

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:32 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.018.html

糖尿病大鼠病程不同阶段角膜 上皮紧密连接蛋白 claudin-1 表达的变化

倪梦圆, 廖荣丰

摘要 目的 动态观察不同阶段糖尿病(DM)大鼠和正常(NC)大鼠角膜上皮紧密连接蛋白 claudin-1 的表达变化。方法 雄性SD大鼠80只,随机均等分为DM组和NC组,以高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立II型DM模型,分别于造模后4周、8周、16周处死大鼠,取角膜组织;以HE染色法比较DM组和NC组大鼠角膜形态学变化,以免疫荧光染色和Western blot法检测大鼠角膜上皮紧密连接蛋白 claudin-1 的表达。结果 造模后8周和16周,DM组大鼠角膜上皮细胞排列疏松,基质层水肿明显。造模后16周DM组和NC组大鼠角膜上皮 claudin-1 蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$),在造模后4周和8周表达差异无统计学意义。结论 随DM病程延长,II型DM可能导致大鼠角膜上皮紧密连接蛋白 claudin-1 表达降低。

关键词 糖尿病;角膜上皮;紧密连接蛋白;免疫荧光染色;Western blot

中图分类号 R 772.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0961-04

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种以糖代谢紊乱为特征的全身代谢性疾病,患病率逐年提高。引起眼部多种并发症,并成为致盲的主要原因^[1]。近年来,DM引起的角膜改变逐渐引起人们的重视。角膜上皮病变主要包括持续性上皮缺损、角膜知觉下降、上皮再生迟缓等^[2],而紧密连接作为角膜上皮细胞间最为重要的一种方式,在维持上皮功能中起着关键作用^[3]。然而,DM眼表改变是否对角膜上皮连接存在影响目前尚不明确。该实验通过建立II型DM大鼠模型,检测不同阶段标志性紧密连接蛋白 claudin-1 的表达,探讨DM眼表改变对角膜上皮紧密连接的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

2016-04-14 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金(编号:KJ2012A166);安徽省自然科学基金(编号:1408085MH191)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院眼科,合肥 230032

作者简介:倪梦圆,女,硕士研究生;

廖荣丰,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: liaorfyf@126.com

1.1.1 实验动物 健康成年雄性SD大鼠80只,约200g,由安徽医科大学实验动物中心提供,发育正常,使用前检查无眼部疾患。随机均等分为正常(normal control, NC)组和DM组。

1.1.2 主要试剂和仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司);兔抗 claudin-1 多克隆抗体(美国Abcam公司);FITC标记的羊抗兔IgG抗体(武汉博士德公司);抗荧光淬灭剂、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、蛋白Marker(上海碧云天公司);血糖分析仪(美国强生公司);冰冻切片机(德国Leica公司);-80℃低温冰箱(美国Thermo Forma公司);荧光显微镜(日本Nikon Eclipse 80i型);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶电泳成像系统(美国Kodak公司);图像分析软件Quantity One(美国Bio-rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 NC组大鼠给予正常饲料,DM组大鼠给予高脂饲料。8周后DM组大鼠腹腔注射小剂量STZ(30 mg/kg),NC组注射等剂量柠檬酸盐缓冲液。1周后尾静脉采血检测空腹血糖,血糖值大于11.1 mmol/L为造模成功,若造模未成功则小剂量补打1次。造模成功后每周同一时间点空腹监测血糖和体质量变化。实验过程均符合《实验动物管理条例》的有关要求。

1.2.2 角膜标本制备 分别于造模成功后第4周、第8周和第16周随机取NC组和DM组大鼠各5只,以过量水合氯醛腹腔注射处死大鼠,迅速用PBS冲洗角膜;手术剪摘除眼球,眼科剪沿角巩膜缘剪下角膜,放入已垫有包埋剂(optimum cutting temperature compound, OCT)的24孔板中;将角膜处于正上方,-80℃冰箱保存,用于HE染色和免疫荧光染色分析。用于Western blot分析的角膜上皮则以直径为4 mm的环钻标记,用刀片夹持器夹取钝刀片机械分离标记内完整的角膜上皮组织后,置于液氮中保存。

