

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00655

## 神经生长因子和氨基胍对糖尿病大鼠视觉诱发电位的影响

桑延智,刘心\*,柳林,赵春艳

第二军医大学长海医院眼科,上海 200433

**[摘要]** 目的:观测糖尿病大鼠视觉诱发电位(VEP)的改变以及神经生长因子(NGF)和氨基胍(AG)对其的影响。方法:用链脲佐菌素(STZ)制作糖尿病大鼠动物模型,分为正常对照组(CON组)、糖尿病对照组(DM组)、糖尿病 NGF 治疗组(D+N组)、糖尿病 AG 治疗组(D+A组)。分别于病程 3、6、9、12 个月进行各组大鼠的 VEP 测定。结果:与 CON 组相比,其他各组大鼠在各实验时点的 VEP 潜伏期延长、波幅下降( $P<0.01$ );6 个月及 9 个月时,D+N 组及 D+A 组的潜伏期均较 DM 组缩短,且差异显著( $P<0.05$ ),而波幅仅见 6 个月时部分回升;12 个月时,除 D+A 组波幅较 DM 组略有回升外,其余改变与 9 个月时类似。结论:NGF 和 AG 能够改善 DM 导致的大鼠 VEP 潜伏期延长及波幅下降。

**[关键词]** 糖尿病;视觉诱发电位;神经生长因子;氨基胍

**[中图分类号]** R 587.26 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)06-0655-04

### Influence of nerve growth factor and aminoguanidine on visual evoked potential in diabetic rats

SANG Yan-zhi, LIU Xin\*, LIU Lin, ZHAO Chun-yan

Department of Ophthalmology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the changes of visual evoked potential (VEP) in diabetic rats and the influence of nerve growth factor (NGF) and aminoguanidine (AG) on VEP. **Methods:** Diabetes was induced in adult male Wistar rats with streptozotocin (STZ). Rats were divided into normal control group (CON), diabetes model group (DM), NGF-treated group (D+N) and AG-treated group (D+A). VEP was measured during the 3<sup>rd</sup> month, 6<sup>th</sup> month, 9<sup>th</sup> month, and 12<sup>th</sup> month. **Results:** Compared with the CON group, all rest groups had longer latencies and lower amplitudes ( $P<0.01$ ). During the 6<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> months, the latencies in group D+N and group D+A were significantly decreased ( $P<0.05$ ) compared with DM group, and the amplitude was partially recovered during the 6<sup>th</sup> month. The changes during the 12<sup>th</sup> month were similar to those of the 9<sup>th</sup> month, except that the amplitude in D+A group was slightly higher than that in the DM group. **Conclusion:** NGF and AG can improve DM-induced elongation of VEP latency and decrease of VEP amplitude.

**[KEY WORDS]** diabetes mellitus; visual evoked potential; nerve growth factor; aminoguanidine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(6): 655-658]

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的并发症之一,其发展的最终结果将导致失明。在发达国家,DR 是成年人致盲的首位原因<sup>[1]</sup>,糖尿病患者中 DR 的患病率可达 20.5%~46.9%<sup>[2-3]</sup>。因此,多年来 DR 一直是眼科界的热点问题和重要课题,但 DR 的发病机制至今尚未完全阐明,故对其预防及治疗仍无十分有效的方法。以往的研究大多集中于视网膜微血管病变上。然而,因为视网膜属于中枢神经系统的延续部分,而且主要由神经细胞组成,那么 DR 也必然包含了视网膜神经组织的病变。另一方面,正常的视觉功能依赖

于视网膜及视路神经元的正常活动,因此,DM 引起的视觉丧失,最终也应从神经元功能的改变方面来解释。近年来,随着对 DR 本质的认识不断加深,糖尿病早期视网膜神经感觉功能的紊乱对 DR 的发生发展的作用也越来越受到重视。已有临床电生理证据表明<sup>[4-5]</sup>,在传统的临床 DR 出现前,糖尿病患者即有视觉诱发电位等视觉电生理的异常,但尚缺乏进一步的实验研究及药物干预观测。本实验旨在通过观测外源性神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和氨基胍(aminoguanidine, AG)对糖尿病大鼠视觉诱发电位(visual evoked potential, VEP)变

