

黏附分子 E 选择素在大鼠糖尿病视网膜病变中的表达

潘琳 周水平 郭艳茹 彭俊云

【摘要】目的 研究黏附分子 E 选择素在早、中、晚期糖尿病视网膜病变(DR) 大鼠微血管中的表达。

方法 雄性 SD 大鼠 90 只,随机分为 6、9、12 个月正常对照组,每组 10 只大鼠;及链脲佐菌素(STZ)DR 大鼠 6、9、12 个月模型组,每组 20 只大鼠。STZ DR 组用 STZ 按 60 mg/kg 的剂量腹腔一次性注射,制备 DR 模型。分别按期处死大鼠,取眼球进行视网膜微血管消化铺片,免疫组织化学 EnVision 方法显示微血管黏附分子 E 选择素,采用 Leica-Q550W 图像分析仪定量分析 E 选择素在大鼠视网膜微血管中含量表达,并同时观察其形态学改变,了解 DR 病损程度与 E 选择素表达有无相关性。 **结果** 形态改变: DR 6 个月组内皮细胞增生,周细胞减少。DR 9、12 个月组毛细血管网排列紊乱,基底膜明显增厚,毛细血管腔内有较多白细胞黏附、聚集,大面积无细胞毛细血管形成和周细胞内皮细胞凋亡。定量分析结果:正常组无 E 选择素表达, DR 各组均有不同程度 E 选择素表达, DR 各组之间差异有统计学意义($P < 0.01$),其中以 DR 9、12 个月组表达量最高。 **结论** 随 DR 病程延长,视网膜毛细血管 E-选择素表达逐渐增高,并与 DR 微血管的病损程度呈正相关。

【关键词】 糖尿病视网膜病; 细胞粘着分子; E-选择素; 免疫组织化学

中图分类号:R587.26 R446 R771.3

Expression of E-selectin of adhesive molecule in retina of rats with diabetic retinopathy PAN Lin, ZHOU Shui-ping, Guo Yan-ru, et al. Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Corresponding author: PAN Lin, Email: PanL2005@163.com

【Abstract】 Objectives To investigate the expression of E-selectin of adhesive molecule in microvessels in rats' retina with diabetic retinopathy (DR) at the early, middle, and late phase. **Methods** Ninety Sprague Dawley (SD) male rats were randomly divided into normal control group (6, 9, and 12 months subgroups with 10 rats in each subgroup) and streptozotocin (STZ) DR group (6, 9, 12 months subgroups with 20 rats in each subgroup). The DR model was set up by one-off celiac injection with STZ at a dose of 60 mg/kg. The rats were executed according to the different time points, and the eyeballs were removed and the digested stretched preparations of retinal microvessels were made. E-selectin of adhesive molecule in microvessels was revealed by EnVision immunohistochemical staining, and the expression of E-selectin in retinal microvessels and the morphological changes were analyzed and observed by Leica-Q550W computer image analytical equipment. The relativity between degree of impairment of DR and expression of E-selectin was detected. **Results** Morphological changes: hyperplasia of endotheliocytes and decreased pericytes were found in 6-month DR group; irregularly arranged retinal capillary networks, obviously thickened basilar membrane, many aggregation and adhesion of leucocytes to capillary walls, large areas of acellular capillaries, and opoptosis of endotheliocytes and pericytes were found in 9- and 12-month DR group. Results of quantitative analysis: there was no expression of E-selectin in normal control group, while expression of E-selectin with different degree in each DR group was found. There was significance difference among DR subgroups ($P < 0.01$), and the highest expression was found in 6- and 12-month DR group. **Conclusions** The expression of adhesive molecule in microvessels in rats' retina increases as the disease course of DR extends, and has positive correlation with the degree of impairment of microvessels in DR.

