

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00147

负性调节葡萄糖转运对糖尿病小鼠视网膜微血管病变的抑制作用

石珂*, 张悦之, 谢琳, 游志鹏, 周悦, 汪昌运

南昌大学第二附属医院眼科, 南昌 330006

[摘要] **目的** 观察通过抑制视网膜上葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter-1, GLUT1)表达而减少葡萄糖转运进入视网膜对糖尿病小鼠微血管病变的影响。**方法** 36只8周龄C57BL/6小鼠按随机数字表法分为正常对照组、糖尿病对照组和GLUT1小干扰核糖核酸(siRNA)治疗组,每组12只。腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型后, GLUT1siRNA组予以玻璃体腔注射1 μ L 靶向GLUT1的siRNA, 正常对照组和糖尿病对照组注射等量非靶向性siRNA。建模成功后第21周, 对3组小鼠行免疫印迹法检查视网膜GLUT1的表达并测定比较视网膜的含糖量, 通过测定视网膜ICAM-1和TNF- α 的表达及检查视网膜血管白细胞黏滞和血-视网膜内屏障渗漏以比较微血管病变程度。**结果** GLUT1siRNA组GLUT1在神经视网膜层的表达较正常对照组表达约下降77.00%, 仅为糖尿病对照组的8.07%, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。尽管糖尿病对照组和GLUT1siRNA组视网膜组织含糖量均高于正常对照组, 但GLUT1siRNA组小鼠视网膜含糖量为糖尿病对照组的50.05%, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 糖尿病对照组和GLUT1siRNA组小鼠视网膜ICAM-1和TNF- α 的表达均高于正常对照组($P < 0.01$), 但这两个炎症因子在GLUT1siRNA组表达仅分别为糖尿病对照组的66.14%($P < 0.05$)和54.76%($P < 0.01$); 同时我们发现糖尿病对照组较GLUT1siRNA组有更多的白细胞黏附在视网膜血管中, 视网膜铺片发现糖尿病对照组较GLUT1siRNA组其荧光渗漏区域较多, 且渗漏面积也较大。**结论** GLUT1siRNA通过抑制GLUT1表达, 限制葡萄糖转运进入视网膜, 从而降低视网膜含糖量, 减轻了糖尿病视网膜的炎症反应和血-视网膜内屏障渗漏, 对糖尿病视网膜病变可产生缓解作用。

[关键词] 葡萄糖转运蛋白1; 小分子干扰RNA; 糖尿病视网膜病变

[中图分类号] R 587.26

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2015)02-0147-08

Negative regulation of glucose transport alleviates microvasculature pathological changes of retinopathy in diabetic mice

SHI Ke*, ZHANG Yue-zhi, XIE Lin, YOU Zhi-peng, ZHOU Yue, WANG Chang-yun

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of glucose transporter-1 (GLUT1) suppression on microvasculature pathological changes in diabetic mice. **Methods** Thirty-six 8-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into normal control, diabetic control and GLUT1siRNA treatment groups. Diabetic model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin. GLUT1siRNA treatment group received intravitreal injection of siRNA-mediated GLUT1, and the other two groups received equal amount of non-specific siRNA. Twenty-one weeks after diabetic induction, immunoblotting was conducted to examine the expression of GLUT1 and two inflammation factors: ICAM-1 and TNF- α . We also calculated the retinal glucose concentration. Leukostasis assay and vascular leakage assay were utilized to compare the microvasculature pathological changes between the two groups. **Results** The expression of GLUT1 was significantly down-regulated in GLUT1siRNA treatment group compared with the other two groups ($P < 0.01$), decreased by 77.00% compared with the normal control group and only

[收稿日期] 2014-11-10

[接受日期] 2014-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金(81160123), 江西省卫计委中医药科研计划(2013B016), 江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ13046). Supported by National Natural Science Foundation of China(81160123), Scientific Research Plan for Traditional Chinese Medicine of Jiangxi Health and Family Planning Commission (2013B016), and Youth Research Foundation of Jiangxi Education Department (GJJ13046).

[作者简介] 石珂, 博士生, 主治医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0791-86299710, E-mail: 86325294@qq.com

being 8.07% of the diabetic control group. Though retinal glucose concentration of diabetic control and GLUT1siRNA treatment groups were higher than that of normal control, that in GLUT1siRNA treatment group was only 50.05% that of the diabetic control group ($P < 0.01$). The expressions of ICAM-1 and TNF- α in GLUT1siRNA treatment and diabetic control were significantly higher than that in the normal control group, and their expressions in GLUT1siRNA treatment group were 66.14% ($P < 0.05$) and 54.76% ($P < 0.01$) those of the diabetic control group, respectively. Moreover, compared with GLUT1siRNA treatment group, diabetic control group had more adherent leukocytes in the retinal microvasculature and larger areas of leaked FITC-labeled albumin retina. **Conclusion** GLUT1siRNA can limit glucose transport into the retina by inhibiting GLUT1 expression, thus decrease retinal glucose concentration and alleviate microvasculature changes of diabetic retinopathy.