1.2.3 角膜冰冻切片及HE染色 调节冰冻切片

机的温度为 -20 ℃,切片厚度为 6 μm,预冷一段时间后,取出 -80 ℃ 冰箱保存的角膜标本进行切片。切片经室温干燥后,放入 -20 ℃ 预冷的冰丙酮中固定 10 min。稍水洗,60 ℃ 苏木精染色 30~60 s,用流水冲洗苏木精液 5~10 s;加 1% 的盐酸乙醇后稍水洗,加促蓝液反蓝后流水冲洗;0.5% 伊红染色液染色 60 s 后蒸馏水稍洗,依次放入 80% 乙醇溶液、95% 乙醇溶液、无水乙醇溶液,再分别经过石碳酸二甲苯、二甲苯 I、二甲苯 II 脱水后,中性树胶封片。光镜下观察染色结果并拍照。

1.2.4 免疫荧光染色 取出上述丙酮固定后的角膜冰冻切片,室温干燥后 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,5% 脱脂奶粉封闭 2 h。吸除脱脂奶粉后,加入 1:200 兔抗 claudin-1 多克隆抗体(一抗) 4 ℃ 冰箱孵育过夜。37 ℃ 复温 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 10 min;避光加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体(二抗) 常温避光孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,加入抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜观察并拍照。

1.2.5 Western blot 检测 取出液氮中冻存的角膜上皮组织,加入 RIPA 蛋白裂解液,充分研磨成匀浆 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min;取上清液分装转移到 0.5 ml 离心管中,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 20 μl 蛋白经 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h;加一抗 4 ℃ 冰箱孵育过夜,再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 37 ℃ 孵育 1 h,用 ECL 试剂盒进行显影,以 β-actin 为内参,Quantity One 软件分析灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对进行比较的两组资料采用两样本均数比较的 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NC 组大鼠与 DM 组大鼠体重的比较 高脂喂养 8 周后(注射 STZ 之前) NC 组大鼠的平均体重(381 g)较 DM 组大鼠(412 g)低 7.5% (*t* = 9.003, *P* < 0.01),但在造模成功后 NC 组大鼠维持正常体重增长,而 DM 组大鼠体重增长缓慢。造模成功后第 4 周时,DM 组大鼠平均体重(418 g)较 NC 组大鼠(447 g)低 6.4% (*t* = 11.563, *P* < 0.01);第 8 周时,DM 组(422 g)较 NC 组(509 g)低 17.1% (*t* = 36.847, *P* < 0.01);第 16 周时,DM 组(428 g)较 NC 组(566 g)低 24.4% (*t* = 63.602, *P* < 0.01),见表 1、图 1A。

2.2 NC 组大鼠与 DM 组大鼠空腹血糖比较 高脂喂养 8 周后(注射 STZ 之前) NC 组大鼠的空腹血糖值约为 5 mmol/L,DM 组约为 6 mmol/L (*t* = 7.472, *P* < 0.01);造模成功后 DM 组大鼠空腹血糖浓度升高并维持在约 21 mmol/L,而 NC 组大鼠的空腹血糖仍为 5 mmol/L;两组间造模后第 4 周、8 周、16 周空腹血糖值差异均有统计学意义(*t* = 24.500, 35.933, 26.354, *P* < 0.01),见表 2、图 1B。

表 1 大鼠不同阶段体重比较(*n* = 10, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 高脂喂养 第 8 周 | 造模后 第 4 周 | 造模后 第 8 周 | 造模后 第 16 周 |
|----|------------------|------------------|------------------|------------------|
| NC | 381.30 ± 7.62 | 446.90 ± 5.28 | 509.00 ± 4.90 | 565.60 ± 5.85 |
| DM | 411.70 ± 7.48 ** | 418.20 ± 5.81 ** | 421.90 ± 5.65 ** | 428.40 ± 3.50 ** |

