

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.09.0977

· 论 著 ·

链脲佐菌素构建糖尿病小鼠视网膜病变模型及评价

张昊瑞¹, 高鑫², 赵子畅², 沈炜^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院学员二大队6队, 上海200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院眼科, 上海200433

[摘要] **目的** 建立链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠视网膜病变模型, 研究早期糖尿病小鼠视网膜的病理改变及其发展过程中血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR1、VEGFR2)在动物模型中的表达情况。**方法** 6~8周龄C57BL/6J小鼠腹腔连续注射STZ(55 mg/kg)5 d, 注射后1周时测量空腹血糖浓度, 将糖尿病模型建立成功的小鼠与对照组小鼠均喂养5个月。注射后5个月时, 通过石蜡切片H-E染色、伊文思蓝灌注造影、视网膜血管网铺片等方法分析糖尿病小鼠视网膜组织形态变化。通过实时定量PCR、蛋白质印迹法分析糖尿病视网膜病变过程中VEGF及其受体VEGFR1、VEGFR2的表达情况。**结果** 与对照组相比, 注射后1周、1~5个月时模型组小鼠血糖水平均升高(均高于16.5 mmol/L), 差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。注射后5个月时模型组小鼠视网膜全层变薄, 感光细胞层、内核层及外核层细胞数量减少, 排列紊乱; 血管走行迂曲, 出现渗漏及渗出斑; 血管内皮细胞数量增加, 形态改变, 周细胞数量减少, 可见无细胞毛细血管、管腔闭塞; VEGF、VEGFR1、VEGFR2的蛋白质和mRNA表达均增加, 与对照组相比差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。**结论** 成功构建糖尿病小鼠视网膜病变模型, 该模型表明在糖尿病发展5个月后出现增殖性糖尿病视网膜病变, 且糖尿病小鼠视网膜中VEGF、VEGFR1和VEGFR2表达水平均上升。

[关键词] 糖尿病视网膜病变; 链脲佐菌素; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体

[中图分类号] R 587.26 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)09-0977-07

Streptozotocin-induced diabetic retinopathy in mice: model establishment and evaluation

ZHANG Hao-ru¹, GAO Xin², ZHAO Zi-chang², SHEN Wei^{2*}

1. The Second Student Team, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Ophthalmology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish streptozotocin (STZ)-induced diabetic retinopathy model in mice, and to observe the pathological changes of the retina in early diabetic stages and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)1 and VEGFR2 in the mouse model. **Methods** C57BL/6J mice, aged 6-8 weeks, received intraperitoneal injection of STZ (55 mg/kg) once a day for 5 d. The fasting blood glucose concentration was measured 1 week after injection. The diabetic and control mice were fed for 5 months. Then the morphological changes of retina in diabetic mice were analyzed by H-E staining, Evans blue perfusion angiography and retinal vascular network digestion. The expression of VEGF and its receptors VEGFR1, VEGFR2 in diabetic retinopathy was analyzed by quantitative real-time PCR and Western blotting. **Results** Compared with the control group, the blood glucose levels of the model group were significantly increased 1 week, 1 to 5 months after injection (all higher than 16.5 mmol/L, all $P < 0.01$). At 5 months after injection, the whole retina of the model group became thinner; the number of photoreceptor cells, inner and outer nuclear cells were decreased and disorderly arranged; the blood vessels went tortuously with leakage and leakage spots; the number of vascular endothelial cells was increased, with altered morphology; the number of peripheral cells was decreased; and there were no cellular capillaries and lumen occlusion. The expression levels of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 protein and

[收稿日期] 2019-07-09 **[接受日期]** 2019-08-26

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81700839). Supported by Youth Project of National Natural Science Foundation of China (81700839).

[作者简介] 张昊瑞, 海军军医大学(第二军医大学)2016级临床医学专业五年制本科学员. E-mail: stephenzhr123@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161999, E-mail: shenwei@smmu.edu.cn

mRNA were significantly increased in the model group compared with the control group (all $P < 0.01$). **Conclusion** Diabetic retinopathy mouse model has been successfully constructed, with proliferative diabetic retinopathy appearing 5 months after diabetes, and the expression levels of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 are increased in the retina of diabetic mice.