**[收稿日期]** 2007-12-12 **[接受日期]** 2008-03-18

**[作者简介]** 桑延智,硕士,主治医师。E-mail: sangyanzhi@sina.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25072118, E-mail: linxin-119@163.com

化的影响,为进一步揭示 DR 发病的神经机制及药物治疗提供一定的实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 动物、试剂和仪器 健康成年雄性 Wistar 大鼠 116 只,体质量 230g~280 g(中国科学院实验动物中心)。检查屈光间质清,瞳孔等大等圆,对光反应好,眼底无异常。随机分为正常对照组 20 只和实验制模组 96 只。所有动物全程分笼饲养在达标动物房(由第二军医大学东方肝胆外科医院动物实验中心提供),全价颗粒饲料喂饲,不限食水,自然昼夜光线照明。室内通风良好,氨浓度小于 20 mol/L,室温保持在 18~22℃,室内相对湿度为 40%~70%。动物适应性喂养 1 周。NGF 冻干粉由第二军医大学高分子实验室制备,批号 981105;AG 购自美国 Sigma 公司。VEP 采用第二军医大学生理学教研室研制的 JX-2000 生理学信号处理系统进行测定并记录。

1.2 糖尿病动物模型的制备 制模前大鼠禁食 10 h,自由饮水。将链脲佐菌素(STZ)溶于 pH 4.5 的 0.1 mmol/L 枸橼酸钠缓冲液,配成 1% STZ 溶液,经紫外线消毒灭菌后,按 45 mg/kg 一次性经实验组大鼠尾静脉注射。24 h 后用试纸测尿糖,72 h 后取鼠尾血测血糖(CBG 法)。空腹血糖浓度  $\geq 16.7$  mmol/L,尿糖在  $\text{++}$ ~ $\text{+++}$  者即为糖尿病大鼠成功模型。血糖低于 16.7 mmol/L 的大鼠于禁食 10 h 后再次注射上述相同剂量的 STZ 累加成模,同法测血糖筛选出 DM 大鼠。正常对照组鼠尾静脉注射前述等量 0.1 mmol/L 枸橼酸钠缓冲液。建模共观察 2 周,然后开始计算病程。

1.3 动物分组及处理 (1)空白(正常)对照组(CON 组):20 只,血糖平均值( $4.12 \pm 0.62$ ) mmol/L。(2)糖尿病大鼠随机分为以下 3 个实验组:①糖尿病对照组(DM 组):22 只,血糖平均值( $21.44 \pm 4.63$ ) mmol/L。②糖尿病 NGF 治疗组(D+N 组):30 只,按 1 000 U/kg 剂量予右眼球后注射纯品 NGF,前 3 个月隔日注射 1 次,以后每周注射 1 次。③糖尿病 AG 治疗组(D+A 组):22 只,将 AG 溶于双蒸水配成 500 mg/L 溶液,水饲剂量相当于每只给予 AG 40 mg/d。以上各组分别在饲养至 3、6、9、12 个月时检测电生理指标。

1.4 VEP 测定 参考文献方法<sup>[1]</sup>,将大鼠用戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉。麻醉后切开大鼠头部皮肤暴露颅骨,按下述部位埋入自制不锈钢螺纹电极(直径 1 mm)。引导电极位于前凶后 6 mm,矢状缝右侧旁开 3.5 mm 处;参考电极位于前凶前 2 mm,

矢状缝左侧旁开 2 mm 处;地电极位于前凶前 2 mm,矢状缝右侧旁开 2 mm 处。埋入电极后,用自凝牙托粉将电极固定在颅骨上。将埋好电极的大鼠在暗室环境中进行固定,置于闪光发生器前 20 cm 处。滴托吡卡胺眼液 1 滴充分散瞳后,给鼠眼以闪光频率刺激 1 次/s,刺激时程 10 ms,分析时间 500 ms,平均叠加 100 次,滤波 2~100 Hz。因 D+N 组给药方式为右眼注射,故测定双眼 VEP,其余各组测右眼 VEP。