【Key word】 Diabetic retinopathy; Cell adhesion molecules; E-selectin; Immunohistochemistry

随着分子生物学技术发展,黏附分子 E 选择素在

糖尿病视网膜病变(DR)发生中的作用正受到广泛重视。我们通过形态学、免疫组织化学技术及计算机图象分析系统对早、中、晚期 DR 视网膜毛细血管黏附分子 E 选择素表达进行了研究。

作者单位:100029 北京中日友好医院临床医学研究所(潘琳、郭艳茹、彭俊云),中医糖尿病科(周水平)

通讯作者:潘琳,Email:PanL2005@163.com

1 材料和方法

1.1 动物模型建立及分组

180~220 g Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 90 只 (二级动物购自中国药品生物检定所), 随机分成 6、9、12 个月正常对照组, 每组 10 只大鼠; 和 DR6、9、12 个月 (即早、中、晚期) 组, 每组 20 只大鼠。DR 组用链尿佐菌素 (STZ) 按 60 mg/kg 的剂量腹腔一次性注射。3 d 后静脉采血, 测血糖大于 16.7 mmol/L 为建模成功。每个月检测 1 次血糖和体重, 总实验期共 12 个月。所有大鼠处死前均采血作血液流变学检测。

1.2 视网膜消化铺片

对照组及 DR 各病程组按期取眼球固定于 4% 多聚甲醛液, 4℃ 固定。以视盘为中心将眼球壁剪为三等份自来水洗 30 min, pH 值 7.4, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 浸泡 24 h, 剥离出视网膜层, 入 3% 胰酶 37℃ 消化 2 h, 将消化好的视网膜血管网裱贴于净洁的载玻片上, 自然干燥备染。

1.3 糖源 (PAS) 染色

将制备好的视网膜毛细血管铺片用蒸馏水洗 5 min, 1% 高碘酸 5 min, 蒸馏水 5 min, Schiff 试剂染色 15 min 水洗 10 min, Mayer 苏木素复染细胞核 3 min, 水洗 10 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, DPX 封片剂封片。

1.4 免疫组织化学染色

视网膜毛细血管铺片, 0.01 mmol/L, PBS 浸洗 10 min; 0.3% H₂O₂ 氧化 15 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 I 抗 (1:50 E 选择素) 4℃ 24 h; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 EnVision 试剂, 室温 1 h; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 0.05% 二氨基联苯氨 (DAB)-0.03% H₂O₂ 显色 3 min。空白对照: 用 PBS 替代 I 抗; 阴性对照: 用大鼠血清替代 I 抗。免疫组织化学试剂均为丹麦 DAKO 公司产品。

1.5 计算机图像分析

用 LEICA-Q55OW 计算机图像分析系统, 定量测定 E 选择素表达的面积和平均吸光度 [A, 旧称光密度 (OD)] 值分析 E 选择素在视网膜毛细血管在中含量表达。

1.6 血液流变学检查

每只大鼠取 4 ml 抗凝血, 送本院血液流变研究室检查血液粘稠度。

1.7 统计学处理

DR 各病程组 E 选择素含量表达计算机图像定量测定, 每个视野 E 选择素表达的面积和平均 A 值为非

正态分布, 测定值以均值和均值的 4 分位数范围表示, 用 SPSS10.0 统计软件分析, 用独立样本的 *t* 检验分析比较各组每个视野 E 选择素表达的面积和平均 A 值。

2 结果

2.1 视网膜毛细血管铺片形态观察结果

对照组视网膜血管分布规则, 后极部血管排列较致密, 周边部较疏松。动脉壁厚, 静脉壁薄, 动静脉之间毛细血管网分布规则; 周细胞核圆形或三角形染色较深; 内皮细胞核椭圆形或梭形, 染色较浅, 内皮细胞与周细胞比例大约 1:1。DR 6 个月组: 周细胞凋亡, 周细胞减少, 内皮细胞增生 (图 1), 部份区域毛细血管管径粗细不一, 基底膜增厚; DR 9、12 个月组: 毛细血管网排列紊乱, 无细胞毛细血管形成, 基底膜明显增厚深染, 毛细血管腔内有较多白细胞粘附聚集, 周细胞内皮细胞凋亡, 大面积无细胞血管形成 (图 2~4)。

