

管内皮细胞同时也存在损伤。缺血再灌注后,机体可产生大量的氧自由基及钙超载等,对各种组织细胞都有损伤作用。失血性休克后采用参附复苏既能保持一定的抗凝能力,防止血栓形成,又不会引起出血,在改善微循环,保护内皮细胞,减少缺血再灌注损伤方面优于林格液。

综上所述,创伤失血性休克后大鼠肾脏血管内皮细胞损伤,参附注射液可以从基因水平影响肾脏组织 TM 及 EPCRmRNA 的表达,保护内皮细胞,改善微循环。本实验结果具有一定的临床意义,为祖国传统中药参附注射液在治疗休克的临床应用提供理论依据,值得进一步深入研究。

参考文献

- 1 Martini WZ, Chinkes DL, Sondeen J, *et al.* Effects of hemorrhagic and lactated ringer's resuscitation on coagulation and fibrinogen metabolism in swine. *Shock*. 2006, 26(4):396-401
- 2 Esmon CT, Xn J, Gu JM, *et al.* Endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost*, 1999, 82:251
- 3 Waugh JM, Yuksel E, Li J. Local overexpression of thrombomodulin for in vivo prevention of arterial thrombosis in a rabbit model. *Circ Res*, 1999, 84:84
- 4 Sharma P, Walsh KT, Kerr - Knott KA, *et al.* Pyruvate modulates hepatic mitochondrial functions and reduces apoptosis indicators during hemorrhagic shock in rats. *Anesthesiology*. 2005, 103(1):65-73
- 5 Lu Q, Xu DZ, Davidson MT, *et al.* Hemorrhagic shock induces endo-

thelial cell apoptosis, which is mediated by factors contained in mesenteric lymph. *Crit Care Med*. 2004, 32(12):2464-2470

- 6 Savoye G, Tamion F, Richard V, *et al.* Hemorrhagic shock resuscitation affects early and selective mesenteric artery endothelial function through a free radical - dependent mechanism. *Shock*. 2005, 23(5):411-416
- 7 Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombincatalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(4):2249-2252
- 8 Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/ activated protein C receptor. *J Biol Chem*, 1994, 269:26486-26491
- 9 Esmon CT. Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit Care Med*, 2004, 32:S298-S301
- 10 Nan B, Lin P, Lumsden A B, *et al.* Effects of TNF - α and curcumin on the expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells. *Thromb Res*, 2005, 115(5):417-426
- 11 杨进国, 刘先义, 杜大平. 参附注射液对败血性休克大鼠心肌损伤的影响. *武汉大学学报(医学版)*, 2005, 26(2):169-171
- 12 夏中元, 王龙, 陈雪君. 参附注射液对休克复苏时肠黏膜保护作用机制的实验研究. *中国急救医学*, 2001, 21(8):447-448
- 13 孟庆涛, 夏中元, 贾一帆, 等. 参附注射液对大鼠肠缺血再灌注时肠上皮细胞 Caspase-3, Bcl-2 基因表达的影响. *武汉大学学报(医学版)*, 2004, 25(3):275-278

(收稿:2009-08-24)

