论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1232-04

诺帝抑制糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 的表达及意义

戴 超,卞修武, 史景泉 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要: 目的 检测诺帝对实验性糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达的影响,探讨诺帝抑制糖尿病视网膜病变的可能机制。**方法** 采用链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病模型,将动物随机分为糖尿病组(5 只×2)、诺帝治疗组(5 只×2),另取 10 只正常大鼠作为正常对照组,其中,诺帝治疗组在出现糖尿病表现后按 27 mg/kg 腹腔注射诺帝溶液(隔日 1 次),糖尿病组和正常对照组只在同期注射等量生理盐水。注射后 1、3 个月取视网膜制备切片,采用免疫组织化学方法半定量检测视网膜中 VEGF 和 iNOS 阳性反应及其分布。**结果** 正常对照组大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 呈极微弱的表达。1 个月时,糖尿病组 VEGF 和 iNOS 阳性反应增强,其阳性反应面积较正常对照组显著增加($P<0.01$);诺帝治疗组大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 阳性表达面积较糖尿病组明显减少($P<0.01$)。在 3 个月时,糖尿病组 VEGF 和 iNOS 阳性表达较 1 个月明显增加;诺帝治疗组较糖尿病组 VEGF 和 iNOS 表达明显减少,阳性表达面积在两组间有非常显著的差异($P<0.01$)。**结论** 诺帝明显抑制实验性糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 阳性反应,提示诺帝可能通过降低糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 的产生,从而缓解大鼠糖尿病视网膜病变。

关键词: 糖尿病视网膜病变;血管内皮细胞生长因子;一氧化氮合酶;诺帝
中图法分类号: R322.91; R587.202; R914.3 **文献标识码**: A

Nordy inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat retinas

DAI Chao, BIAN Xiu-wu, SHI Jing-quan (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects and significance of Nordy on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the retinas of diabetic rats. **Methods** Diabetic rats by streptozotocin were randomly divided into diabetes group (5 rats × 2) and Nordy treatment group (5 rats × 2). Another 10 normal rats were recruited as normal control group. The Nordy treatment group was injected 0.5% Nordy (27 mg/kg) while diabetes groups and normal control group were injected saline solution into peritoneal cavity once every other day. One month or 3 months later, 5 rats in each group were killed and the expression of VEGF and iNOS in the retinas were detected by immunohisochemistry. The average positive areas were measured and analyzed by computer aided video system. **Results** The expression of VEGF and iNOS in control group were extremely low. In 1 month, the expression of VEGF and iNOS in diabetic group increased and the average positive areas of VEGF and iNOS were significantly more than that of Nordy treatment group ($P<0.01$). In 3 months, the expression of VEGF and iNOS in diabetic group further increased and the average positive areas of VEGF and iNOS were remarkably more than that of Nordy treatment group ($P<0.01$). **Conclusion** Nordy injected intraperitoneally decreases the expression of VEGF and iNOS in retinas of diabetic rats so that Nordy partly suppresses the development of diabetic retinopathy.

Key words: diabetic retinopathy; vascular endothelial growth factor; inducible nitric oxide synthase; Nordy

有研究表明,在糖尿病时以血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)为主的促血管生长因子在视网膜过表达促进了糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的形成以及新生血管生成[1,2],降低 VEGF 的表达和阻断 VEGF 与其受体结合能明显抑制 DR 的形成和发展[3,4]。我们既往研究证实,去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目("863"计划)(2002AA001010)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2002AA001010)
作者简介:戴 超(1967-),男,四川省泸州市人,博士研究生,主治医师,主要从事糖尿病视网膜病变方面的研究。电话:(023)68765459
通讯作者:卞修武,电话:(023)68752247,E-mail: bianxiuwu@263.net
收稿日期:2005-03-09;**修回日期**:2005-05-15

具有抑制胶质瘤细胞产生 VEGF 的效应[5]。本研究旨在观察我们自行合成的 NDGA 类化合物诺帝(Nordy)对实验性糖尿病大鼠视网膜表达 VEGF 的影响以及诺帝能否抑制 iNOS 的产生，并探讨其可能意义及其机制。

