

# 糖尿病大鼠角膜上皮损伤修复过程中 occludin 的重塑特点

黄晨晨<sup>1</sup>, 廖荣丰<sup>1</sup>, 汪 枫<sup>1</sup>, 唐松涛<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨糖尿病(DM)大鼠和正常大鼠角膜上皮修复过程中紧密连接蛋白 occludin 重塑的特点。方法 90只SD大鼠随机分为DM组和正常对照组(NC)各45只(DM组均高脂喂养)通过腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导形成II型DM大鼠模型,于损伤后0h(未损伤),16、48、72、120h(每组5只)处死大鼠取角膜。间接免疫荧光染色和Western blot法观察 occludin 蛋白在损伤修复过程中的变化。结果 DM大鼠角膜上皮损伤愈合率较NC组大鼠明显延迟,DM组和NC组大鼠角膜上皮 occludin 蛋白在损伤后16、48h表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在损伤后0、72、120h表达差异无统计学意义。结论 糖尿病可影响大鼠角膜上皮创伤修复过程中紧密连接蛋白 occludin 蛋白的表达。

**关键词** 糖尿病;紧密连接蛋白;角膜上皮;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(2015)11-1583-05

随着社会的进步和发展,糖尿病(diabetes mellitus, DM)的发病率也在快速的增加,糖尿病眼病也成为了致盲的主要原因<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>报道了糖尿病眼病的并发症,除了糖尿病视网膜病变,多种类型的角膜上皮紊乱在糖尿病患者中也十分常见,包括角

膜上皮损伤愈合的延迟,上皮屏障功能、基础泪液分泌量和角膜敏感度的下降。其中,角膜上皮损伤修复延迟会导致糖尿病患者眼内手术后的一系列临床问题,尤其是玻璃体切除术后。虽然损伤修复延迟的机制尚未了解,但可能与紧密连接蛋白表达的变化有关。该实验通过检测去上皮后不同时间 occludin 蛋白的表达,探讨DM大鼠和NC大鼠在角膜上皮修复过程中紧密连接蛋白 occludin 重塑特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF级健康成年雄性SD大鼠90只,购于安徽医科大学实验动物中心,体重200g左右,发育正常,角膜透明,术前裂隙灯显微镜下眼部检查均无异常。

**1.1.2 主要试剂** 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国Sigma公司;0.5%丙美卡因滴眼液购自美国爱尔康公司;兔抗 occludin 多克隆抗体购自美国Abcam公司;FITC标记的羊抗兔IgG抗体、新生胎牛血清、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购自上海碧云天公司。

**1.1.3 主要仪器** 裂隙灯、手术显微镜(德国Carl Zeiss公司);眼前节照相机(日本佳能公司);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);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶电泳成像系统(美

2015-06-03 接收

基金项目: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<sup>1</sup>眼科、<sup>2</sup>内分泌科,合肥230032

作者简介:黄晨晨,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

**Methods** BALB/c mice in experimental groups were exposed to cigarette smoke. Then the smoke-exposure was stopped and mice were treated with NAC gavage. The mice were executed 1, 2, and 3 months after smoking cessation. Lung tissue sample and bronchoalveolar lavage fluid(BALF) were collected. HE staining was used to observe the pathologic changes of the lung and ELISA was used to measure the level of IL-17A and IL-22. **Results** Considerable emphysematous changes was found in the lung of mice exposed to cigarette smoke. Compared with the controls, the level of IL-17A and IL-22 elevated remarkably in pulmonary tissue and BALF after smoking exposure and declined gradually after smoking cessation. Additional NAC gavage treatment enhanced the decline tendency. **Conclusion** IL-17A and IL-22 might play a complex role in the chronic inflammatory changes of lung in mice exposed to cigarette smoke.