2.2 E 选择素含量表达结果

对照组各月龄大鼠视网膜毛细血管 E 选择素均呈阴性表达 (图 5)。DR 6 个月组: 视网膜毛细血管部分区域 E 选择素阳性, 毛细血管壁见清晰、着染深浅不一的浅棕黄色阳性颗粒沉着 (图 6)。DR 9、12 个月组: 视网膜毛细血管 E 选择素表达较多, 血管壁阳性颗粒呈深棕黄色着染, 以晚期 DR 着染更深 (图 7, 8)。空白阴性对照组均为阴性。

2.3 计算机图像定量分析结果

每个视野 E 选择素表达的面积: DR 6、9 个月组相比差异无统计学意义 ($t = -0.347, P = 0.729$), DR 6、9、12 个月组表达面积均较正常组显著增多 ($t = 12.961, 10.229, 8.290; P$ 均 < 0.001), DR 12 个月组显著多于 9 个月组 ($t = 3.711, P < 0.001$)。

每个视野 E 选择素表达的平均 A 值: DR 6、9、12 个月组均较对照组 A 值高 ($t = 8.141, 11.504, 16.436; P$ 均 < 0.001), DR 6、9、12 个月组 A 值呈递增情况 (9、6 个月组: $t = 5.144; 12、9$ 个月组: $t = 3.409; 12、6$ 个月组: $t = 9.312; DR 6、9、12$ 个月组 P 均 < 0.001) (表 1)。

表 1 各组 E 选择素含量

组别	视野数	面积 (μm ²)	A 值
对照组	84	563 807.22	0.05
DR 6 个月组	84	1 142 924.25	0.08
DR 9 个月组	84	1 162 731.29	0.11
DR 12 个月组	84	1 679 090.63	0.14

2.4 血液流变学结果

DR 6、9、12 个月模型组红细胞压积、全血黏度、血

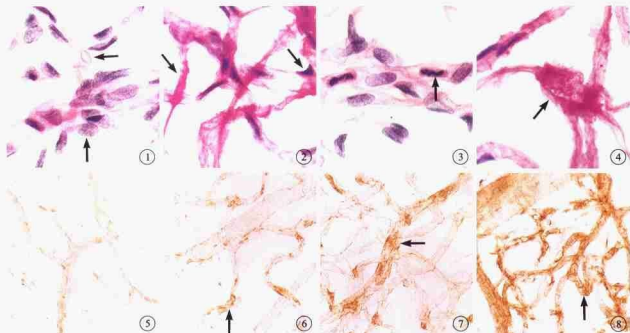


图 1 DR 6 个月组大鼠视网膜光学显微镜像。毛细血管内皮细胞增生, 周细胞凋亡(黑箭) PAS $\times 1000$ 图 2 DR 9 个月组大鼠视网膜光学显微镜像。视网膜毛细血管内皮细胞及周细胞减少, 血管闭塞管壁增厚深染(黑箭) PAS $\times 1000$ 图 3 DR 12 个月组大鼠视网膜光学显微镜像。白细胞粘附, 集于毛细血管壁(黑箭) PAS $\times 1000$ 图 4 DR 12 个月组大鼠视网膜光学显微镜像。毛细血管内皮细胞, 周细胞凋亡消失, 无细胞毛细血管形成(黑箭) PAS $\times 1000$ 图 5 对照组大鼠视网膜光学显微镜像。E 选择素表达阴性。免疫组织化学染色 $\times 400$ 图 6 DR 6 个月组大鼠视网膜光学显微镜像。视网膜毛细血管有浅棕黄色 E 选择素阳性颗粒表达(黑箭) 免疫组织化学染色 $\times 400$ 图 7 DR 9 个月组大鼠视网膜光学显微镜像。视网膜毛细血管有较多棕黄色 E 选择素阳性颗粒表达(黑箭) 免疫组织化学染色 $\times 400$ 图 8 DR 12 个月组大鼠视网膜光学显微镜像。E 选择素呈强阳性颗粒表达(黑箭) 免疫组织化学染色 $\times 400$