[Key words] glucose transporter type 1; small interfering RNA; diabetic retinopathy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(2): 147-154]

糖尿病(diabetes mellitus)是当前严重威胁人们健康的慢性疾病之一,据预测糖尿病患者数量在2030年将由2011年的3亿6600万人增长至5亿5200万人^[1]。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的微血管病变之一,常因黄斑水肿、视网膜脱离及玻璃体积血等造成视力减退甚至失明。虽然DR具体发病机制尚不明确,但世界两大糖尿病多中心试验研究DCCT^[2]及UKPDS^[3]均揭示高血糖是发生DR的基础因素,在高糖环境下视网膜氧化应激产物生成过量^[4]、蛋白激酶C激活^[5]、糖基化终末产物合成增多^[6]等启动了视网膜组织细胞的损伤。本课题组设想从DR病变的基础——高糖环境着手,观察通过限制葡萄糖转运进入视网膜而降低视网膜局部含糖量是否可以缓解DR的进展。葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter-1, GLUT1)是目前已知的葡萄糖通过血-视网膜屏障的唯一载体,其在视网膜中除分布于神经节细胞、光感受器细胞、Müller细胞等外主要表达于血-视网膜内屏障的血管内皮细胞和外屏障的视网膜色素上皮细胞^[7]。我们拟利用siRNA靶向抑制视网膜GLUT1后,检测糖尿病小鼠视网膜炎症反应因子、视网膜血管白细胞黏滞数量和血-视网膜内屏障渗漏范围以比较微血管的病变程度,并据此探讨负性调节葡萄糖转运对DR的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)、葡萄糖含量测定试剂盒购自美国Sigma-Aldrich公司,Western Blot电泳系统和蛋白质含量测定试剂盒购自美国Bio-Rad公司, Lipofectami-

ne™ RNAiMAX 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,异硫氰酸荧光素-刀豆蛋白A (fluorescein isothiocyanate conjugated concanavalin A, FITC-ConA)、异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白 (fluorescein isothiocyanate conjugated bovine serum albumin, FITC-BSA) 购自美国 Vector 公司,兔抗小鼠 GLUT1、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 一抗及羊抗兔二抗购自美国 Millipore 公司,柠檬酸缓冲液和磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 购自北京天根生化科技有限公司,电子分析天平购自上海精科天平厂,光谱分析仪购自德国 Spectro 公司,倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 株式会社,微量注射器购自美国 Hamilton 公司。

1.2 靶向 GLUT1 的 siRNA 合成 参考王耀东等^[8]设计的有效 siRNA 序列,交由上海吉玛制药技术有限公司合成靶向 GLUT1 的 siRNA,正义链 5'-GGAATTCAATGCTGATGATGA-3',反义链 5'-TCATCATCAGCATTGAATTCC-3',另合成非靶向性 siRNA 用作阴性对照,正义链 5'-TTCTCGAACGTGTCACGT-3',反义链 5'-ACGTGACACGTTCCGAGAA-3'。用 DEPC 处理过的生理盐水将 siRNA 溶解配制成浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 实验动物与分组 健康 8 周龄、无眼疾的近交系雄性 C57BL/6 小鼠 36 只,体质量 20~30 g,清洁级,购自南昌大学动物科学部,动物合格证号:赣动 2012145。将小鼠打上耳钉编号后根据随机数字表随机选取,分为正常对照组、糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组,每组各 12 只(24 眼)。糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组小鼠禁食 8 h 后以 50 mg/kg

腹腔注射 STZ(注射前临时溶于 pH 4.5 的 0.01 mol/L PBS),连续 5 d;正常对照组予以 pH 4.5 的 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液。第 7 天采小鼠尾部静脉血,测量血糖(浓度大于 3 g/L 为糖尿病建模成功);建模成功后第 21 周再次测量血糖。分别于建模成功后第一天及第 21 周测各组小鼠体质量,并观察小鼠体型变化,记录饮水、进食和尿量。