**Key words** cigarette smoking; N-acetylcysteine; interleukin-17A; interleukin-22

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 动物分组** 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为 DM 组( $n=45$ ) 和 NC 组( $n=45$ )。动物饲养环境温度( $22 \pm 1$ ) °C, 湿度 50% ~ 60%。

**1.2.2 DM 大鼠模型建立** DM 组大鼠由高脂饮食联合一次性腹腔注射 STZ(剂量为 32 mg/kg) 建立 DM 模型, NC 组普通饮食注射等剂量的柠檬酸盐缓冲液。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, 若动物死亡则立即补齐。造模成功后于每周早上同一时间空腹检测血糖和体重。实验过程均符合《实验动物管理条例》的有关要求。

**1.2.3 角膜上皮损伤模型建立** 将 DM 大鼠和 NC 大鼠以 0.3 ml/100 g 剂量腹腔注射水合氯醛麻醉, 同时采用 0.1% 盐酸丙美卡因表面麻醉。以直径 4 mm 的环钻标记角膜, 用刀片夹持器夹取钝刀片以不伤及角膜基质层的深度去除标记内角膜上皮组织。术后以盐酸金霉素涂眼, 防止感染。

**1.2.4 角膜创伤愈合率观察** 创伤模型建立后, 随机选取 DM 大鼠( $n=5$ ) 和 NC 大鼠( $n=5$ ) 进行角膜荧光素钠染色并在裂隙灯显微镜下观察在 16 h 及 24 h 时角膜上皮愈合情况并照相。用 Image Pro Plus 软件分析照片并计算创伤面积。创面愈合率(%) = [(原始创面面积 - 现创面面积) / 原始创面面积] × 100%。

**1.2.5 角膜标本的制备** 于角膜损伤后 0 h(未损伤)、16、48、72、120 h 以过量水合氯醛腹腔注射处死大鼠, 每个时间点各 5 只, 用 PBS 冲洗角膜, 用手术剪去除眼球, 用眼科剪沿角膜缘剪下角膜, 包埋于放有包埋剂(optimum cutting temperature compound, OCT) 的 24 孔板中, -80 °C 冰箱保存。用于 HE 染色和免疫荧光染色分析。

**1.2.6 角膜冰冻切片及 HE 染色** 调节冰冻切片机的温度为 -20 °C 预冷一段时间后, 取出 -80 °C 冰箱保存的 OCT 埋的角膜标本, 调节切片厚度为 6 μm 进行切片, 切片经室温干燥后, 放入冰丙酮中浸泡 10 min 固定。稍水洗, 苏木精染色 60 °C, 30 ~ 60 s, 用流水冲洗苏木精液, 加 1% 的盐酸乙醇后水洗, 加促蓝液反蓝后用流水冲洗, 再加 0.5% 伊红染色液后蒸馏水稍洗, 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, 中性树脂封片。光镜下观察

染色结果并拍照。

**1.2.7 免疫荧光染色** 取出上述丙酮固定后的角膜冰冻切片, 室温下待干燥后 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 2% 胎牛血清封闭 1 h, 加入 1:200 兔抗 occludin 多克隆抗体(一抗), 4 °C 冰箱孵育过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 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 5 次, 每次 5 min, 加入抗荧光淬灭剂封片。用日本 Nikon Eclipse 80i 型荧光显微镜观察并拍照。

**1.2.8 Western blot 检测** 将 -80 °C 保存的角膜组织取出加入 600 μl RIPA 蛋白裂解液充分研磨成匀浆, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 将离心后的上清液分装转移到 0.5 ml 离心管中, 使用 BCA 法测定蛋白浓度。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 °C 冰箱孵育过夜, 再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温孵育 1 h, 用 ECL 试剂盒进行显影, 以 GAPDH 为内参, Quantity One 软件分析灰度值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组资料的比较采用两样本均数比较的  $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 NC 大鼠与 DM 大鼠体重的比较** 在高脂喂养 4 周后(注射 STZ 之前) NC 组大鼠平均体重(370 g) 较 DM 大鼠(400 g) 低 7.5% ( $P < 0.01$ ), 但在第 16 周时 DM 大鼠的平均体重(410 g) 较 NC 组大鼠(510 g) 低 19.6% ( $P < 0.01$ ), 见图 1A。

**2.2 NC 大鼠与 DM 大鼠的血糖比较** 在高脂喂养 4 周后(注射 STZ 之前) NC 组空腹血糖值约为 4 mmol/L, DM 组约为 6 mmol/L ( $P < 0.05$ ), 但在第 16 周时 DM 大鼠的空腹血糖值约为 20 mmol/L, NC 的空腹血糖值仍为 5 mmol/L ( $P < 0.01$ ), 见图 1B。