1.5 统计学处理 数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行处理和分析,定量数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两均数之间的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

各实验组在不同时点潜伏期或波幅均无明显差异( $P > 0.05$ );在左右眼之间亦无显著性差异( $P > 0.05$ );各实验组 DM 大鼠在各时点均较 CON 组潜伏期明显延长,波幅明显降低,差异显著( $P < 0.01$ );但各组波幅降低均  $< 50\%$ (图 1)。

图 1 各组大鼠 VEP 代表波形描记

Fig 1 VEP waveform of rats in different groups

3 个月时,D+N 组双眼潜伏期或波幅与 DM 组相比无明显差异( $P > 0.05$ ),但 D+A 组潜伏期较 DM 组缩短,差异显著( $P < 0.05$ );6 个月时,D+N 组及 D+A 组潜伏期较 DM 组均缩短,其中 D+N 组右眼及 D+A 组波幅亦回升,差异显著(分别  $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );9 个月时,D+N 组及 D+A 组潜伏期较 DM 组仍呈有显著差异的缩短( $P < 0.01$ ),而

波幅无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 12 个月时, D+N 组及 D+A 组潜伏期有继续上升趋势, 但与 DM 组比

较无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 波幅变化 D+A 组与 DM 组相比有显著性回升。详见表 1。

表 1 各组大鼠不同时期 VEP 潜伏期及波幅变化

Tab 1 Latent period and amplitude of VEP at different time points in each group

Group	n	(x̄ ± s)							
		the 3 <sup>rd</sup> month		the 6 <sup>th</sup> month		the 9 <sup>th</sup> month		the 12 <sup>th</sup> month	
		Latency t/ms	Amplitude U/mV	Latency t/ms	Amplitude U/mV	Latency t/ms	Amplitude U/mV	Latency t/ms	Amplitude U/mV
CON	20	31.11 ± 6.18**	0.75 ± 0.11**	31.08 ± 3.93**	0.83 ± 0.07**	33.67 ± 6.78**	0.73 ± 0.12**	35.25 ± 5.79**	0.81 ± 0.06**
DM	22	52.92 ± 7.94	0.61 ± 0.09	51.75 ± 5.97	0.54 ± 0.13	55.55 ± 6.94	0.57 ± 0.09*	53.25 ± 6.56	0.67 ± 0.07
D+N(Right)	30	47.13 ± 6.56	0.65 ± 0.08	45.88 ± 5.24△△	0.68 ± 0.13△△	46.50 ± 6.56△	0.65 ± 0.08	51.75 ± 5.36	0.68 ± 0.06
D+N(Left)	30	46.38 ± 6.38	0.59 ± 0.16	44.80 ± 4.33△△	0.65 ± 0.16	47.81 ± 5.95△△	0.63 ± 0.08	52.17 ± 6.46	0.71 ± 0.10
D+A	22	45.90 ± 5.42△△	0.66 ± 0.06	46.00 ± 6.06△△	0.71 ± 0.09△	46.40 ± 7.13△	0.65 ± 0.10	48.75 ± 5.82	0.73 ± 0.04△△

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs other groups; △  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.01$  vs DM group

### 3 讨论

DR 与糖尿病病程相关, 随着糖尿病全身状况的有效控制和患者寿命的延长, DR 的致盲率趋于增加。如何有效阻止 DR 患者失明, 成为防盲治盲的重要任务。揭示 DR 的发病机制, 一直是研究者关注的焦点之一<sup>[6]</sup>。有实验结果表明, 视网膜电图的异常可出现于患糖尿病 2 d 的大鼠<sup>[7]</sup>。临床上也发现, 尚无视网膜病变的糖尿病患者的视乳头上方视网膜神经纤维层厚度明显降低<sup>[8]</sup>。视网膜神经病变与血管病变都是 DR 发病的病理学基础, 而且视网膜的神经病变可能先于器质性的血管病变, 目前视网膜神经成分在 DR 发病过程中的作用时机和作用机制尚不清楚。因此, 从视网膜神经成分角度探讨并明确 DR 早期发病的机制, 从而寻找安全有效的视网膜神经保护方法, 对阻止 DM 患者早期视功能损害具有重要的意义和临床应用价值。