1.4 玻璃体腔注射 siRNA 建模成功后,对 3 组小鼠予以腹腔麻醉,眼部周围碘伏消毒,然后在显微镜下使用 Hamilton 微量注射器于角膜缘外 1 mm 向视神经方向进针,于瞳孔区见针尖后缓慢注射药物: GLUT1siRNA 组于玻璃体腔内注入含 20 μ mol/L 靶向 GLUT1 的 siRNA 1 μ L 以及转染试剂 1 μ L,正常对照组和糖尿病对照组则注入含 20 μ mol/L 非靶向性 siRNA 1 μ L 以及转染试剂 1 μ L。以上操作每 2 周重复注射 1 次,共注射 10 次。注射结束后,即建模成功后 21 周时进行以下检测。

1.5 视网膜组织含糖量检测 3 组小鼠各取 6 只,以脊椎脱臼法处死并取眼球,每组 6 只左眼球用作测量视网膜含糖量,6 只右眼球用作后续免疫印迹检测。取视网膜组织,加入 50 μ L 去离子水,加热至 70~75 $^{\circ}$ C(共 15 min),然后超声裂解 30 s,离心 20 min,取上清液 35 μ L,加入 165 μ L 葡萄糖含量测定试剂,并设立标准曲线和空白对照,应用光谱分析仪测定标本的吸光度,用 SPECTRO STAR NANO MARS 软件计算葡萄糖浓度。而后再取 10 μ L 上清液,加入 190 μ L 蛋白质含量测定试剂,设立标准曲线和空白对照,应用光谱分析仪测定标本的光密度,用 SPECTRO STAR NANO MARS 软件计算蛋白质浓度。以葡萄糖的量与蛋白质质量的比值表示视网膜葡萄糖含量(单位 nmol/mg),计算公式为 $G \times GV / [180.2 \times (P \times PV)]$ 。G:葡萄糖浓度(ng/mL),GV:葡萄糖含量测定反应液容积(mL),P:蛋白质浓度(mg/mL),PV:蛋白质含量测定反应液容积(mL),葡萄糖相对分子质量为 180.2。

1.6 免疫印迹检测 取方法 1.5 项中所述的 3 组小鼠的各 6 只右眼球,剥离视网膜组织,放入 Eppendorf 管,加入 200 μ L 裂解液,超声裂解 30 s,离心 20 min,取上清液,测定样品蛋白质浓度。取等量蛋白样品沸水煮后加入 SDS,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),而后转膜 90~120 min,分别加入 GLUT-

1、ICAM-1 和 TNF- α 一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,次日洗涤 3 遍后室温孵育二抗 1 h,暗室中加入显影液,进行凝胶图像分析并测定条带灰度值。

1.7 视网膜血管白细胞黏滞检查 3 组小鼠各取 3 只,分别予以氯胺酮(10 mg/kg)和赛拉嗪(60 mg/kg)混合液麻醉。剪开小鼠胸部皮肤及肋骨,暴露胸腔,夹闭降主动脉,剪开右心耳,将 27G 针头插入左心室,先用 10 mL 肝素(0.1 mg/mL)与 PBS 混合液灌注冲洗未黏滞的白细胞,然后用 20 μ g/mL 的 FITC-ConA(5 mg/kg)与 PBS 混合液标记黏滞的白细胞,再用 10 mL PBS 冲洗掉未与白细胞结合的 FITC-ConA。以脊椎脱臼法处死小鼠,每组均取出 6 只眼球,直接放入 4%多聚甲醛固定 1 h,剥离视网膜,制备视网膜平铺片,使用荧光显微镜观察并进行计数。

1.8 血-视网膜内屏障渗漏 3 组小鼠各取 3 只,分别予以氯胺酮(10 mg/kg)和赛拉嗪(60 mg/kg)混合液麻醉,经股静脉注射 FITC-BSA(100 mg/kg),20 min 后处死,每组均取出 6 只眼球,放入 4%多聚甲醛固定 30 min,剥离视网膜,制备视网膜平铺片,使用荧光显微镜观察渗漏情况。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。小鼠体质量、血糖水平、视网膜含糖量及免疫印迹检测灰度值等数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 以及 t 检验,检验水准(α)=0.05。

2 结果

2.1 糖尿病模型的建立以及 3 组小鼠体质量和血糖水平 糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组共 24 只小鼠均建模成功。3 组小鼠在建模成功时体质量差异无统计学意义($P > 0.05$),第 21 周时正常对照组小鼠较其余两组糖尿病小鼠(糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组)分别重 40.44%和 35.59%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。两组糖尿病小鼠体型均消瘦,饮水量、进食量和尿量均较正常对照组多(资料未列出)。血糖水平在刚建模成功时和第 21 周时正常对照组小鼠较糖尿病对照组低 46.85%和 55.37%,较 GLUT1siRNA 组低 47.36%和 54.39%,差异均有统计学意义($P < 0.01$),而糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组在两个测量时间点血糖水平差异均无统计学意义(表 1)。

