

学校编码：10384

密级_____

学号：24520141153451

廈門大學

硕士学位论文

神经生长因子促进糖尿病大鼠
角膜神经的修复

Nerve growth factor promotes the repair of corneal nerves
in diabetic rats

叶立军

指导教师姓名：余福新 教授

胡皎月 助理教授

专业名称：生理学

论文提交日期：2017年4月

论文答辩日期：2017年5月

学位授予日期：2017年 月

答辩委员会主席：刘祖国

评 阅 人：颜江华 邹文进

2017年05月

神经生长因子促进糖尿病大鼠角膜神经的修复

叶立军

指导教师

余福新

教授

胡皎月

助理教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(余福新)课题(组)的研究成果,获得(余福新)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学眼科研究所)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):叶立军

2017年 05 月 19 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：叶立军

2017年 05 月 19 日

摘要

目的: 探究神经生长因子 (Nerve Growth Factor, NGF) 对糖尿病大鼠角膜神经的作用, 并解释其作用分子机制。

方法: SD 大鼠腹腔注射链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 建立 I 型糖尿病大鼠模型, 模型建立成功后将正常大鼠和糖尿病大鼠眼球分为四组, 正常大鼠左、右眼分别为 Ctrl + BSA 组和 Ctrl + NGF 组, 糖尿病大鼠左、右眼分别为 DM + BSA 组和 DM + NGF 组, 并在实验条件下饲养。第 6 周末检测四组角膜敏感度, 然后分别在大鼠左、右眼滴加浓度 15ug/mL 的牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 溶液、NGF 溶液, 连续 2 周, 每天 3 次, 每次 20 uL。第 8 周末检测四组角膜敏感度, 并取下一部分角膜通过免疫荧光染色技术观察角膜基底层中央神经密度的变化。余下的角膜进行等面积的角膜上皮刮除, 刮除后继续滴加 BSA 和 NGF 溶液 7 天, 并在刮除角膜上皮后, 分别在 0、24、36、48 小时检测角膜上皮的修复; 在第 2、4、7 天检测角膜敏感度的恢复。第 9 周末, 分别检测角膜基质和三叉神经节中 NGF- β 、TrkA、Akt、p-Akt 的变化, 并检测角膜神经密度。

结果: 造模后第 6 周末, 糖尿病大鼠角膜敏感度低于正常大鼠。第 8 周末和第 9 周末, 糖尿病大鼠角膜敏感度以及角膜中央基底层神经密度较正常大鼠低, 但 DM + NGF 组的角膜敏感度较 DM + BSA 组的高。角膜上皮刮除后, 正常大鼠角膜上皮的修复速度较糖尿病大鼠的快, 滴加 NGF 能促进角膜上皮的修复。糖尿病大鼠与正常大鼠的角膜上皮和基质中 NGF- β 的浓度无显著性, 但滴加 NGF 能使角膜上皮和基质中 NGF- β 含量增加, 四组三叉神经节中 NGF- β 含量无显著差异。在角膜基质层检测到神经与 TrkA 共表达, 并且在糖尿病大鼠角膜基质和三叉神经节中 TrkA 表达量较正常大鼠的低, 滴加 NGF 能进一步降低角膜基质中 TrkA 的表达, 却促进三叉神经节中 TrkA 的表达。糖尿病大鼠角膜基质中 Akt 和 p-Akt 的含量都较正常大鼠的低, 滴加 NGF 能使角膜基质中 Akt 和 p-Akt 的含量都增加, Akt, p-Akt, p75NTR, β -tubulin-III 在糖尿病大鼠和正常大鼠三叉神经节中的含量无显著性差异, 滴加 NGF 也无显著性差异。

结论: 糖尿病可以引起角膜神经密度下降, 角膜敏感度降低, 角膜上皮损伤后

愈合延迟；NGF 能够促进糖尿病大鼠角膜神经的修复，提高角膜敏感度并且能促进角膜上皮愈合，NGF 的作用机制与 NGF-TrkA-Akt 信号通路有关。

关键词：NGF TrkA 角膜神经 糖尿病角膜病变

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective: To explore the effect of nerve growth factor (NGF) on corneal nerves of diabetic rats, and to explain the molecular mechanism.