VEP 反映的是视网膜神经节细胞到大脑皮质视觉中枢的视信息传导通路上的电变化, 是一种广泛应用于临床客观评价视功能状况的眼电生理检查。由于不同实验室之间刺激和记录方法的不同, VEP 波峰的极性、潜伏期、波幅有很大的差异, 目前尚无统一的标准值。本实验中, 在对大鼠散瞳后, 以全视野闪光反射球做刺激, 可以较好地控制距离和强度, 保证全视野有一定的照度, 所检测的大鼠 VEP 波形重复性好。另外, 由于大鼠的 VEP 存在一定的个体差异, 在研究中为使个体间差异的影响

减少到最低限度, 本实验中对局部治疗组还采用了左右眼间自身对照。

本实验研究同样检测到糖尿病大鼠的 VEP 发生了明显的变化: 潜伏期明显延长, 波幅明显降低。按目前的理论认为, 潜伏期反映神经髓鞘的功能状态, 波幅反映神经轴索的功能状态<sup>[9]</sup>。因此, 本实验表明, 实验性 DM 的视神经损伤可能在轴索及髓鞘均受到了损害。Dyck 等<sup>[10]</sup>通过对糖尿病患者的味觉纤维研究提示, 轴突变性可能是糖尿病神经变性的初始变化。糖尿病神经再生能力明显受损, 包括轴突再生及髓鞘再生。糖尿病轻度神经变性时, 再生程度很高, 而严重病例的远侧神经几乎完全缺少轴突, 说明轴突再生并不能完全补偿轴突的变性。VEP 的改变与视神经的损伤程度相一致, 其异常变化高度提示视神经功能受损, 并可预测恢复可能性的大小。VEP 可以很敏感地反映视神经损伤的程度, 重要波形的波幅下降若超过 50%, 则被认为是神经功能受到了严重的损伤, 可能造成不可逆的损伤<sup>[11]</sup>。本实验中的 DM 大鼠模型 VEP 波幅降低均在 50% 以内, 表明尚为不完全的可逆性损伤, 提示此模型可以用于观察 DM 视神经保护效应的研究, 为后期设计的 NGF、AG 等治疗性实验提供了可行的理论基础。

NGF 是神经营养因子家族中发现最早、研究最深入的一类生长因子。作为维持中枢神经和周围神经功能的重要活性因子, NGF 能改善 DM 引起的感觉神经功能障碍<sup>[12]</sup>, 与视觉系统损伤的修复和再生

也有密切的关系。有研究<sup>[13]</sup>表明,糖尿病早期视网膜靶组织顶盖前区含神经营养因子的神经细胞减少,细胞内神经营养因子表达减少。在内源性 NGF 减少的情况下,给予外源性 NGF 将有助于症状的缓解和改善。Seki 等<sup>[14]</sup>报道糖尿病大鼠视网膜的脑源性神经生长因子较正常者下降 49%,其 mRNA 下调 24%,通过玻璃体腔注射脑源性神经生长因子可保护无长突细胞。本实验中观察到,从治疗 6 个月开始 NGF 治疗组大鼠的直接局部治疗眼和另侧眼的波幅及潜伏期较 DM 未治疗大鼠均有明显改善,而波幅仅在 6 个月时部分有显著改善,证实了上述理论,即外源性 NGF 确实对 DM 病变累及的视觉神经元有一定的治疗作用。另外,本实验还发现,DM 大鼠在接受 NGF 局部治疗后潜伏期有显著缩短,而波幅的变化尽管呈上升趋势,但无统计学的显著差异。结合前述文献,我们可以做出这样的推测:外源性 NGF 的治疗作用对神经髓鞘的再生较对轴突的再生更为明显,其具体作用机制尚有待于进一步的研究。