**2.3 角膜上皮损伤修复观察** 随机选取 DM 组与 NC 组大鼠各 5 只, 损伤后 24 h 内角膜荧光素钠染色, 裂隙灯下观察上皮创伤修复情况。NC 组在 16 h 和 24 h 的损伤愈合率达 55% 和 84%, 而 DM 组在术后 16 h 和 24 h 的损伤愈合率为 34% 和 56%, 见表 1。DM 大鼠的角膜损伤愈合率较 NC 组大鼠有明显的延迟( $P < 0.01$ ), 见图 2。

表 1 DM 大鼠和 NC 大鼠角膜上皮损伤愈合率比较( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	16 h (%)	24 h (%)	$P$ 值
NC 组	55.84 ± 4.15	84.08 ± 3.34	0.001
DM 组	34.4 ± 3.11	56.84 ± 2.84	0.001

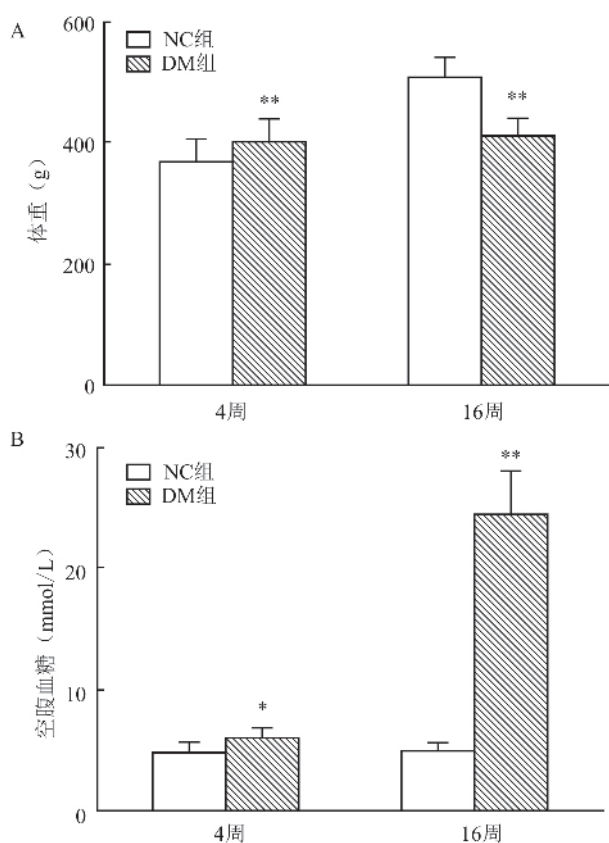


图1 两组大鼠体重和空腹血糖的比较

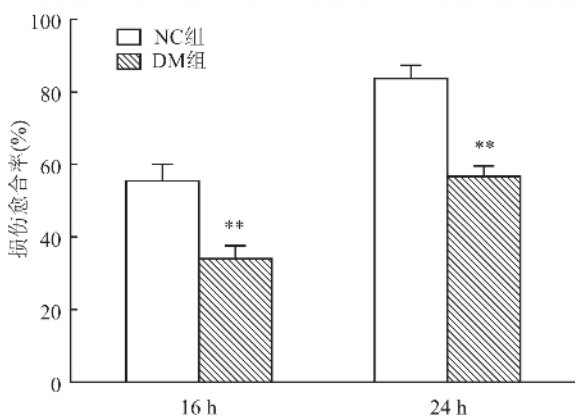
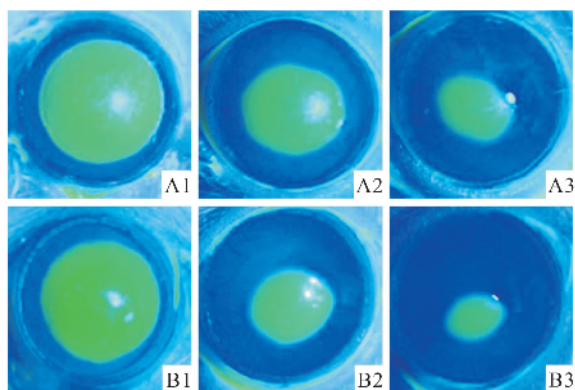
A: 体重; B: 空腹血糖; 与 NC 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 

图2 DM大鼠和NC大鼠角膜上皮损伤愈合率比较

A: DM组; B: NC组; 1: 0 h; 2: 16 h; 3: 24 h; 与 NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$ 