表1 3组小鼠体质量和血糖水平

Tab 1 Body weight and blood glucose levels of mice in three groups

$n=12, \bar{x} \pm s$

| Group | Body mass m/g | | Blood glucose concentration $\rho_B/(g \cdot L^{-1})$ | |
|-----------------------|--|--|---|--|
| | First day after diabetic model establishment | The 21 st week after diabetic model establishment | First day after diabetic model establishment | The 21 st week after diabetic model establishment |
| | Normal control | 24.51±2.13 | 34.21±3.29 | 1.78±0.24 |
| Diabetic control | 23.12±2.04 | 24.36±3.23** | 3.35±0.63 | 3.88±0.51** |
| GLUT1 siRNA treatment | 23.62±2.12 | 25.23±2.78** | 3.38±0.61 | 3.80±0.66** |

** $P < 0.01$ vs normal control

2.2 视网膜组织含糖量的测定 21周时正常对照组小鼠视网膜含糖量约为(36.36±2.98) nmol/mg,糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组小鼠视网膜含糖量分别高达(156.73±8.01) nmol/mg 和(78.44±4.96) nmol/mg,均高于正常对照组 ($P < 0.01$),但 GLUT1siRNA 组小鼠的视网膜含糖量低于糖尿病对照组,为后者的 50.05% ($P < 0.01$),见图 1。

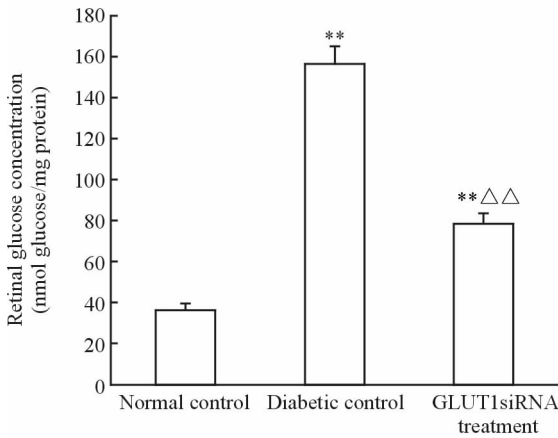


图1 3组小鼠视网膜的含糖量测定

Fig 1 Retinal glucose concentrations of mice in three groups

$n=6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs normal control; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs diabetic control

2.3 GLUT1 在 3 组小鼠视网膜中的表达 我们应用免疫印迹法检测 GLUT1 在小鼠神经视网膜层中的表达后进行统计学分析发现, GLUT1 在糖尿病条件下表达上调,但使用靶向 GLUT1 的 siRNA 处理后小鼠视网膜 GLUT1 表达下调,较正常对照组表达约下降 77.00%,仅为糖尿病对照组的 8.07%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图 2)。

我们同时也检测了视网膜色素上皮层上 GLUT1 的表达,与神经视网膜层结果不同, GLUT1

在 GLUT1siRNA 组仅为糖尿病对照组的 50.22%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),但与正常对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3。

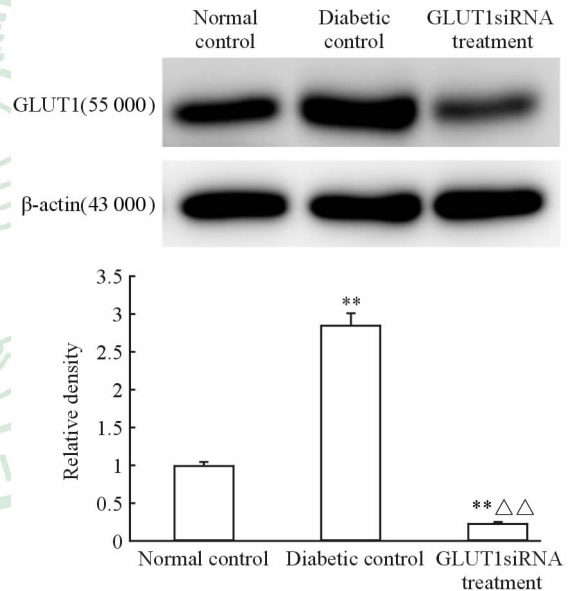


图2 GLUT1 在 3 组小鼠神经视网膜层中的表达

Fig 2 GLUT1 expression in neural retina of mice in three groups

$n=6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs normal control; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs diabetic control

2.4 糖尿病对照组与 GLUT1siRNA 组视网膜血管白细胞黏滞度的改变 视网膜血管白细胞黏滞度是视网膜炎症反应的一个重要指标^[9],也是 DR 的早期病理改变。我们发现在正常对照组中视网膜血管基本没有白细胞黏滞(图 4A),糖尿病对照组(图 4B)和 GLUT1siRNA 组(图 4C)的小鼠均出现较多的白细胞黏滞,但 GLUT1siRNA 组其黏滞的白细胞数量经计数约为糖尿病对照组总数的 52.76%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图 4D)。