与 NC 组比较: ***P* < 0.01

表 2 大鼠不同阶段空腹血糖比较(*n* = 10, $\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 高脂喂养 第 8 周 | 造模后 第 4 周 | 造模后 第 8 周 | 造模后 第 16 周 |
|----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| NC | 4.96 ± 0.20 | 5.03 ± 0.34 | 5.06 ± 0.31 | 5.20 ± 0.55 |
| DM | 5.94 ± 0.37 ** | 20.74 ± 2.00 ** | 20.67 ± 1.34 ** | 20.95 ± 1.81 ** |

与 NC 组比较: ***P* < 0.01

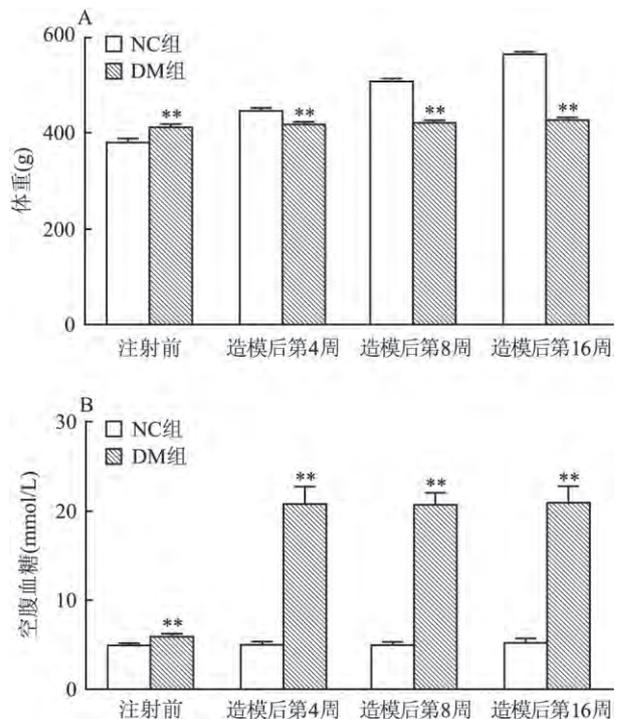


图 1 NC 组大鼠与 DM 组大鼠体重和空腹血糖的比较

A: 体重; B: 空腹血糖; 与 NC 组比较: ***P* < 0.01

2.3 HE 染色观察角膜组织病理学改变 造模成功后观察两组大鼠角膜形态,NC 组大鼠角膜各层清晰可见,均无水肿,细胞轮廓清楚,排列整齐;DM 组

大鼠角膜在第 8 周和第 16 周时,角膜上皮细胞排列疏松,基质层水肿,胶原纤维排列不规则,见图 2。

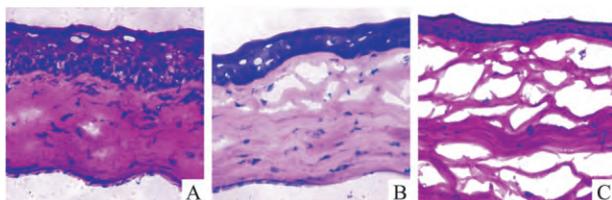


图 2 NC 组大鼠和 DM 组大鼠在不同病程角膜的染色 HE $\times 200$
A: NC 组; B: DM 组造模后第 8 周; C: DM 组造模后第 16 周

2.4 claudin-1 蛋白免疫荧光染色结果 免疫荧光检测角膜上皮显示 claudin-1 蛋白主要分布在角膜上皮的表层细胞和翼状细胞层。造模成功后第 4 周和第 8 周,NC 组和 DM 组未观察到有明显差别。第 16 周时,DM 组角膜上皮 claudin-1 蛋白表达较 NC 组明显较弱且不规则,见图 3。

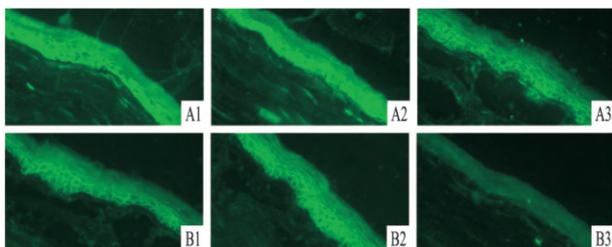


图 3 大鼠不同病程角膜上皮 claudin-1 蛋白表达免疫荧光染色检测
A: NC 组; B: DM 组; 1: 造模后第 4 周; 2: 造模后第 8 周; 3: 造模后第 16 周