**2.4 HE染色观察大鼠角膜上皮创伤修复过程的变化** 在角膜上皮去除术前可以观察到 NC 组大鼠的角膜上皮的多层上皮细胞,在 16、48 h 可以观察到单层或多层角膜上皮细胞覆盖在缺损表面的边缘,72 h 角膜上皮的 rebuilding 已经完成。但在角膜上皮去除术前可以观察到 DM 大鼠的角膜上皮基底细胞和基质层水肿,16 h 缺损表面仍没有被覆盖,在 48、72 h 可以观察到较 NC 组覆盖在上皮缺损处的角膜上皮细胞少且不规则,见图 3。

**2.5 occludin 蛋白免疫荧光结果** 免疫荧光检测角膜上皮发现 occludin 蛋白分布在表层角膜上皮细胞的边缘。角膜上皮未去除时 DM 组和 NC 组之间未观察到有明显差异。角膜上皮去除 16 h 可以观察到 DM 组角膜上皮 occludin 表达较 NC 组明显更弱,且排列不规则。角膜上皮去除 48 h 可以观察到 DM 角膜上皮 occludin 的表达较 DM 组 16 h 明显增强,排列也更规则,但仍比 48 h 的 NC 组 occludin 的表达低。角膜上皮去除 72 h,两组 occludin 的表达都更规则与未受伤时无明显差别。在角膜上皮去除 120 h,两组间未观察到明显区别,见图 4。

**2.6 Western bolt 结果** 观察未损伤大鼠的角膜上皮 occludin 的表达显示 NC 组和 DM 组之间的表达量无明显差异 ( $P > 0.05$ )。在角膜上皮去除术 16、48 h 观察到 DM 组大鼠的角膜上皮 occludin 表达量明显低于 NC 组 ( $P < 0.05$ )。在角膜上皮去除 72、120 h 组大鼠的 occludin 表达量无明显差异 ( $P > 0.05$ ),见图 5。

### 3 讨论

II 型糖尿病会导致各种眼部并发症,其中最常见的并发症为糖尿病视网膜病变<sup>[3]</sup>,但是糖尿病角膜病变如角膜溃疡、角膜炎,以及各种角膜上皮缺损也被大量报道过。有报道表示有 50% 甚至是超过 50% 的糖尿病患者正在遭受糖尿病角膜病的危害<sup>[4]</sup>。

角膜上皮具有屏障功能,能够保护眼睛不受外界环境的影响。患有糖尿病角膜病的糖尿病患者的角膜虽然看起来仍然是透明的并且在没有角膜损伤时看起来也是正常的,然而角膜上皮一旦损伤就会发现正常的分层结构的表皮的重建推迟了<sup>[5]</sup>。损伤面积的修复并不能代表上皮屏障功能的重建。大量的研究<sup>[6]</sup>显示上皮屏障功能的重建慢于上皮损伤的愈合。所以眼部手术后细胞间连接的重建对于上皮的损伤修复非常重要。