Fig. 1 Photograph of light microscope of retina in 6-month DR group. Proliferation of endothelial cells and apoptosis of pericytes (black arrow) PAS $\times 1000$ Fig. 2 Photograph of light microscope of retina in 9-month DR group. Decreased end arterial cells and pericytes occluded microvessels and thickened and darkly stained vascular wall (black arrow) PAS $\times 1000$ Fig. 3 Photograph of light microscope of retina in 12-month DR group. Leucocytes accumulated and adhered to the capillary walls (black arrow) PAS $\times 1000$ Fig. 4 Photograph of light microscope of retina in 12-month DR group. Opoptotic and disappeared endothelial cells and pericytes, acellular microvessels (black arrow) PAS $\times 1000$ Fig. 5 Photograph of light microscope of retina in 6-month DR group. Negative expression of E-selectin. Immunohistochemical staining $\times 400$ Fig. 6 Photograph of light microscope of retina in 6-month DR group. Positive expression of light brown-yellowish E selectin granules in retinal microvessels (black arrow) Immunohistochemical staining $\times 400$ Fig. 7 Photograph of light microscope of retina in 9-month DR group. More positive expression of light brown-yellowish E selectin granules in retinal microvessels (black arrow) Immunohistochemical staining $\times 400$ Fig. 8 Photograph of light microscope of retina in 12-month DR group. Strong positive expression of E-selectin granules (black arrow) Immunohistochemical staining $\times 400$

浆黏度等指标均显著高于 6、9、12 个月正常对照组 (P 均 < 0.05)。

3 讨论

E 选择素与 DR 关系正日益受到广泛关注, E 选择素是粘附分子选择素家族中的主要成员, 主要由毛细血管、后微静脉的内皮细胞分泌^[1,2]。正常血管内皮细胞不表达或低表达 E 选择素, 只有在内皮细胞被细胞因子或细菌内毒素等刺激后才分泌表达 E 选择素, 并通过识别特异性的碳水化合物基团在白细胞与内皮细胞的相互作用过程中发挥着十分重要的作用^[2]。DR 病理过程中白细胞粘附、聚集于血管壁并与内皮细胞相互作用, 损伤内皮细胞, 形成微血栓, 增加微血管通透性, 造成 DR 一系列微血管及组织损伤改变^[3,4]。我们在研究中发现, 与同期对照组相比较, DR 早、中、晚期 E 选择素表达面积、平均 A 值均有显著差异, 并随

着病程延长逐渐增高。毛细血管损伤以中、晚期 DR 最为严重; 血管腔内有较多白细胞粘附、聚集, 有的区域每个高倍视野可见 2~3 个白细胞, 而对照组很难找到白细胞。周细胞、内皮细胞凋亡, 大面积无细胞毛细血管形成, 基底膜明显增厚, PAS 深染。毛细血管闭塞, 小动脉硬化等多种形态学改变。模型组白细胞粘附、聚集现象与其血液变学血液黏度增高有一致性, 随着病程延长血液黏稠度增高, 白细胞粘附聚集现象增加。DR 血管内皮细胞损伤又促进了 E 选择素等粘附分子高表达^[3,4]。E 选择素高表达介导白细胞粘附作用增强, 促使血液黏稠度增加, 血流缓慢, 容易形成小栓子阻塞毛细血管, 造成微循环障碍。被细胞因子 (TNF- α 、FGF、bFGF) 活化的内皮细胞分泌 E 选择素介导白细胞与内皮细胞的相互作用, 导致内皮细胞损伤, 是血管闭塞、新生毛细血管、无细胞毛细血管形成的重要原因。毛细血管闭塞是 DR 中最严重的损伤, 也是 DR 致

盲最常见的原因。关于 DR 血管内皮细胞 E 选择素高表达的机制尚不十分清楚, 目前的研究认为与高血糖、非糖基化终末产物的沉积、细胞因子的刺激、胰岛素抵抗等诸多因素有关^[7,8]。通过本实验初步证实了 E 选择素高表达, 血液黏稠度增高, 与 DR 毛细血管损伤严重程度及病程延长均有相关性。为进一步探讨 DR 发病机制, 选择合理的治疗方案提供了实验依据。