1　材料与方法

1.1　动物模型

实验用封闭群雄性 Sprague Dawley (SD)大鼠，体质量 180～200 g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供，标准条件饲养，不限饮食。链脲佐菌素(streptozotocin，STZ，购自 Sigma 公司)，以 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(柠檬酸-柠檬酸三钠，pH 4.2)配制成 1% STZ 溶液，按 60 mg/kg 腹腔注射，注射后次日起用 SureStepTMPlus 血糖仪(美国 Lifescan 公司)每 2 周检查鼠尾血糖，以血糖≥17 mmol/L 者视为糖尿病大鼠，取材前重复测血糖 1 次。

1.2　动物分组、组织取材和制片

将糖尿病大鼠随机分为诺帝治疗组(10 只)和糖尿病组(10 只)，另取 10 只正常大鼠作为正常对照组。诺帝组以 0.9%生理盐水溶解的诺帝按 27 mg/kg 腹腔注射，隔日 1 次，糖尿病组和正常对照组腹腔注射等量生理盐水。各组大鼠分别于注射后 1 个月、3 个月用 2%戊巴比妥钠过量麻醉取材，经 10%中性缓冲甲醛固定，常规石蜡包埋、制片。

1.3　各组大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 表达的检测

采用免疫组织化学 EnVision 法，鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司，兔抗人 iNOS 多克隆抗体购自美国 Sanda Cruz 生物公司，EnVision + ™Systerm 检测及显色试剂盒购自 DAKO 公司，按说明书进行操作。主要步骤为：切片脱蜡、水化；3%过氧化氢-甲醇封闭内源性过氧化物酶，15 min；0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波热修复，15 min；正常山羊血清封闭，20 min；滴加 VEGF 一抗(1∶100)或 iNOS 一抗(1∶100)，4 ℃过夜；抗兔/或鼠 EnVision-辣根过氧化物酶复合物，40 min；以上各步骤间均以 0.01 mol/L PBS 缓冲液充分漂洗，DAB 显色，苏木精复染，常规梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。每次检测均以抗体稀释液代替一抗设为阴性对照，结果判定：以视网膜细胞胞浆内出现明确棕黄色为阳性反应。

1.4　计算机图像采集及分析

各组各时相点分别取 3 张切片，每张切片在光镜 × 200 放大条件下随机采集阳性染色最强的 5 个视野(即每只动物 15 帧测试图像)，输入计算机后应用 Image-Pro Plus 图像分析系统测定视网膜 VEGF 和 iNOS 阳性着色的平均面积。

1.5　统计学处理

计算机图像处理数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计学软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　各组大鼠视网膜 VEGF 表达的变化

光镜观察：在处理 1 个月时正常对照组仅见 1 只大鼠视网膜视细胞内节呈极微弱的 VEGF 细颗粒状阳性着色；而糖尿病组大鼠视网膜均可见 VEGF 表达，主要位于视细胞全层及视网膜色素上皮层，呈弱阳性；诺帝处理组仅有 2 只大鼠视网膜视细胞内节可检测到较弱的 VEGF 阳性棕黄色反应，另外 3 只则未检测到 VEGF 表达信号。在 3 个月时：糖尿病组大鼠视网膜 VEGF 表达增强，阳性信号贯穿于视网膜全层，尤以视细胞层及色素上皮层表现最为显著，呈深棕色强阳性反应；诺帝处理组所有大鼠的视网膜均可见 VEGF 表达，主要在视细胞内节区呈中等强度的阳性着色，但阳性反应程度及表达区域较同时期糖尿病组显著减少(图 1)。