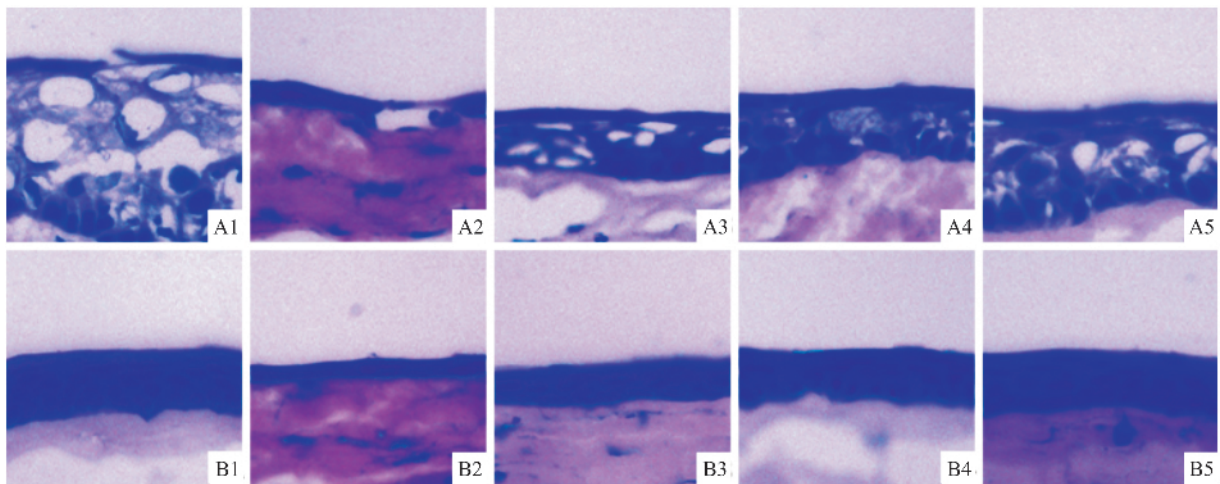


图3 DM大鼠和NC大鼠在不同时段角膜上皮愈合的情况 HE×400  
A: DM组; B: NC组; 1: 0 h; 2: 16 h; 3: 48 h; 4: 72 h; 5: 120 h

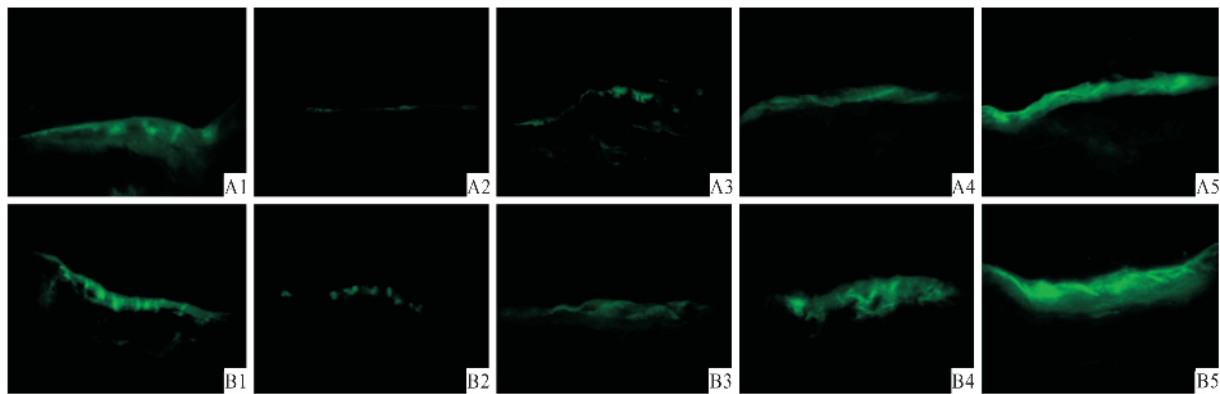


图4 免疫荧光染色检测两组大鼠在损伤后不同时间段 occludin 蛋白表达  
A: DM组; B: NC组; 1: 0 h; 2: 16 h; 3: 48 h; 4: 72 h; 5: 120 h

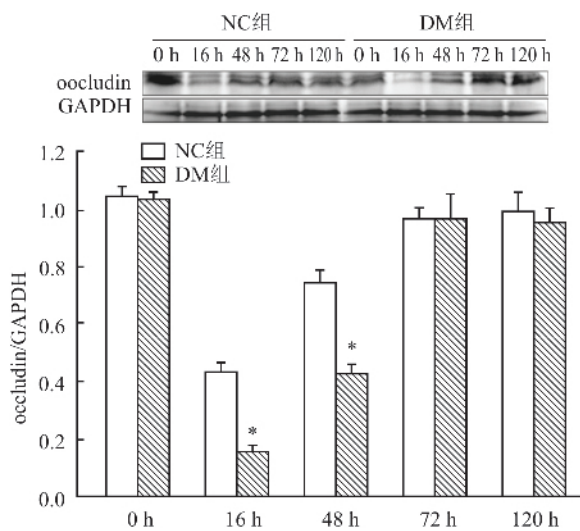


图5 Western blot 检测 DM 大鼠和 NC 大鼠在损伤后不同时间段 occludin 蛋白的表达  
与 NC 组比较: \*  $P < 0.05$

紧密连接蛋白 occludin 分子质量为 65 ku ,也是第一个被认定为紧密连接元件的蛋白 ,属于跨膜蛋白家族 ,具有两种不同的亚型 ,广泛表达于上皮细胞层中 ,与 ZO 蛋白和 claudin 蛋白等构成紧密连接的基本结构 ,是上皮屏障功能的基础。

早期的紧密连接蛋白的重建对防止外环境中的有害物质通过细胞间隙进入内环境起到重要的作用。通过以往的研究可以知道 ,紧密连接蛋白大多表达在角膜上皮表面细胞层<sup>[7]</sup>。occludin 蛋白是紧密连接蛋白的一种 ,其表达在角膜的表层上皮细胞层中。