2.5 Western blot 检测结果 造模成功后第 4 周 ($t=0.637$) 和第 8 周 ($t=2.024$),NC 组和 DM 组角膜上皮 claudin-1 的表达量差异无统计学意义。第 16 周时,DM 组角膜上皮 claudin-1 的表达量低于 NC 组 ($t=4.606$, $P < 0.05$),见图 4。

3 讨论

II 型 DM 会导致多种常见的眼部并发症,如 DM 视网膜病变、青光眼以及白内障等。DM 患者发生在角膜的病变称为 DM 性角膜病变^[4],有超过 70% 的 DM 患者存在角膜的异常病变^[5]。角膜改变与 DM 类型、病程有关^[6]。

角膜上皮作为眼睛与外界环境的第一道屏障,保护眼睛免受各种外界因素的侵袭,同时也防止泪液及其化学成分的渗透。紧密连接作为细胞间连接的一种主要形式,在形成和维持角膜上皮功能、介导

上皮细胞间粘合等方面起着关键的作用,也是上皮细胞屏障功能的重要基础。claudins 家族是构成紧密连接的主要成分,为紧密连接最重要的膜蛋白结构分子,目前已发现 24 个 claudins 家族成员^[7]。claudins 的分子质量为 23 ku,有 4 个跨膜区域,是唯一有组织特异性的紧密连接蛋白。claudins 蛋白决定细胞的通透性,并且不同 claudin 蛋白对不同离子的通透性有选择性^[8]。claudin-1 蛋白是紧密连接蛋白的一种,主要在角膜上皮的表层细胞和翼状细胞层表达。

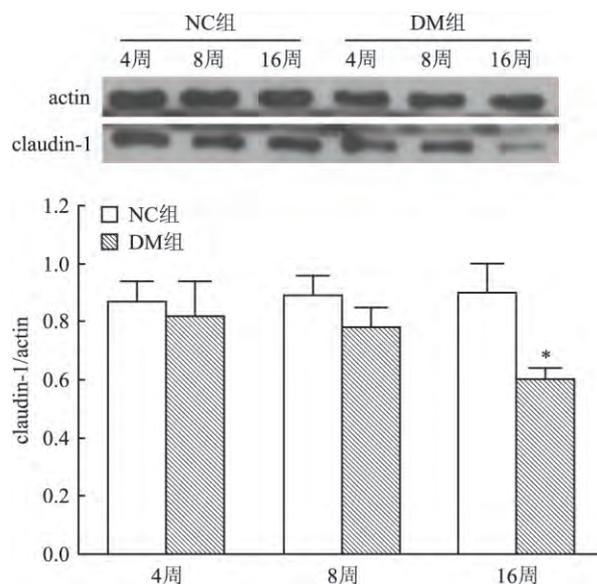


图 4 大鼠在不同病程角膜上皮 claudin-1 蛋白的表达
与同一时间点 NC 组比较: * $P < 0.05$

本实验采用高脂联合低剂量 STZ 腹腔注射成功建立了 II 型 DM 大鼠模型,并观察角膜病变情况。大鼠造模 4 周时并未出现明显的角膜病变,在 8 周和 16 周时,发现 DM 大鼠角膜上皮细胞排列疏松,基质层水肿。说明 DM 初期未累及角膜损伤,但随着病程发展,角膜存在进行性病理损伤。研究^[9]显示 DM 患者角膜病理改变可能与机体糖基化终末产物堆积、炎症介导氧化应激等眼内物质代谢异常有关。此外,DM 患者角膜慢性高糖状态以及微血管的损伤导致角膜神经营养障碍,不仅引起多种酶的改变,同时也破坏了炎症神经反馈通路^[10]。

本实验通过免疫荧光染色法发现造模成功后 16 周 II 型 DM 大鼠角膜上皮紧密连接蛋白 claudin-1 较正常大鼠表达更低也更弱。而在第 4 周和第 8 周 2 组间 claudin-1 表达量差异无统计学意义。Western blot 也得出同样的结果。这些结果显示持