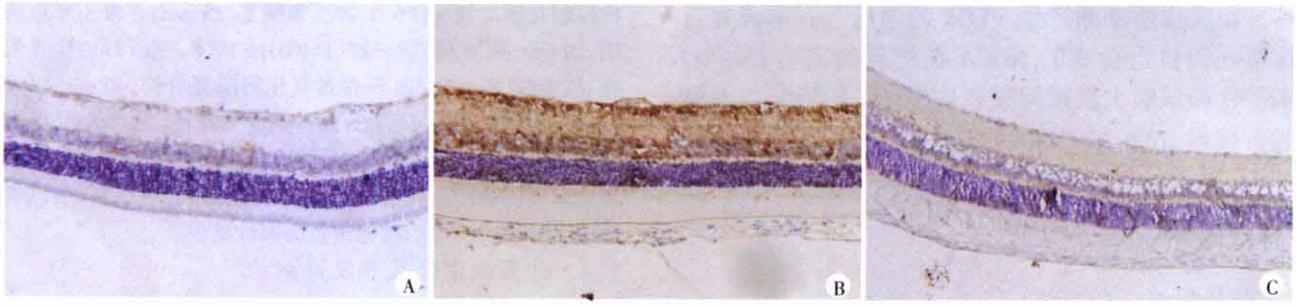
A: Normal control group (3 months); B: Diabetes group (3 months); C: Nordy treatment group (3 months)

图 1　各组大鼠视网膜 VEGF 的表达　(EnVision × 200)

Fig 1　VEGF expression in the rat retinas of different groups　(EnVision × 200)

2.2　各组大鼠视网膜 iNOS 表达的变化

光镜观察：在处理后 1、3 个月两时相点，正常对照组仅有 1～2 只大鼠视网膜可见极微弱的 iNOS 细颗粒状表达，其余大鼠的视网膜均未检测到 iNOS 阳性信号；糖尿病组大鼠 iNOS 主要表达于视网膜的内核层及内界膜，呈较强阳性反应，在 3 个月时，iNOS 阳性表达显著增强，呈弥漫的深棕色强阳性反应，在视细胞层和外核层也可见颗粒状阳性着色；诺帝处理组所有大鼠在处理后 1 个月时可见 iNOS 阳性反应信号散在分布于视网膜，呈细颗粒状，反应较弱；后期 iNOS 阳性表达较 1 个月时有所增强，但与同期糖尿病 3 个月组相比，iNOS 阳性表达的程度和反应区域显著减少，阳性着色降低的部位也主要发生在内界膜和外核层之间(图 2)。



A: Normal control group (3 months); B: Diabetes group (3 months); C: Nordy treatment group (3 months)

图 2 各组大鼠视网膜 iNOS 的表达 (EnVision × 200)

Fig 2 iNOS expression in the rat retinas of different groups (EnVision × 200)

2.3 计算机图像定量分析结果

见表 1、2,在处理后 1 个月和 3 个月两时相点,糖尿病组大鼠视网膜 VEGF、iNOS 的阳性反应面积均远远高于同时期正常对照组和诺帝治疗组的相应阳性面积,差异具有非常显著性统计学意义($P<0.01$),而处理后期(3 个月时)糖尿病组大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 的阳性反应面积均较处理早期(1 个月时)明显增加($P<0.01$);诺帝处理后大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 的表达较糖尿病大鼠者显著降低,且随着处理时间的延长,同组大鼠视网膜 VEGF、iNOS 的阳性反应面积均有极为明显的下降($P<0.01$)。

表 1 大鼠视网膜 VEGF 阳性染色平均面积(μm^2, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Average area of positive expression of VEGF in rat retinas (μm^2, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Group	1 month	3 months
Control	3.6637 ± 0.6109 #	3.6320 ± 0.0.5080 #
Diabetes	11.7595 ± 0.5079	22.7456 ± 0.2245
Nordy treatment	3.8217 ± 0.5802 *#	9.5986 ± 0.2308 #

*: $P<0.05$, *vs* control group; #: $P<0.01$, *vs* diabetes group

表 2 大鼠视网膜 iNOS 阳性染色平均面积(μm^2, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Average area of positive expression of iNOS in rat retinas (μm^2, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Group	1 month	3 months
Control	1.4919 ± 0.2475 #	1.4323 ± 0.2395 #
Diabetes	6.9175 ± 1.0402	13.1789 ± 1.6763
Nordy treatment	2.6244 ± 0.7871 #	5.7278 ± 0.1275 #