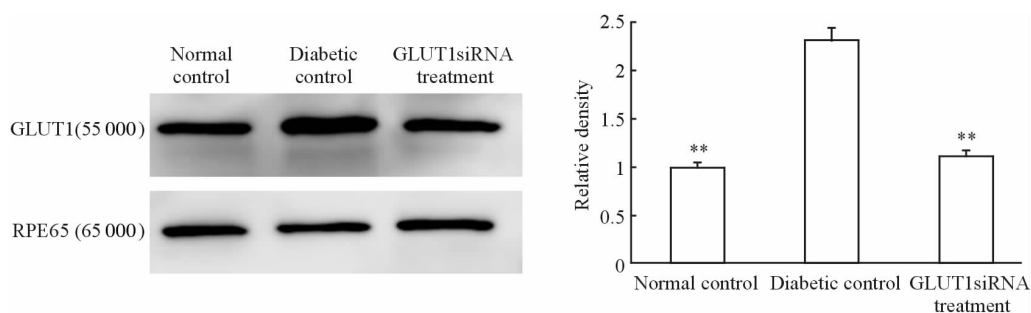


图3 GLUT1在3组小鼠视网膜色素上皮层中的表达

Fig 3 GLUT1 expression in retinal pigment epithelium of mice in three groups

$n=6$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$ vs diabetic control

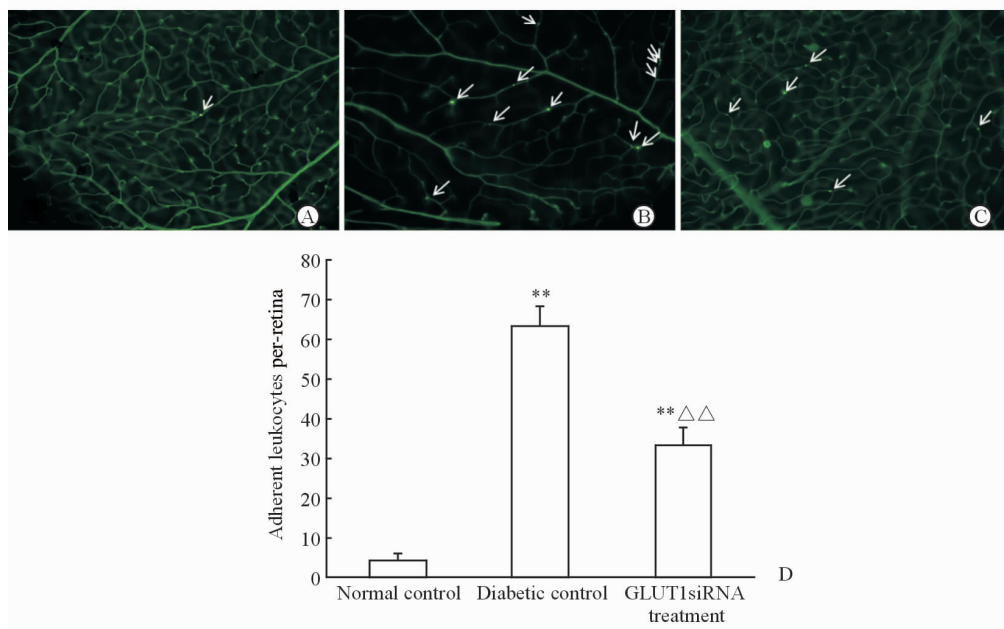


图4 3组小鼠视网膜血管白细胞黏滞度

Fig 4 Leukostasis assay of retinal blood vessels of mice in three groups

A: Normal control; B: Diabetic control; C: GLUT1siRNA treatment; D: Statistical analysis, $n=6$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$ vs normal control, $\Delta\Delta P<0.01$ vs diabetic control. Fluorescence microscope. Original magnification: $\times 400$ (A-C). White arrows (A-C) indicate leukocytes adhering to retinal vasculatures

2.5 糖尿病对照组与 GLUT1siRNA 组视网膜炎症因子的表达 国内外研究已证实 DR 是一种慢性炎症性疾病^[10], ICAM-1 和 TNF- α 是两个重要的炎症反应标记物。应用免疫印迹法检测 ICAM-1 和 TNF- α , 我们发现 ICAM-1 在糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组中表达均较正常对照组上调, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 但 GLUT1siRNA 组小鼠视网膜 ICAM-1 表达约为糖尿病对照组的 66.14%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 5。

TNF- α 检测也取得类似的结果, 其在糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组中表达同样均较正常对照上

调, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 但 GLUT1siRNA 组小鼠视网膜 TNF- α 表达约为糖尿病对照组的 54.76%, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 6。

2.6 糖尿病对照组与 GLUT1siRNA 组血-视网膜内屏障破坏后的荧光素渗漏对比 我们使用荧光显微镜通过观察和比较 FITC-BSA 以反映血-视网膜内屏障的渗漏情况。结果发现在正常对照组中血-视网膜内屏障完整, 未发现荧光渗漏, 糖尿病对照组和 GLUT1siRNA 组的小鼠均出现了荧光渗漏区域, 但 GLUT1siRNA 组其荧光渗漏区域较糖尿病对照组数量少, 且渗漏面积也较小(图 7)。

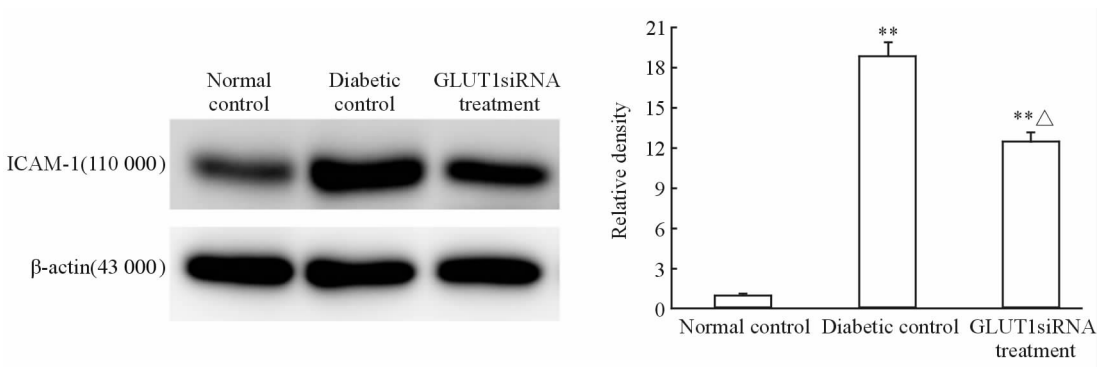


图5 3组小鼠视网膜炎症因子 ICAM-1 的表达

Fig 5 Inflammation factor ICAM-1 expression in retina of mice in three groups

ICAM-1: Intercellular cell adhesion molecule-1. $n=6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs normal control; $\Delta P < 0.05$ vs diabetic control

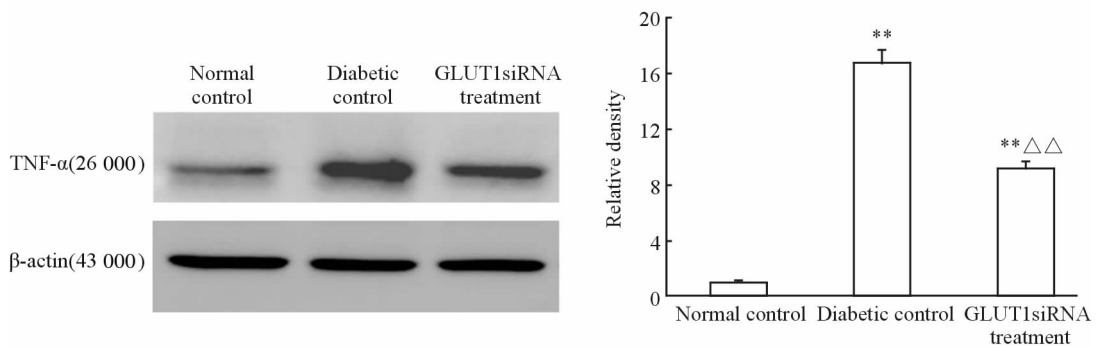


图6 3组小鼠视网膜炎症因子 TNF-α 的表达

Fig 6 Inflammation factor TNF-α expression in retina of mice in three groups

TNF-α: Tumor necrosis factor-α. $n=6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs normal control; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs diabetic control

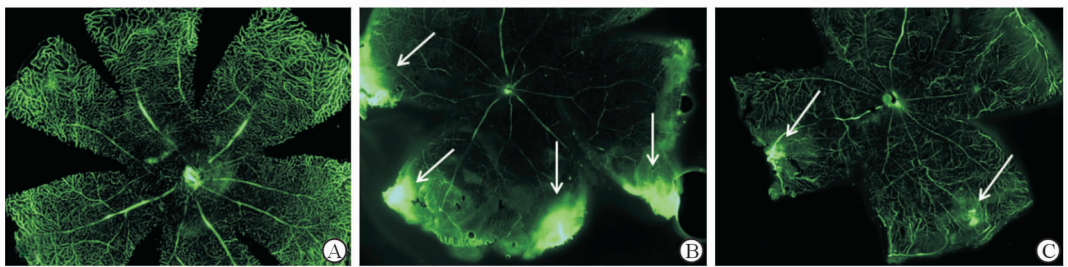


图7 血-视网膜内屏障破坏造成的荧光素渗漏

Fig 7 Inner blood-retina barrier breakdown induced fluorescence leakage

A: Normal control; B: Diabetic control; C: GLUT1siRNA treatment. White arrows indicate for fluorescence leakage areas. Original magnification: $\times 400$