胰岛素对糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 Ang-2 表达的影响

马萍萍 王玉萍 吴 炎 李 斌 林少芬 唐仕波

摘 要 目的 观察胰岛素治疗对糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素-2(angiotensin-2, Ang-2)表达的影响,探讨胰岛素在糖尿病视网膜病变发生发展中的作用。**方法** 链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病大鼠动物模型,成模后经胰岛素治疗控制血糖,随机分为糖尿病血糖严格控制组、糖尿病血糖非严格控制组、糖尿病组和正常对照组。应用免疫荧光组织化学染色法检测大鼠视网膜组织 VEGF、Ang-2 的表达,用计算机-图像分析软件对 VEGF、Ang-2 免疫荧光强度进行半定量分析。**结果** 与正常对照组比较,糖尿病组大鼠视网膜 VEGF、Ang-2 平均荧光强度分别增加了 2.38 倍和 2.41 倍($P < 0.05$)。与糖尿病组比较,血糖严格控制组大鼠视网膜 VEGF、Ang-2 的表达分别下降了 1.47 倍和 1.51 倍($P < 0.05$),而血糖非严格控制组 VEGF、Ang-2 的表达无明显下降($P > 0.05$)。**结论** 胰岛素治疗严格控制血糖可降低糖尿病大鼠视网膜 VEGF、Ang-2 的表达,对糖尿病视网膜病变的发生发展有保护作用。

基金项目:深圳市科技计划项目(200404048)

作者单位:523018 广东省东莞市人民医院眼科(马萍萍);518020 广东省深圳市人民医院内分泌科(王玉萍、吴炎);510060 广州,中山大学中山眼科中心(李斌、林少芬、唐仕波)

通讯作者:唐仕波,电子信箱:shibotang@yahoo.com

关键词 糖尿病视网膜病变 胰岛素 血管内皮细胞生长因子 血管生成素-2

The Effect of Insulin Therapy on Expression of VEGF and Ang-2 in Diabetic Rat Retina. Ma Pingping, Wang Yulin, Wu Yan, Li Bin, Lin Shaofen, Tang Shibo. DongGuan People's Hospital, Guangdong 523000, China

Abstract Objective To observe the changes of VEGF and Ang-2 expression in streptozotocin (STZ) - induced diabetic rat retina after insulin therapy and explore possible roles of insulin in the development of diabetic retinopathy. **Methods** Diabetes was induced in 8-week-old male wistar rats by a single intraperitoneal injection of STZ. After three weeks, animals were randomly divided into four groups: (1) diabetic rats received intensive insulin therapy for 20 days; (2) diabetic rats received unregular insulin therapy, which caused the abrupt fluctuation of glycemic level; (3) diabetic control rats; and (4) normal control rats. After treatment, the animals were sacrificed with an overdose of anesthesia, and the eyes were enucleated and fixed in 4% paraformaldehyde immediately. Paraffin sections of retina were prepared. Expression of VEGF and Ang-2 was assessed by immunofluorescence stain and images analysis. **Results** Quantitative analysis showed VEGF and Ang-2 protein expression was increased by 2.38-fold and 2.41-fold in diabetic rats retinas as compared to non-diabetic rats retinas respectively ($P < 0.05$). The expression of VEGF and Ang-2 was decreased by 1.47-fold and 1.51-fold in diabetic rats which received intensive therapy respectively ($P < 0.05$). And there were no significant decreases in VEGF and Ang-2 expression in diabetic rats which received unregular insulin therapy ($P > 0.05$). **Conclusion** Intensive insulin therapy could decrease VEGF and Ang-2 expression in retina and has protective effect on diabetic retinopathy in STZ-diabetic rats.

Key words Diabetic retinopathy; Insulin; Vascular endothelial growth factor; Angiopoietin-2

糖尿病视网膜病变是糖尿病最常见的微血管并发症,是严重的新生血管性致盲眼病。病程长、血糖控制不良是公认的视网膜病变的两大独立风险因子,胰岛素是目前临床上降糖效果最佳、应用最广泛的药物,但近几年有研究者指出胰岛素具有上调视网膜 VEGF、HIF-1 等因子表达,加重糖尿病患者血-视网膜屏障破坏,从而有促进糖尿病视网膜病变发生发展的作用^[1]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素-2(angiotensin-2, Ang-2)是糖尿病视网膜病变新生血管生长机制中发挥重要作用的两个生长因子。本研究通过糖尿病大鼠动物模型,观察胰岛素严格控制血糖对视网膜 VEGF、Ang-2 表达的影响,探讨胰岛素在糖尿病视网膜病变发生发展的作用。