#: $P<0.01$, *vs* diabetes group

3 讨论

注射 STZ 诱发大鼠糖尿病是目前研究 DR 病理改变、发病机制和药物治疗性干预的最常用动物模型之一。该动物模型能复制出人类 DR 的绝大多数病理改变。人和动物糖尿病时视网膜血管通透性增加和血液流变学改变是 DR 的早期和主要病变。VEGF 作为一种强烈的血管通透性因子和血管内皮细胞有丝分裂原,在 DR 的发生发展过程中起着至关重要的作用[1,2]。另外,在糖尿病人和动物的视网膜均能检测到 iNOS 过表达,且在出现临床 DR 前,iNOS 促进早期的视网膜氧合功能不全[6]。iNOS 在视网膜的过表达可引起视网膜血液流变学改变、毛细血管通透性增加、血-视网膜屏障损害、视网膜神经元细胞凋亡等;促进 DR 的形成。降低 iNOS 的产生对 DR 具有抑制作用[7]。糖尿病时视网膜过表达 VEGF 和 iNOS,二者能相互作用使它们的效应不断放大,促进 DR 的形成和进展。

本研究表明,STZ 诱导的糖尿病大鼠在早期(1 个月)即可出现 VEGF 在视网膜的过表达,随着病程的延长,VEGF 过表达增强,在糖尿病 3 个月时,VEGF 阳性表达弥漫于全视网膜,表明 VEGF 参与了 STZ 诱导的大鼠 DR 的演进。研究表明[8],糖尿病时抑制 VEGF 在视网膜的产生可有效地降低其渗出,缓解 DR。我们采用我室合成诺帝按 27 mg/kg 腹腔注射,可明显地降低 VEGF 在糖尿病大鼠视网膜的过表达,提示诺帝能降低糖尿病大鼠视网膜 VEGF 合成增加,进而可能在降低视网膜通透性、抑制血管内皮增生等方面具有一定的作用,从而缓解 DR。另外,视网膜色素上皮和视细胞层的血供来源于脉络膜,且代谢活跃,对缺氧十分敏感。我们发现 STZ 诱导的糖尿病大鼠视网膜 VEGF 过表达主要集中在这些部位,而诺帝处理可明显地抑制 VEGF 在上述部位的过表达。本研究结果显示,在 STZ 诱导的糖尿病大鼠 1 个月时 iNOS 在视网膜的表达增强,到 3 个月时,iNOS 在视网膜的表达进一步增加,提示 iNOS 在视网膜的过表达与糖尿病的病程有关,Takeda 等[9]的研究也证明了这一结论。我们采用诺帝 27 mg/kg 腹腔注射,可明显地降低 iNOS 在糖尿病大鼠视网膜的表达,提示诺帝能通过抑制 iNOS 的产生对糖尿病大鼠视网膜起保护作用。总之,应用诺帝处理可降低 VEGF 和 iNOS 在糖尿病大鼠视网膜的过表达,破坏 VEGF 和 iNOS 相互促进形成的恶性循环,从而可能抑制糖尿病所致的视网膜血液流变学改变和维持血-视网膜屏障的稳定以维持视网膜形态和功能的稳定。

诺帝是我室合成的特异性脂氧化酶抑制剂，作为一种强力的抗氧化剂，能抑制胶质瘤细胞表达 VEGF 及其受体 KDR[5]。而抗氧化治疗也是糖尿病视网膜病变的治疗措施之一[10]，我们将诺帝用于 DR 的治疗发现，诺帝可在一定程度上缓解 DR。我们认为这种抑制效应可能主要与诺帝的抗氧化作用有关。

参考文献：

[1] Takagi H, Oh H, Otani A, *et al*. Molecular mechanisms of retinal neovascularization in diabetic retinopathy [J]. International Congress Series, 2004,1262: 160 - 163.

[2] Cukiernik M, Hileeto D, Evans T, *et al*. Vascular endothelial growth factor in diabetes induced early retinal abnormalities [J]. Diabetes Res Clin Prac,2004,65(3): 197 - 208.

[3] Scaria A, Pechan P, Lukason M, *et al*. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular gene delivery of soluble VEGF receptors [J]. Mol Ther, 2004,9(Suppl 1):S198.

[4] Marano R J, Wimmer N, Kearns P S, *et al*. Inhibition of in vitro VEGF expression and choroidal neovascularization by synthetic dendrimer peptide mediated delivery of a sense oligonucleotide[J]. Exp Eye Res, 2004, 79 (4): 525 - 535.