Methods: Type 1 diabetes model rats were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). Six weeks after the model were successfully established, corneal sensitivity were tested between the control and diabetic rats, then the left or the right eyes of control and diabetic rats were made as Ctrl + BSA group or Ctrl + NGF group and DM + BSA group or DM + NGF group. Based on the groups, the eyes of four groups were received topical application of BSA or NGF eye drops (15ug/mL) three times a day (9 am, 13 pm and 17 pm) for two weeks, and then the corneal sensitivity and part of corneal nerves density were detected, in the next, the same area of epithelium of remaining corneas were scraped and continued eye drops for one week, during the week, the repaired area of corneal epithelium were measured through Sodium fluorescein staining in 0, 24, 36, 48hours after scraped and the corneal sensitivity were measured in 2, 4 and 7 days after scraped. At last, the cornea, corneal epithelium, corneal stroma and trigeminal ganglion were separated from rats, Immunofluorescence staining was used to evaluate the corneal nerves density and the co-expressing of TrkA and corneal nerves, ELISA was used to test the level of beta NGF in corneal epithelium, stroma of cornea and trigeminal ganglion, Western blot was used to test the TrkA, p75NTR, β -tubulin-III, Akt and p-Akt in corneal stroma or trigeminal ganglion.

Results: The corneal sensitivity of diabetic rats was lower than that of Ctrl rats in the sixth, eighth and ninth week, and the repair rate of corneal sensitivity were also slower, however, topical application of NGF eye drops could promote the repair of corneal sensitivity in diabetic rats. The central corneal nerves density of DM + BSA group were lower than that of Ctrl + BSA group and the density of DM + NGF group was higher than that of DM + BSA group in the eighth and ninth week. The repair rate of corneal epithelium in diabetic rats was also slower than that of control rats, topical

application of NGF eye drops could promote the repair of corneal epithelium in control and diabetic rats. The levels of NGF- β were not significantly different in the corneal epithelium, corneal stroma and trigeminal ganglion between DM + BSA group and Ctrl + BSA group, but the level in the groups treated with NGF eye drops were higher in corneal epithelium and corneal stroma than that treated with BSA eye drops. The levels of TrkA in the corneal stroma of diabetic rats were lower than that of control rats; what is more, the level in corneal stroma was much lower when treated with NGF, but the level in trigeminal ganglion was increased. Akt and p-Akt were down regulated in the corneal stroma of DM + BSA group, compared with them in Ctrl + BSA group, treated with NGF can promote them increased, and p75NTR, β -tubulin-III, Akt and p-Akt were no significant difference in trigeminal ganglion.

Conclusion: Corneal nerve density, corneal sensitivity and corneal epithelial wound healing were decreased in diabetic rats, NGF can promote the repair of corneal nerve of diabetic rats, and then improved diabetic keratopathy, the mechanism of NGF repairing corneal nerves is associated with NGF-TrkA-Akt signaling pathway.

Key words: NGF; TrkA; Corneal Nerves; Diabetic Keratopathy

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 前言	1
1.1 糖尿病	1
1.2 糖尿病眼部并发症	1
1.3 糖尿病角膜病变	2
1.3.1 糖尿病角膜病变的临床特征	2
1.3.2 糖尿病动物模型	2
1.3.3 糖尿病角膜病变的病理机制	3
1.3.4 糖尿病角膜病变的治疗	4
1.4 角膜神经	6
1.4.1 角膜神经的来源	6
1.4.2 角膜神经的分布	6
1.4.3 角膜神经的功能	6
1.4.4 糖尿病引起角膜神经的改变	7
1.5 神经营养因子	7
1.5.1 NGF 在角膜细胞中的表达和作用	8
1.5.2 NGF 药物在中国的现状	8
1.6 研究意义	9
第二章 实验材料与方法	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 实验动物	10
2.1.2 主要化学试剂与耗材	10
2.1.3 主要仪器	11
2.1.4 主要抗体	13
2.1.5 主要溶液配制	13
2.2 实验方法	16

2.2.1 糖尿病大鼠模型建立.....	16
2.2.2 全角膜免疫荧光染色.....	17
2.2.3 蛋白印迹实验.....	17
2.2.4 ELISA 试剂盒检测 NGF- β 的变化.....	22
第三章 实验结果	25
3.1 I 型糖尿病大鼠模型的建立.....	25
3.2 糖尿病大鼠角膜敏感度降低.....	26
3.3 NGF 延缓糖尿病大鼠角膜神经损伤.....	26
3.4 NGF 促进糖尿病大鼠角膜神经的修复.....	28
3.5 TrkA 与角膜基质层神经共表达.....	30
3.6 角膜基质中相关蛋白的变化.....	30
3.7 三叉神经节中相关蛋白的变化.....	32
第四章 讨 论	34
4.1 糖尿病大鼠角膜神经损伤模型的鉴定.....	35
4.2 NGF- β 和 pro-NGF 促进神经生长和凋亡的平衡.....	36
4.3 角膜神经的修复.....	37
4.4 神经营养因子的共性和特性.....	38
第五章 结 论	40
参考文献	41
致 谢	49