续的高血糖状态导致 claudin-1 蛋白表达量降低。研究^[11]显示在 STZ 诱导的 DM 大鼠模型中,视网膜紧密连接蛋白包括 occludin、ZO-1、claudin-1/5 的表达量均降低。DM 导致紧密连接蛋白表达降低的机制可能与其持续的高血糖状态以及代谢紊乱导致的微循环缺血低氧有关。慢性持续的高血糖状态产生的过多氧自由基,可直接破坏紧密连接蛋白的表达,可能也与角膜上皮 claudin-1 蛋白表达量降低有关^[12]。

综上所述,DM 角膜上皮 claudin-1 蛋白表达降低可能会造成 DM 患者角膜对外界的防御功能降低,从而引起各种临床表现。关于 DM 对角膜上皮紧密连接的影响机制尚需进一步的研究,可为临床上治疗 DM 眼表疾病提供理论依据。

参考文献

- [1] Xu K, Yu F S. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 3301-8.
- [2] Kaji Y. Prevention of diabetic keratopathy[J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89(3): 254-5.
- [3] Sugrue S P, Zieske J D. ZO1 in corneal epithelium: association to the zonula occludens and adherens junctions[J]. *Exp Eye Res*, 1997, 64(1): 11-20.
- [4] Schultz R O, Van Horn D L, Peters M A, et al. Diabetic keratopathy[J]. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1981, 79: 180-99.
- [5] Aiello L P, Gardner T W, King G L, et al. Diabetic retinopathy[J]. *Diabetes Care*, 1998, 21(1): 143-56.
- [6] Wiemer N G, Dubbelman M, Kostense P J, et al. The influence of chronic diabetes mellitus on the thickness and the shape of the anterior and posterior surface of the cornea[J]. *Cornea*, 2007, 26(10): 1165-70.
- [7] Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(4): 285-93.
- [8] Koval M. Claudins - key pieces in the tight junction puzzle[J]. *Cell Commun Adhes*, 2006, 13(3): 127-38.
- [9] Sato E, Mori F, Igarashi S, et al. Corneal advanced glycation end products increase in patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(3): 479-82.
- [10] Cisarik-Fredenburg P. Discoveries in research on diabetic keratopathy[J]. *Optometry*, 2001, 72(11): 691-704.
- [11] Yu Z, Gong C, Lu B, et al. Dendrobium chrysotoxum Lindl. alleviates diabetic retinopathy by preventing retinal inflammation and tight junction protein decrease[J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 518317.
- [12] Schreiber G, Kooij G, Reijkerk A, et al. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling[J]. *FASEB J*, 2007, 21(13): 3666-76.

Effects of hyperglycemia on the expression of corneal epithelial tight junction protein claudin-1 in type 2 diabetic rats

Ni Mengyuan, Liao Rongfeng

(Dept of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To assess the expression of the corneal epithelial TJ protein claudin-1 in type 2 diabetic rats at different time points. **Methods** 80 eight-week-old male SD rats were randomly divided into the normal control and diabetic mellitus(DM) groups ($n=40$ each). A high-fat diet combined with STZ injection was used to induce type 2 DM. Normal and diabetic rats were sacrificed at 4, 8, 16 weeks respectively(after STZ injection) before debridement. Hematoxylin and eosin was used to study the morphological differences between normal and diabetic cornea. Immunofluorescence and Western blot were used to determine the expression of corneal epithelial TJ protein claudin-1. **Results** Corneal epithelial cells reduction and stroma edema were evident at 8 and 16 weeks by HE. Claudin-1 expression in the corneal epithelium of the diabetic group was lower and fainter compared to the normal group at 16 weeks(after STZ injection) ($P<0.05$), which were similar to the normal group at 4 and 8 weeks. **Conclusion** Continual hyperglycemia has a negative effect on ocular surface tissues and the expression of corneal epithelial tight junction protein claudin-1 with progressing of type 2 diabetic mellitus.

Key words diabetes mellitus; tight junction; corneal epithelium; immunofluorescence staining; Western blot