡块标本经过固定、石蜡包埋等步骤后, 对 DNA 会产生一些影响, 所以从蜡块组织中提取 DNA 有一定的难度。为此, 我们对于从石蜡包埋组织中提取 DNA 的方法进行了改良。

Su 等^[1] 于 1999 年克隆出人类 TTC4 基因, 该基因存在于人类染色体 1p31, 共有 10 个外显子。由于 1 号染色体长臂经常于多种恶性肿瘤发生时呈现缺失改变, 因此, 极有可能有多个肿瘤抑癌基因存在于此区域。2000 年 11 月, 德国一家实验室使用 Su 等^[1] 提供的多聚物酶链反应 (PCR) 引物, Poetsch 等^[2] 于皮肤恶性黑色素瘤中发现 TTC4 基因突变的存在。因此, TTC4 基因很有可能为抑癌基因, 并且在黑色素瘤的形成中扮演重要角色^[1,3]。本研究采用改良方法从脉络膜黑色素瘤蜡块组织中提取 DNA, 为探讨 TTC4 基因在脉络膜黑色素瘤形成中的作用奠定基础。

1 材料和方法

DNA Marker DL2 000 购自 Takara 公司。Silver Beads 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。蛋白酶 K 为 Merck 产品。Taq DNA Polymerase (MBI 产品) 购自上海生物工程技术有限公司。三羟甲基氨基甲烷 (tris) ($C_4H_{11}NO_3$) 及各种生化试剂均为华美公司产品。

1995 年以来由吉林大学第二医院病理科保存的脉络膜黑色素瘤蜡块标本中选取 21 例, 所有标本均经临床和病理检查而明确诊断。取 8 μ m 石蜡切片 3 片, 在解剖显微镜下, 去除瘤旁组织, 用刀片刮取肿瘤组织放入微量离心管中。刀片每操作一例标本后, 即用酒精棉球擦拭刀片, 在酒精灯上烧过再用。加入 1 ml TES [10 mmol tris-HCl, 1 mmol 乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS)], 65 $^{\circ}$ C 下水浴 10 min, 不时振摇。冰浴 3 min, 10 000 \times g 离心 3 min, 以切钝的加样器小心吸取沉淀组织入另管, 重复水浴脱蜡 2 次, 最后吸出的沉淀入另管。脱蜡后的组织加入 200 μ l TET (100 mmol tris-HCl, 1 mmol EDTA, 1% triton X-100), 8 μ l 蛋白酶 K (10 mg/ml), 45 $^{\circ}$ C 下水浴 36 h, 其间振摇数次; 12 000 \times g 离心 5 min, 吸上清液入另管; 200 μ l 上清管内加入 800 μ l DNA 纯化溶胶液和 20 μ l 玻璃粉悬液, 置 55 $^{\circ}$ C 下水浴 10 min, 2~3 min 振摇一次, 使混悬; 冰浴冷却至室温, 10 000 \times g 离心 1 min, 弃除上清液, 以溶胶液 500 μ l 悬浮玻璃粉沉淀, 10 000 \times g 离心 1 min, 弃除上清液。以 DNA 回收试剂盒中洗液 500 μ l 悬浮玻璃粉沉淀, 10 000 \times g 离心 1 min, 弃除上清液, 并重复此步骤 1 次; 玻璃粉沉淀真空干燥或室温下风干, 至玻璃粉呈白亮色, 内部无明显可见的液体; 以 30~40 μ l 灭菌四蒸水悬浮玻璃粉沉淀, 55 $^{\circ}$ C 水浴 5~10 min, 其间振摇 3~4 次; 冰浴至室温后, 12 000 \times g 离心 3 min, 小心吸取上清液即为 DNA 的水溶液, 冻存待用, 注意勿吸取下层玻璃粉。

提取的 DNA 溶液作为模板, 扩增 TTC4 基因 10 个外显子中的 6 个, 来检验 DNA 的提取效率。以 2 μ l DNA 溶液为模板, 在 1 μ mol/L 的引物下进行 PCR, 同时摸索反应条件。取 4~5 μ l PCR 产物, 在 1.5%~2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳观察, 具体

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170998)

作者单位: 130041 长春, 吉林大学第二医院眼科

通讯作者: 苏冠方, Email: sugf@yahoo.com