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Diabetic ocular complications	1
1.3 Diabetic keratopathy	2
1.3.1 The clinical characteristics of diabetic keratopathy	2
1.3.2 Diabetic models	2
1.3.3 The pathological mechanism of diabetic keratopathy	3
1.3.4 Treatment of diabetic keratopathy	4
1.4 Corneal nerves	6
1.4.1 Origin of corneal nerves	6
1.4.2 Distribution of corneal nerves	6
1.4.3 Functions of corneal nerves	6
1.4.4 Changes in corneal nerves caused by diabetes	7
1.5 Neurotrophins	7
1.5.1 Expression and role of NGF in corneal cells	8
1.5.2 Current NGF drugs in China	8
1.6 Research meaning	9
Chapter 2 Materials and methods	10
2.1 Materials	10
2.1.1 Experimental animal	10
2.1.2 Reagents and consumables	10
2.1.3 Experimental instruments	11
2.1.4 Antibodies	13
2.1.5 Preparation reagents	13
2.2 Methods	16

2.2.1 Diabetic rat model.....	16
2.2.2 Immunofluorescence staining of cornea	17
2.2.3 Western blot analysis	17
2.2.4 Detection of NGF- β by ELISA Kit	22
Chapter 3 Results.....	25
3.1 Establish type I diabetic rat model.....	25
3.2 Decreased corneal sensitivity in diabetic rats	26
3.3 NGF delayed corneal nerve injury in diabetic rats	26
3.4 NGF promotes the repair of corneal nerve in diabetic rats.....	28
3.5 Co expression of TrkA and corneal stromal nerves.....	30
3.6 Changes of related proteins in corneal stroma	30
3.7 Changes of related proteins in trigeminal ganglia.....	32
Chapter 4 Discussions	34
4.1 The identification of corneal nerve injury model in diabetic rats	35
4.2 NGF and pro-NGF promote the balance of nerve growth and apoptosis ...	36
4.3 Recovery of corneal nerves.....	37
4.4 The similarities and characteristics of neurotrophins.....	38
Chapter 5 Conclusions.....	40
Reference.....	41
Acknowledgement.....	49

第一章 前言

1.1 糖尿病

糖尿病 (Diabetes Mellitus, DM) 是一种在全球备受关注的慢性代谢异常性疾病, 主要特征是血糖持续处于高水平, 并伴随有脂肪和蛋白质代谢紊乱。糖尿病主要分为一型糖尿病, 二型糖尿病, 妊娠期糖尿病, 其他特殊类型糖尿病^[1]。据2013年数据显示, 全球糖尿病患者共有3.82亿, 而中国糖尿病患者人数已经达到9840万, 已经成为糖尿病患者最多的国家^[2]。各种类型的糖尿病均以长期的高血糖为特征, 逐渐会引起糖尿病特异性的视网膜、肾小球以及外周神经微血管病变, 最终会导致失明、终末期肾脏病变以及各种外周神经衰弱等一系列疾病; 同时, 糖尿病也会加速动脉粥样硬化性大血管病变, 影响动脉供应心脏、脑和下肢, 最终会增加糖尿病患者心肌梗死、中风和截肢的风险。大量的具有前瞻性的临床研究表明高血糖与糖尿病微血管病变综合症联系紧密, 高血糖和胰岛素抵抗在糖尿病大血管并发症的发病机制中发挥着重要作用^[3]。

1.2 糖尿病眼部并发症

不论是在发达国家或者是发展中国家, 糖尿病对视力健康的影响非常严重, 糖尿病能够引起包括糖尿病视网膜病变, 青光眼, 白内障以及糖尿病角膜病变等多种眼部并发症^[4, 5]。糖尿病视网膜病变是一种渐进的致盲性疾病, 影响着全球420万人, 尽管到目前为止, 糖尿病视网膜病变病因还未被完全阐明, 但是研究表明已有多条信号通路与糖尿病视网膜病变的发病机制有关, 其中包括多元醇的积累, 氧化应激, 血管生成因子过量表达以及蛋白激酶C的激活^[3, 6, 7]。糖尿病患者的青光眼患病率较非糖尿病患者有显著提升, 糖尿病患者更容易得一种罕见类型的青光眼, 称为新生血管性青光眼, 这种形式的青光眼, 新生血管长在虹膜上, 这些血管阻塞眼内正常的流体流出眼外, 从而提升眼压^[8]。白内障是糖尿病患者视力损伤的主要原因之一, 30-75岁的二型糖尿病患者患白内障的几率也较非糖尿病患者高, 同时糖尿病也会降低白内障手术的安全性和治愈率。