近年来,随着对 DR 研究的深入,人们发现长期高血糖引起机体蛋白质非酶糖化,形成过量的非酶糖化终产物(advanced glycation end products, AGEs),可能导致各系统的慢性病变和功能丧失,是 DM 慢性并发症的主要原因之一<sup>[15]</sup>。AGEs 在糖尿病微血管并发症方面有明确的作用,可使视网膜毛细血管通透性增加,血管壁增厚,血液黏滞,明显加重血-视网膜屏障的破坏<sup>[16]</sup>。还有离体实验证实 AGEs 对视网膜的三级神经元均有致凋亡作用<sup>[17]</sup>。AG 是一种非酶糖化抑制剂,能抑制 AGEs 和蛋白糖化后的交联形成,还能抑制早期糖化产物的形成。本实验发现 AG 可使 DM 大鼠延长的 VEP 潜伏期缩短,说明 AG 对 DR 时的视功能损伤有一定的治疗作用。

总之,在糖尿病视网膜病变的发生、发展过程中,视网膜的神经功能也受到了严重影响。视网膜神经的损害与微循环的损害应是共同存在、相互影响。一些药物(如 NGF、AG 等)对糖尿病视神经功能的损害表现了一定的治疗效果,展现了良好的应用前景。

## [参考文献]

- [1] Brown A F, Jiang L, Fong D S, Gutierrez P R, Coleman A L, Lee P P, et al. Need for eye care among older adults with diabetes mellitus in fee-for-service and managed medicare[J]. Arch Ophthalmol, 2005, 123: 669-675.
- [2] Varma R, Torres M, Peña F, Klein R, Azen S P, Los Angeles Latino Eye Study Group. Prevalence of diabetic retinopathy in adult Latinos the Los Angeles Latino eye study[J]. Ophthalmology, 2004, 111: 1298-1306.
- [3] Kempen J H, O'Colmain B J, Leske M C, Haffner S M, Klein R, Moss S E, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States[J]. Arch Ophthalmol, 2004, 122: 552-563.
- [4] Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations[J]. Exp Eye Res, 2003, 77: 115-116.
- [5] Baber A J. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27: 283-290.
- [6] 崔彦, 许迅. 糖尿病性视网膜病变分子机制的研究进展[J]. 眼视光学杂志, 2007, 9: 135-138.
- [7] Phipps J A, Fletcher E L, Vingrys A J. Paried-flash identification of rod and cone dysfunction in the diabetic rat[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45: 4592-4600.
- [8] Sugimoto M, Sasoh M, Ido M, Wakitani Y, Takahashi C, Uji Y. Detection of early diabetic change with optical coherence tomography in type 2 diabetes mellitus patients without retinopathy[J]. Ophthalmologica, 2005, 219: 379-385.
- [9] 潘映福. 临床诱发电位学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 375.
- [10] Dyck P J, Giannini C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1996, 55: 1181-1193.
- [11] Akabane A, Saito K, Suzuki Y, Shibuya M, Sugita K. Monitoring visual evoked potentials during retraction of the canine optic nerve: protective effect of unroofing the optic canal[J]. J Neuro Surg, 1995, 82: 284.
- [12] Aloe L, Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology[J]. Trends Cell Biol, 2004, 14: 395-399.
- [13] Fernyhough P, Huang T J, Verkhatsky A. Mechanism of Mitochondrial dysfunction in diabetic sensory neuropathy[J]. J Peripher Nerv Syst, 2003, 8: 227-235.
- [14] Seki M, Tanaka T, Nawa H, Usui T, Fukuchi T, Ikeda K, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats; therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells[J]. Diabetes, 2004, 53: 2412-2419.
- [15] Pokupee R, Kalauz M, Turk N, Turk Z. Advanced glycosylation end products in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2003, 41: 378-384.
- [16] Moore T C, Moore J E, Kaji Y, Frizzell N, Usui T, Poulaki V, et al. The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44: 4457-4464.
- [17] Reber F, Geffarth R, Kasper M, Reichenbach A, Schleicher E D, Siegner A, et al. Graded sensitiveness of the various retinal neuron populations on the glyoxal-mediated formation of AGEs and ways of protection[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2003, 41: 213-225.