3 讨论

DR 是糖尿病最常见和严重的眼部并发症,其具体发病机制目前尚不明确,大型随机对照临床研究 DCCT^[2] 及 UKPDS^[3] 已证实高血糖在 DR 及其他糖尿病并发症中的重要作用,高糖对视网膜细胞的作用机制可能包括影响特定基因的表达、使糖基化终末产物增多以及增加氧化应激反应^[11]。既然糖尿

病条件下视网膜组织所处的高糖微环境对其有损伤效应,有理由推测控制视网膜组织局部含糖量、逆转高糖环境可能是解决此问题的一把钥匙,视网膜的葡萄糖由血液转运而来,然而葡萄糖由于其水溶性而无法通过哺乳动物细胞膜的磷脂双分子层,因此视网膜组织细胞摄取葡萄糖需依靠一类转运葡萄糖的载体蛋白即 GLUT^[12],其中 GLUT1 是葡萄糖通过血-视网膜屏障的唯一载体^[7]。Kumagai 等^[13] 应

用免疫细胞化学法定量研究糖尿病患者眼球(没有或仅有轻微视网膜病变)中 GLUT1 的表达,发现半数以上的眼球视网膜 GLUT1 活性较正常对照组高出 18 倍,提示 GLUT1 上调可通过运输大量葡萄糖进入视网膜而介导细胞损伤。

siRNA 是一类 19~21 bp 大小的 RNA 片段,可特异性降解某个特定基因 mRNA,从而对该基因产生抑制作用。本实验参考既往研究有效的 GLUT1siRNA 序列并进行局部应用以观察其是否可以减少葡萄糖转运进入视网膜。如前所述,尽管两组糖尿病小鼠的总体血糖水平在建模后第 20 周差异无统计学意义,然而 GLUT1siRNA 组在接受玻璃体腔注射 GLUT1siRNA 后,视网膜组织中 GLUT1 表达相应下调,较糖尿病对照组下降约 91.93%,较正常对照组下降 77.00%。我们同时测得 GLUT1siRNA 组视网膜局部含糖量仅为糖尿病对照组的 50.05%,说明 GLUT1siRNA 抑制 GLUT1 后确实可以有效减少葡萄糖转运进入视网膜。但是我们也发现 GLUT1siRNA 组视网膜局部含糖量仍然较正常对照组高约 53.64%,其原因在于我们使用玻璃体腔法注射 GLUT1siRNA 对视网膜内屏障的 GLUT1 有明显的抑制作用,然而对视网膜色素上皮层即视网膜外屏障作用有限,视网膜色素上皮层 GLUT1 表达未出现明显下调,同时由于糖尿病条件下 GLUT1 其生物学活性较正常条件下上调^[14],因此从视网膜外屏障转运进入的葡萄糖导致 GLUT1siRNA 组视网膜含糖量较正常对照组高。但我们通过限制内屏障 GLUT1 也已达到了预先设想的条件,接下来我们通过观察炎症反应因子、视网膜血管白细胞黏滞数量和血-视网膜内屏障渗漏范围的变化探讨了局部含糖量减少是否可以影响微血管病变程度。

炎症反应是 DR 微血管病变的重要环节,大量研究发现糖尿病动物模型中视网膜白细胞数量增多,黏附能力增强,变形能力下降^[15-16]。由于 DR 患者白细胞通过比自身直径小的毛细血管时被动变形能力下降,导致白细胞黏附率增加,随着 DR 的病情进展,白细胞黏附率增加更为明显^[17]。因此我们使用视网膜血管白细胞黏滞检查分析 DR 炎症反应程度,发现 GLUT1siRNA 组小鼠发生黏滞的白细胞数量尽管比正常对照组多,但仅为糖尿病对照组总