糖尿病已经被认定为干眼综合症的主要系统性风险因素之一，据报道，在65岁以上的糖尿病患者中，干眼的患病率随着糖尿病病程的增长而增加，女性比男性多出50%，而且干眼的发病率也与糖化血红蛋白的水平有关，糖化血红蛋白水平越高，干眼的发病率越高^[4]。因此糖尿病对眼部的影响是多方面的，并且难以治愈。

1.3 糖尿病角膜病变

早至1858年有研究学者观察到糖尿病患者角膜出现异常，然而直到1981年，糖尿病性角膜病变 (Diabetic Keratopathy, DK) 的概念才首次被提出。有研究表明，47%—64%的糖尿病患者会出现角膜病变^[11]。目前糖尿病角膜病变在临床上难以治愈，关于糖尿病角膜病变的研究近年来才逐渐引起重视。

1.3.1 糖尿病角膜病变的临床特征

正常的角膜是由感觉神经，交感神经，副交感神经支配的富含神经末梢的透明组织，角膜中丰富的神经增强了角膜的感觉功能，也具有营养和代谢作用。糖尿病患者会出现角膜敏感度下降，并且下降的程度与糖尿病病程长短和血糖控制情况有关^[12]。完整的角膜上皮可以作为屏障保护眼部免受感染，也有助于角膜透明度和硬度的维持，因此上皮损伤后的再生对于视觉的修复非常重要，然而与非糖尿病患者相比，糖尿病患者角膜上皮出现损伤后会出现愈合延迟甚至反复脱落的现象^[13, 14]。糖尿病患者也会出现神经营养性角膜病变，从发病过程来分主要分三个阶段：第一阶段特征是角膜上皮细胞增生并且上皮细胞不规则，点状上皮糜烂，表面新生血管和基质瘢痕的生成；第二阶段特征是上皮持续性缺损，后弹力层皱褶和基质肿胀；第三阶段特征是形成角膜溃疡，并有可能进展为基质溶解并最终导致角膜穿孔^[15]。

1.3.2 糖尿病动物模型

理想动物模型的建立是对糖尿病病因、发病机理及其药物治疗进行研究的重要途径，糖尿病动物模型主要分为三类：实验性糖尿病动物模型，自发性糖尿病动物模型和转基因糖尿病动物模型。实验性糖尿病动物模型包括胰腺切除性糖尿病模型，化学性糖尿病模型，STZ 联合高脂饲料喂养造成的糖尿病模型，

根据实验的特殊性，也有一些免疫性、激素性和病毒性糖尿病模型。自发性糖尿病动物模型是指未经人工处置，通过遗传育种培养而保留下来糖尿病动物，自发性糖尿病动物常用于研究糖尿病的病因和发病机制的研究，应用较为广泛的有中国地鼠、BB (diabetes-prone Bio Breeding) 大鼠、NOD 小鼠，*ob/ob*、*db/db*、*KK*、*NZO* 小鼠、Obese Zucker、Goto-Kakizaki (GK)、SHR/N-cp、OLETF 大鼠等，其中 BB 大鼠和 NOD 小鼠是常用来进行 I 型糖尿病药物研究的动物模型，*ob/ob*、*db/db* 和 Obese Zucker 是 II 型糖尿病常用动物模型^[16]。转基因糖尿病动物模型是通过遗传工程的手段对动物基因组的结构或组成进行定向改变产生的，有关 I 型、II 型糖尿病和妊娠糖尿病以及青少年发病的成人型糖尿病转基因动物模型均有报道，例如 *KK-Ay* 小鼠动物模型，*MODY3* 模型杂合体 *C57BL/KsJ-db/+* 小鼠等。

STZ 诱导的高血糖 SD 大鼠动物模型长期以来一直被用于 I 型糖尿病研究，与其它实验性糖尿病动物模型相比，此模型操作简单，成模率较高并且稳定，试验周期较短。与正常 SD 大鼠相比，STZ 诱导的高血糖 SD 大鼠体重减轻，身体长度减小，而且在角膜病变方面，角膜孟加拉玫瑰红染色加强，泪液分泌量减少，角膜敏感度减弱，上皮愈合延迟，然而角膜大小、角膜厚度、没有明显的变化^[17]，这些变化与 I 型糖尿病患者症状高度相似，所以 STZ 诱导的高血糖 SD 大鼠可以作为 I 型糖尿病角膜病变的动物模型。