材料与方法

1. 糖尿病大鼠动物模型的制作:8 周龄雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 180~200g。随机分为正常对照组、糖尿病组、糖尿病血糖严格控制组、糖尿病血糖非严格控制组共 4 组,每组 10 只大鼠。造模前,大鼠禁食、水自由饮用过夜,第 2 天腹腔内注射链尿佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma 公司),用柠檬酸缓冲液(pH 值 4.5)配成 10mg/ml(或 1%)溶液,经微孔滤膜(直径 0.22 μ m)过滤灭菌,按 60mg/kg 左下腹腔注射,正常对照组腹腔内注射等量 0.1mol/L 的柠檬酸缓冲液(pH 值 4.5)。72h 后剪尾采血,用罗康全活力型血糖监测仪(德国罗氏诊断有限公司)测血糖。空腹血糖 16.7mmol/L(300mg/dl)以上,尿量及饮水明显增多、体重下降者列入糖尿病实验对象。

2. 糖尿病大鼠血糖的控制:腹腔注射 STZ 3 周后,对糖尿

病血糖严格控制组大鼠,用 Novolin 30R(40U/ml,丹麦诺和德公司)胰岛素 4~6U/(kg·d),每日下午 5~6 时皮下注射,根据血糖水平每天调整胰岛素用量,使空腹血糖控制在 6mmol/L $\leq$ FBG $\leq$ 9mmol/L,治疗 20 天。而血糖非严格控制组大鼠,胰岛素治疗的时间、剂量不规律,使血糖处于波动状态。

3. 视网膜组织 VEGF 和 Ang-2 免疫荧光组织化学染色:10%水合氯醛按 0.4ml/0.1kg 体重腹腔注射麻醉动物后,迅速摘除眼球,立即放入预冷的 4%多聚甲醛固定液中,30min 后去除眼前节组织,继续固定 24h,制作石蜡切片。免疫荧光法检测视网膜 VEGF、Ang-2 的表达。多克隆兔抗大鼠 VEGF、Ang-2 抗体,ABC(荧光 Cy3)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。实验操作步骤按照试剂盒说明书进行。

4. 图像分析和统计学处理:每只动物取 5 张视网膜切片,每张切片取 3 个视野,所取部位相同。计算单位面积 VEGF、Ang-2 的平均荧光强度,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 单因素方差分析法(ANOVA)对数据进行分析,以 $P < 0.05$ 表示差别具有显著性意义。

结 果

1. 各组大鼠的体重及血糖:糖尿病组及血糖非严格控制组大鼠体重明显下降,而血糖严格控制组大鼠的体重下降得到明显的控制。正常对照组大鼠血糖在 5.2~6.7mmol/L 之间,糖尿病组大鼠血糖均 $\geq$ 23.7mmol/L,血糖严格控制组大鼠血糖控制在 6~9mmol/L 之间,而血糖非严格控制组大鼠血糖波动在 11.6~33.1mmol/L 之间。

2. 大鼠视网膜 VEGF、Ang-2 的免疫荧光组织化学染色:VEGF 和 Ang-2 在视网膜的表达定位是

一致的,在正常大鼠视网膜色素上皮层、外核层、外丛状层、内核层、神经节细胞层及血管壁均有表达。与正常大鼠视网膜平均荧光强度比较,糖尿病组、血糖非严格控制组 VEGF 和 Ang-2 的荧光强度均明显增强,尤以内核层、神经节细胞层增强明显,而血糖严格控制组较糖尿病组大鼠视网膜组织的荧光强度明显下降($P < 0.05$),血糖非严格控制组的表达与糖尿病组间无统计学差异($P_{\text{VEGF}} = 0.987, P_{\text{Ang-2}} = 0.936$)。VEGF、Ang-2 的平均荧光强度详见图 1。