[Key words] diabetic retinopathy; streptozotocin; vascular endothelial growth factors; vascular endothelial growth factor receptors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(9): 977-983]

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, 同时也是导致糖尿病患者失明的主要原因^[1-2]。研究表明 DR 在 1 型糖尿病和 2 型糖尿病都有发生^[3]。随着糖尿病患者数量的增加, DR 已成为糖尿病患者视力损害的主要原因^[4]。DR 的整个病理过程包括视网膜毛细血管周细胞丢失、基底膜增厚、内皮屏障功能丧失、血-视网膜屏障破坏等重要病理改变, 并导致视网膜缺血, 而视网膜缺血则会使血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 水平升高^[1-2]。研究表明, VEGF 过量表达与视网膜新生血管形成有关, 而视网膜新生血管形成则可引起视网膜出血、黄斑水肿、视网膜脱离及新生血管性青光眼等, 造成严重的视力损害, 最终导致失明^[5]。DR 的发展过程可以分为 2 个阶段: 早期非增生性糖尿病视网膜病变 (non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR) 和晚期增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR), 前者主要以视网膜通透性增加和视网膜内出血为特征, 后者主要表现为视网膜新生血管形成^[1]。在 NPDR, 高糖诱导的视网膜病变主要包括毛细血管周细胞缺失、血管层变薄及血-视网膜屏障破坏, 进一步导致视网膜缺血、缺氧。当病情发展到 PDR 时, 则会出现新生血管形成, 并最终导致严重的视力损害^[1]。

为了更好地探究 DR 在分子和细胞水平上的发展, 研究者们对糖尿病动物模型进行了广泛的研究^[6-7]。其中, 啮齿类动物模型 (主要是大鼠、小鼠) 与人类的遗传背景相似。DR 的啮齿类动物模型因品种、品系、诱导糖尿病的方法和糖尿病持续时间而异。相比大鼠, 小鼠模型操作简单、成本相对低廉、繁殖周期短, 先进的基因操作技术如组织特异性转基因表达和靶向基因敲除等, 已经提高了小鼠模型在特别需要基因工程模型的实验中的相对重要性。目前, 选择代谢和病理生理机制的遗传改

变已经成为可能, 小鼠模型在研究早期 DR 的发病机制中有重要价值^[7]。

目前常用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导糖尿病动物模型, 表现为快速的高血糖 (注射后 3 d) 和早期糖尿病的一些病理变化, 如视网膜周细胞和毛细血管丢失、血管基底膜增厚、血管闭塞和血管通透性增加^[8]。

研究表明, VEGF 在视网膜新生血管形成中发挥着关键作用, 而 NPDR 出现的视网膜缺血、缺氧是导致 VEGF 水平升高的重要原因^[1]。在 DR 发生、发展过程中, VEGF 家族、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1)、细胞外基质成分、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 等促血管生成因子都参与了视网膜新生血管的调节^[9-10]。其中, VEGF 被认为是在病理和病理生理条件下调控血管生成过程的中心调控因子^[11]。VEGF 通过激活其 2 个酪氨酸激酶受体血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 1 和 VEGFR2, 刺激血管内皮细胞增殖、促进新生血管形成, 并进一步促进 DR 的发展^[12]。既往报道更多关注于对 VEGF 的研究, 对其受体 VEGFR1 和 VEGFR2 的变化在 DR 中的作用报道不多。

建立糖尿病小鼠视网膜病变模型是研究 DR 的重要方法。本研究采用小剂量多次注射 STZ 的方法建立糖尿病小鼠模型, 观察糖尿病小鼠模型视网膜组织学形态及微血管结构的改变, 检测视网膜中 VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 的表达水平, 为研究视网膜病变的发病机制及治疗方法提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠 36 只, 体质量 18~22 g, 由海军军医大学 (第二军

医大学) 实验动物中心提供(动物合格证号: 20180006000296)。使用标准颗粒饲料喂养, 不限食水, 饲养室内通风状况良好, 温度控制在 $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 相对湿度为 50%。