1.3.3 糖尿病角膜病变的病理机制

糖尿病角膜病变的病理变化主要表现为：角膜形态和脆性的改变，基底膜增厚，上皮粘附和愈合率下降，内皮细胞泵功能异常以及氧和山梨醇的代谢异常^[14]。综合目前的研究，引起糖尿病角膜病变的机制可以从以下四个方面来解释：一，醛糖还原酶和基质金属蛋白酶的改变，人和大鼠的角膜上皮和内皮中存在醛糖还原酶，在糖尿病大鼠角膜中，葡萄糖和半乳糖的增加，醛糖还原酶活性增加，角膜中山梨醇和半乳糖醇的积累，导致角膜上皮细胞缺损，内皮细胞缺失引起角膜水肿，同时也会引起神经末梢减少最终引起角膜敏感度下降，局部用药醛糖还原酶抑制剂可以明显改善糖尿病角膜病变引起的症状。有研究表明基质金属蛋白酶在糖尿病角膜病变的过程中也发挥着作用，高糖状态下会引起基质金属蛋白酶的表达增加和活性增强，从而损伤上皮基底膜和IV型，限

制上皮细胞迁移，最终导致愈合延迟。二，糖基化终末产物的积累，糖基化终末产物是一组特异性的蛋白和脂质非酶糖基化和氧化产物，在糖尿病患者的角膜基质，后弹力膜和上皮基底层中，糖基化终末产物异常增加，氧化应激和核因子 kappa-B 的激活，导致核 DNA 损伤，加强了角膜内皮细胞和神经细胞的凋亡，最终导致角膜内皮和角膜神经功能减弱，从而引起长期的糖尿病角膜病变。当用药氨基胍（糖基化终末产物抑制剂）后，糖尿病引起的角膜基质细胞变性、胞浆空泡形成和角膜基质水肿等角膜结构异常得到明显改善^[18-20]。三，糖尿病能够引起角膜内皮细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶活性降低，导致角膜形态和通透性发生改变，最终引起眼内压升高，角膜代偿失调^[21, 22]。四，研究表明，糖尿病角膜患者的角膜中的细胞因子，包括胰岛素样生长因子1（IGF-1）、TGF- β 等表达均有所下调^[23]。糖尿病患者角膜中IGF-1 下降，角膜上皮迁移能力减弱，角膜上皮的愈合速度减慢^[24]，糖尿病患者角膜中TGF- β 下降会导致创面细胞的增殖能力和细胞外基质的合成速度减慢^[25]，另外，上皮生长因子受体和阿片生长因子及其受体通路也参与了糖尿病角膜上皮损伤修复的过程^[14, 26, 27]。因此，众多生长因子都参与了糖尿病角膜病变的过程，但究竟是哪种或者哪几种细胞因子主导调控还没有一致的结论。

1.3.4 糖尿病角膜病变的治疗

糖尿病能够引起角膜敏感度下降，角膜上皮再生延迟和神经营养性角膜溃疡等症状，已经有多种药物从不同的病理机制角度来进行治疗。许多临床前和临床试验表明多种细胞因子能显著提高上皮细胞的增殖能力和迁移能力，从而促进伤口愈合^[28]。胰岛素样生长因子1（IGF-1）是一种多功能调节肽，联合 P 物质（substance P, SP）用药能够显著促进上皮细胞增殖^[29]，在临床试验中，应用含有 IGF-1 和 SP 的眼药水来治疗出现神经营养性角膜病变和表层点状角膜病变的糖尿病患者，效果显著^[30, 31]。神经生长因子（NGF）和其受体（TrkA）在人的角膜上皮中有表达^[32]，有体外试验表明 NGF 能够诱导兔的角膜上皮细胞增殖和分化，也能显著提升中重度神经营养性角膜炎患者的角膜敏感度和角膜上皮愈合速率，对眼睛化学烧伤，神经营养性角膜溃疡等一系列的角膜病变有显著的疗效。但是NGF也会引起眼睛充血和疼痛等副作用^[28]。阿片类生长因子（OGF）是含有 Tyr-Gly-Gly-Phe-Met 序列的五肽，在牛、兔的角膜上皮中，

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库