数的 52.76%。我们同时测定了两种炎症反应标记物:趋化因子 ICAM-1 和细胞因子 TNF- α 的水平,发现这两种炎症因子在 GLUT1siRNA 组小鼠视网膜中的表达分别仅为糖尿病对照组的 66.14%和 54.76%,提示 GLUT1siRNA 限制葡萄糖转运进入视网膜后糖尿病小鼠炎症反应相对较轻。ICAM-1 和其配体 CD18 在介导白细胞黏滞中发挥了重要作用^[18],抑制 ICAM-1 可以显著减轻白细胞黏滞和血管通透性^[19],TNF- α 同样在 DR 视网膜中表达上调^[20]。血-视网膜屏障的破坏是视网膜水肿尤其是黄斑水肿发生的重要原因,其原因可能是白细胞黏滞的增加和炎症因子表达上调^[10]。如前所述,我们发现在 GLUT1siRNA 组白细胞黏滞和炎症因子均较糖尿病对照组轻,进一步通过血-视网膜内屏障渗漏检查发现其渗漏区域也较糖尿病对照组数量少,且渗漏面积也较小,说明视网膜的相对低糖环境对血-视网膜内屏障产生了保护作用。

综上所述,应用 GLUT1siRNA 局部注射抑制视网膜 GLUT1 后,糖尿病小鼠的视网膜含糖量下降,从而形成了一个视网膜相对低糖环境。在此环境下视网膜微血管病变较普通糖尿病小鼠有所缓解。结果提示,通过竞争性抑制 GLUT1 从而限制视网膜局部含糖量有可能成为未来防治 DR 的一个新方向。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Whiting D R, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 94:311-321.
- [2] The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342:381-389.
- [3] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKP-

- DS 33)[J]. *Lancet*,1998,352:837-853.
- [4] Wong T Y, Simo R, Mitchell P. Fenofibrate—a potential systemic treatment for diabetic retinopathy[J]. *Am J Ophthalmol*,2012,154:6-12.
- [5] Chen M, Curtis T M, Stitt A W. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy[J]. *Curr Med Chem*,2013,20:3234-3240.
- [6] Sjolie A K, Dodson P, Hobbs F R. Does renin-angiotensin system blockade have a role in preventing diabetic retinopathy? A clinical review[J]. *Int J Clin Pract*, 2011,65:148-153.
- [7] Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st century[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010,298:E141-E145.
- [8] 王耀东,李生娇,廖建兴. GLUT1 基因有效 siRNA 序列的筛选实验研究[J]. *口腔颌面外科杂志*,2012,22:312-317.
- [9] Wang J, Xu X, Elliott M H, Zhu M, Le Y Z. Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage[J]. *Diabetes*, 2010,59:2297-2305.
- [10] Agrawal N K, Kant S. Targeting inflammation in diabetes: newer therapeutic options[J]. *World J Diabetes*, 2014,5:697-710.
- [11] Ryan S J. 视网膜[M]. 4 版. 黎晓新,赵家良主译. 天津:天津科技翻译出版公司,2011:1219-1245
- [12] Gospe S M 3rd, Baker S A, Arshavsky V Y. Facilitative glucose transporter Glut1 is actively excluded from rod outer segments[J]. *J Cell Sci*,2010,123:3639-3644.
- [13] Kumagai A K, Viores S A, Pardridge W M. Pathological upregulation of inner blood-retinal barrier Glut1 glucose transporter expression in diabetes mellitus[J]. *Brain Res*,1996,706:313-317.
- [14] Lu L, Seidel C P, Iwase T, Stevens R K, Gong Y Y, Wang X, et al. Suppression of GLUT1; a new strategy to prevent diabetic complications[J]. *J Cell Physiol*, 2013,228:251-257.
- [15] Luty G A. Effects of diabetes on the eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2013,54:ORSF81-87.
- [16] Noda K, Nakao S, Zandi S, Sun D, Hayes K C, Hafezi-Moghadam A. Retinopathy in a novel model of metabolic syndrome and type 2 diabetes; new insight on the inflammatory paradigm[J]. *FASEB J*, 2014, 28: 2038-2046.
- [17] 李筱荣,黎晓新,惠延年. 糖尿病眼病[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:21-49.
- [18] Tian P, Ge H, Liu H, Kern T S, Du L, Guan L, et al. Leukocytes from diabetic patients kill retinal endothelial cells: effects of berberine[J]. *Mol Vis*, 2013, 19: 2092-2105.
- [19] Zhang H T, Shi K, Baskota A, Zhou F L, Chen Y X, Tian H M. Silybin reduces obliterated retinal capillaries in experimental diabetic retinopathy in rats[J]. *Eur J Pharmacol*,2014,740:233-239.
- [20] Zhang Q, Steinle J J. IGFBP-3 inhibits TNF-alpha production and TNFR-2 signaling to protect against retinal endothelial cell apoptosis[J]. *Microvasc Res*,2014,95:76-81.

[本文编辑] 魏学丽,邓晓群