本研究检测了上皮去除术后上皮损伤修复的愈合率发现在上皮去除 16 h 和 24 h 时 NC 组大鼠的角膜愈合率是 DM 组大鼠愈合率的 1.5 倍。这与 Fukushi et al<sup>[8]</sup> 的研究结果一致 ,DM 大鼠在角膜上皮去除术后上皮的愈合率延迟。实验通过免疫荧光染色法发现在未损伤的 DM 大鼠角膜中紧密连接蛋

白 occludin 没有明显的变化。但是 DM 大鼠角膜在损伤后的早期 occludin 蛋白的表达量较 NC 组更低也更弱,并且 DM 大鼠的角膜上皮紧密连接蛋白的重建较 NC 组的更慢。而在损伤后期 DM 组大鼠与 NC 组大鼠的紧密连接蛋白的表达量并无显著的区别。Western blot 也同样发现在未损伤的 DM 大鼠角膜中紧密连接蛋白 occludin 没有变化,DM 大鼠损伤早期 occludin 蛋白的表达量、紧密连接蛋白的重建更弱且更慢,损伤后期紧密连接蛋白的表达量无明显区别。这些结果显示 DM 大鼠角膜上皮损伤修复过程中紧密连接蛋白的重建推迟了,但并没有缺失。

持续 12 周的高糖状态未见糖尿病大鼠角膜上皮紧密连接蛋白的明显改变但是导致了角膜上皮损伤过程早期紧密连接蛋白重建的推迟。

糖尿病患者角膜上皮损伤愈合的延迟是一个常见但难以解决的问题,科学研究者对这一问题也做了大量的研究,而从紧密连接蛋白在上皮的损伤愈合中的重塑的角度探索这一问题是一个全新的角度,需要全面的深入研究紧密连接蛋白在糖尿病角膜上皮损伤愈合过程中起到的重要作用。

## 参考文献

- [1] Clark C M Jr, Lee D A. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus [J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(18): 1210-7.
- [2] 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.
- [3] Schultz R O, Van Horn D L, Peters M A, et al. Diabetic keratopathy [J]. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1981, 79: 180-99.
- [4] Zagon I S, Klocek M S, Sassani J W, et al. Use of topical insulin to normalize corneal epithelial healing in diabetes mellitus [J]. *Arch Ophthalmol* 2007, 125(8): 1082-8.
- [5] Wakuta M, Morishige N, Chikama T, et al. Delayed wound closure and phenotypic changes in corneal epithelium of the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(2): 590-6.
- [6] Lee J S, Oum B S, Choi H Y, et al. Differences in corneal thickness and corneal endothelium related to duration in diabetes [J]. *Eye (Lond)*, 2006, 20(3): 315-8.
- [7] McCartney M D, Cantu-Crouch D. Rabbit corneal epithelial wound repair: tight junction reformation [J]. *Curr Eye Res*, 1992, 11(1): 15-24.
- [8] Fukushi S, Merola L O, Tanaka M, et al. Reepithelialization of denuded corneas in diabetic rats [J]. *Exp Eye Res*, 1980, 31(5): 611-21.

## Characteristics of reconstituted tight junctions after corneal epithelial wounds in diabetic rats

Huang Chenchen, Liao Rongfeng, Wang Feng, et al

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

**Abstract Objective** To investigate the characteristics of reconstituted tight junctions after corneal epithelial wounds in a high-fat diet combined with streptozocin (STZ)-induced rat model of type 2 diabetes mellitus (DM).

**Methods** Ninety Sprague-Dawley male rats were randomly divided into diabetic and normal control groups ( $n = 45$  each). A high-fat diet combined with intraperitoneal STZ injection was used to induce type 2 DM. Diabetic and healthy rats were sacrificed before debridement and 16, 48, 72, and 120 hours afterwards for Western blot and immunofluorescence. **Results** Corneal epithelial wound closure rates were decreased in diabetic rats compared with the normal rats. Immunofluorescence and Western blot analysis demonstrated that occludin expression in the corneal epithelium of the diabetic group was weaker compared to the normal group at the 16 and 48 hour time-points after debridement. **Conclusion** Abnormal occludin expression may contribute to delayed epithelial wound healing in diabetic corneas.

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