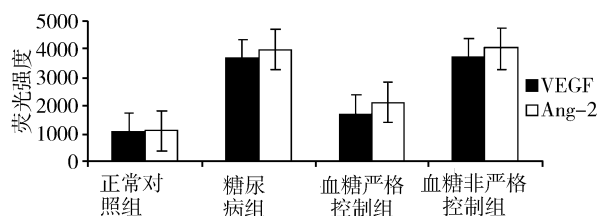


图 1 大鼠视网膜 VEGF 和 Ang-2 平均免疫荧光强度

讨 论

胰岛素这种对糖尿病视网膜病变的双重作用给我们的临床治疗带来难题,如何安全地使用胰岛素?

我们对病程 3 周的糖尿病大鼠用胰岛素控制血糖 20 天,发现经胰岛素治疗严格控制血糖后的大鼠视网膜 VEGF 和 Ang-2 的表达显著下降,同样经胰岛素治疗但血糖处于波动状态的大鼠视网膜 VEGF 和 Ang-2 的表达却无明显下降,这表明胰岛素严格控制血糖接近正常水平可以阻止或延缓糖尿病视网膜病变的进展。这与 Kakizawa H 等的报道是一致的,他们认为血糖控制不良的糖尿病患者血浆中 VEGF 的表达上调,促进血管并发症的发生,控制血糖后可改善患者血浆中 VEGF 的表达,且对糖尿病患者的微血管具有保护作用^[2]。美国糖尿病控制及并发症试验和糖尿病干预及并发症(DCCT/EDIC)研究小组总结了有 30 年病程的 1 型糖尿病患者经胰岛素治疗后视网膜病变的发生率,结果显示接受胰岛素强化治疗(即每天胰岛素注射 3 次或以上或使用胰岛素泵控制血糖,血糖控制至接近正常)的患者,增生性视网膜病变的累计发病率为 21%,其中致盲的患者比例不到 1%。而接受胰岛素传统治疗(即每天胰岛素注射 1~2 次,没有设定目标血糖值)的患者,增生

性视网膜病变的累计发生率为 50%^[3]。以上研究均有力地支持我们的研究结果即胰岛素治疗严格控制血糖是可以减少糖尿病视网膜病变的发生率、延缓病程进展的。

胰岛素控制血糖的时间长短对视网膜病变的发展是有影响的。美国 DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) 小组研究后发现糖尿病视网膜病变患者均在接受治疗 3 年后才开始表现出强化治疗对视网膜病变的好处^[4]。另外,对代谢不良的患者快速控制血糖是有害的,强化治疗短期内导致视网膜病变恶化可能与快速控制血糖引起全身微循环障碍有关。

总之,长期高血糖持续性地破坏视网膜血管内皮细胞、壁内周细胞,视网膜组织严重缺氧,引起作用于血管的一些生长因子(VEGF、Ang-2 等)表达上调,这种作用比胰岛素上调 VEGF、Ang-2 的作用更持久,对视网膜的损伤更大,从最终的治疗效果来看,胰岛素长期控制血糖且维持稳定对糖尿病视网膜病变是有益的,但需要指出的是,利用胰岛素控制血糖不宜过急,应逐渐降低至正常水平,且长期维持稳定状态,这应该是临床上安全使用胰岛素的方法。

参考文献

- 1 Poulaki V, Qin W, Jousseaume AM, *et al.* Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF. *J Clin Invest*, 2002, 109(6):805-815
- 2 Kakizawa H, Itoh M, Itoh Y, *et al.* The relationship between glycemic control and plasma vascular endothelial growth factor and endothelin-1 concentration in diabetic patients. *Metabolism*, 2004, 53(5):550-555
- 3 Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Research Group, Nathan DM, Zinman B, Cleary PA, *et al.* Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). *Arch Intern Med*, 2009, 169(14):1307-1316
- 4 Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications Trial. *Ophthalmology*, 1995, 102(4):647-661

(收稿:2009-10-26)

(修回:2009-12-03)