4 参考文献

- 1 Agnes J, Victor WM, Hin sbergh V. Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2000, 49: 485-491.
- 2 卢建. 细胞粘附分子和细胞外基质的病理生理. 见: 吴其夏, 余应年, 卢建, 主编. 新编病理生理学. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 89, 97-98.
- 3 成军. 细胞外基质概论. 见: 成军, 编著. 细胞外基质的分子生物学与临床疾病. 北京: 北京医科大学出版社, 1999. 1-6.
- 4 Yang XD, Sara AM, Reina EM, et al. The role of cell adhesion molecules in the development of IDDM. *Diabetes*, 1996, 45: 705-710.
- 5 Nomura S, Shouzu A, Omoto S, et al. Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes. *Clin Exp Immunol*, 2000, 121: 437-443.
- 6 Elhadd TA, Kennedy G, McLaren M, et al. Elevated levels of soluble E-selectin in diabetic patients with severe symptomatic peripheral arterial occlusive disease requiring angioplasty: a possible role in diabetic vascular disease. *Int Angiol*, 1999, 19: 171-175.
- 7 Fasching P, Veitl M, Rohac M, et al. Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 4313-4317.
- 8 Ann M, Jill C, Osamu H, et al. Elevated plasma levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in diabetic patients with microalbuminuria: a marker of vascular dysfunction and progressive vascular disease. *Br J Haematol*, 1996, 92: 747-750.

(收稿日期: 2004-01-09)

(本文编辑: 朱敏)

· 消息 ·

福州东南眼科医院诚聘眼科各专业医师

福州东南眼科医院是福州市唯一的眼病专科医院, 医院面积 6 000 平方米。具备多功能、网络化和全开放格局的现代化眼科医疗机构。医院现有员工 170 余名, 分 9 个专业组: 白内障组、屈光眼肌组(近视、远视、散光、斜视、弱视)、青光眼组、角膜病组、眼底病组、眼外伤组、玻璃体视网膜组、美容整形组、眼预防保健组。我院拥有先进的眼科诊断和治疗设备, 全进口设备包括: 白内障超声乳化仪、准分子激光系统、眼前 YAG 激光、OCULIGHT SLX810 激光、佳能免散瞳眼底照相机、OCT、RTA、UBM、HRT- I、多台综合检查仪、蔡司、莱卡手术显微镜等等。医院为得到进一步的发展, 诚聘以下专业医师。

优先招聘专业: ①青光眼组; ②角膜病组。

医生应聘条件: 从事专业 5 年以上, 能够独立诊治本专业疾病, 掌握本专业发展动态, 有丰富临床经验者。

医院提供条件: ①医院提供住房; ②副主任医师以上者, 可随迁家属子女户口(临床经验丰富的高年资主治医师也可); ③年薪保底 10 万元人民币。

有意者请速将个人简历、相关证件复印件及近期照片邮寄至: 福州东南眼科医院, 联系人: 于海波。地址: 福州市西二环南路 35 号(邮政编码: 350002), 电话: 0591-83891766。医院其它专业组正在诚聘医师, 有意者请将相关资料邮寄至上述地址(长期有效)。

武汉艾格眼科医院招聘简章

武汉艾格眼科医院是湖北省唯一授权使用北京同仁医院商标进行特许加盟连锁经营的专业性眼科医院, 利用北京同仁医院的品牌优势及技术力量, 引进中美韩三国眼科界知名的专家加盟, 建成北京同仁医院的旗舰加盟店, 并形成了自己的专业特色。因业务发展, 诚邀有识之士加盟:

1 学科带头人: 10 年以上眼科临床经验, 副主任医师以上职称。

2 眼科医生: 8 年以上眼科临床经验, 主攻眼整形、眼底、准分子、小儿、角膜、眼肌等疾病。副主任医师以上职称或硕士以上学历者优先。

3 医技部主任: 五年以上同类职位工作经验, 熟练掌握眼科检查, 如 A/B 超、荧光造影、视野、电生理、UBM 等。

以上人才一经录用, 我院将提供极具竞争力的薪资待遇、完善的福利保障、广阔的发展空间以及全方位的培训进修机会, 有意者请将个人简历、个人资料、证件复印件邮寄或传真或 Email 至本院。地址: 武汉市发展大道 403 号办公室(邮政编码: 430019) 高先生, 电话: (027) 82606188, 82606288, 82612567, 82638687; 传真: 82624773; Email: dundaoggg@163.com, Http: www. aige010.com。