[5] 孙慧勤，陈意生，史景泉，等. 去甲二氢愈创木酸对 VEGF 及其受体 KDR 基因表达影响的研究[J]. 第三军医大学学报，2001,23 (3): 268 - 271.

[6] Berkowitz B A, Luan H, Gupta R R, *et al*. Regulation of the early subnormal retinal oxygenation response in experimental diabetes by inducible nitric oxide synthase[J]. Diabetes, 2004,53(1): 173 - 178.

[7] Cukiernik M, Hileeto D, Downey D, *et al*. The role of the sodium hydrogen exchanger-1 in mediating diabetes-induced changes in the retina[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2004,20(1): 61 - 71.

[8] Ayalasomayajula S P, Kompella U B. Celecoxib, a selective cyclooxygenase - 2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin - induced diabetic rat model[J]. Eur J Pharmcol, 2003,458 (3) : 283 - 289.

[9] Takeda M, Mori F, Yoshida A, *et al*. Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats[J]. Diabetologia, 2001,44(8): 1043 - 1050.

[10] Rota R, Chiavaroli C, Garay R P, *et al*. Reduction of retinal albumin leakage by the antioxidant calcium dobesilate in streptozotocin - diabetic rats [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 495(2): 217 - 224.

（编辑　龙　亮）

文章编号：1000-5404(2005)12-1235-01

个案与短篇

内镜下经鼻眶减压术对鼻通气功能的影响

Effect of endoscopic transnasal orbital decompression on nasal airway

张龙城，钟海林，林文彪，蒋　静　（解放军第 303 医院耳鼻咽喉科，南宁 530021）

内镜下经鼻眶减压手术治疗眼球突出，可取得良好的效果[1]，但该手术对鼻通气功能有无影响，国内外少见报道。冷镜法是一种用于研究鼻呼吸生理和评价鼻腔手术效益的客观方法[2]。为探讨该手术对鼻通气功能的影响，我们对 16 例甲状腺机能障碍性眶病患者手术前后鼻通气情况应用冷镜法进行测试，报告如下。

1　材料与方法

1.1　测试对象

对照组：16 例，男女各 8 例，平均 29 岁，均无鼻病史，近 1 个月内无上呼吸道感染病史，鼻部检查无解剖异常。

手术组：我院耳鼻咽喉科行内镜下鼻眶减压术治疗的 16 例(32 眼)甲状腺机能障碍性眶病患者，男 7 例(14 眼)，女 9 例(18 眼)，平均 31 岁。

1.2　测试方法

取一块面积 30 cm × 20 cm、厚 3 mm、表面镀铬的不锈钢板，以一侧长边为基底线，以此线中点为中心，在板面上各距 1 cm 刻画出半圆形弧线并标上相应数字。

受检者处于室温 20 ~ 30 ℃，湿度 45% ~ 55% 的环境中，静坐 10 min 后，将冷镜板水平置于受检者鼻孔下方，使基底线中点和鼻小柱接触，嘱受检者闭嘴，用鼻平静呼吸 5 次，冷镜板上明显出现呼出蒸气的冷凝图影，立即用色笔在板面上勾画出其轮廓，用分规测出影长 a 线，并从 a 线中点测量出影宽 b 线，按公式 $S = a \times b \times \pi \div 4$ 算出影面积的近似值[2]。受检者休息 10 min 后再测 1 次 S 值，取前后两次平均数为测量值。手术组患者分别于术前、术后 3 个月和术后 1 年作冷镜法检测。

1.3　统计学处理

所有数据采用 SPSS for Windows Version 8.0 进行配对 t 检验。

2　结果

术后 3 个月内鼻-鼻窦粘膜均有一定程度水肿、囊泡形成和增生，术腔内有干痂形成及粘性分泌物附着，患者有鼻塞感

（下转 1239 页）

作者简介：张龙城(1964 -)，男，湖北省武穴市人，主任医师，主要从事耳鼻咽喉-头颈外科临床方面的研究，发表论文 10 篇。电话：(0771) 2870160

收稿日期：2004-11-22；修回日期：2005-04-04