1.2 糖尿病小鼠模型的构建 将小鼠随机分为对照组(12只)和模型组(24只)。模型组小鼠按照 55 mg/kg 连续 5 d 腹腔注射 STZ (美国 Sigma 公司, S0130-1G), 注射前禁食 6 h, STZ 溶于柠檬酸钠缓冲液中(0.1 mol/L, pH 4.2); 对照组小鼠腹腔注射等量的柠檬酸钠缓冲液。末次注射 7 d 后尾静脉取血测量血糖, 若 $>16.5 \text{ mmol/L}$ 可确定糖尿病小鼠模型构建成功。血糖监测使用长沙三诺生物传感股份有限公司易准血糖仪(GA-3型)及血糖试条。糖尿病模型构建成功后将模型组小鼠和对照组小鼠继续饲养, 正常饮食, 此后每隔 30 d 监测血糖 1 次。

1.3 组织学方法检测小鼠视网膜组织形态变化

1.3.1 H-E 染色 糖尿病小鼠模型建立成功 5 个月后, 采用过量 CO_2 吸入法处死小鼠。取双侧眼球, 置于 FAS 眼球固定液(美国 Merck 公司)中, $4 ^\circ\text{C}$ 固定 24 h。梯度乙醇脱水、二甲苯透明后石蜡包埋, 沿平行于角膜到视盘矢状位的平面连续切片, 切片厚度为 $4 \mu\text{m}$ 。H-E 染色后显微镜下观察。

1.3.2 伊文思蓝灌注造影 将 1 g 伊文思蓝(上海 Maclin 公司)溶于 50 mL 生理盐水中, $4 ^\circ\text{C}$ 低温避光保存, 使用前预热至 $37 ^\circ\text{C}$ 。腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠(上海隆盛化工有限公司, CAS: 57-33-0)麻醉后, 将小鼠仰卧位固定, 并将头部偏向一侧, 沿锁骨中线至下颌角连线做皮肤切口, 分离皮下组织和脂肪, 暴露一侧上腔静脉, 压迫心前区使其充盈, 使用胰岛素针刺上腔静脉, 缓慢注射伊文思蓝溶液 0.2 mL。注射后观察到小鼠口唇及四肢变蓝后再循环 5~10 min 后处死小鼠, 摘取眼球, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 2 h, 在手术显微镜下剥离视网膜。将视网膜以视盘为中心做放射性切开, 呈四叶草样, 平铺于载玻片上, 中性树胶封片, 于共聚焦显微镜下观察。

1.3.3 视网膜血管网铺片 采用过量 CO_2 吸入法处死小鼠, 取双侧眼球, 将眼球置于 4% 多聚甲醛溶液中, $4 ^\circ\text{C}$ 固定 2 h。在手术显微镜下分离视网膜, 用磷酸盐缓冲液清洗干净后继续置于 4% 多聚

甲醛溶液中, $4 ^\circ\text{C}$ 固定 24 h, 双蒸水清洗视网膜 12 h。然后使用 3% 胰酶在 $37 ^\circ\text{C}$ 水浴下消化视网膜 1.5 h。将视网膜置于双蒸水中, 在显微镜下祛除内界膜及神经纤维组织, 重复水洗至视网膜血管网透明。将透明的血管网转移至载玻片上, 展平, 自然晾干后进行血管网 H-E 染色, 显微镜下观察。

1.4 分子生物学方法检测 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 蛋白质与 mRNA 表达

1.4.1 蛋白质印迹法 将显微镜下分离的 1 个小鼠视网膜放入 1.5 mL EP 管中, 加入 80 μL RIPA 细胞裂解液(上海碧云天生物技术研究)和 3 颗研磨粒, 立即放入组织研磨器中 60 Hz 研磨 90 s, $4 ^\circ\text{C}$ $17\ 468.75 \times g$ 离心 5 min; 取上清置于新的 1.5 mL EP 管中, $4 ^\circ\text{C}$ 摇床裂解 30 min, 每个样品加入 30 μL 上样缓冲液, 沸水煮 15 min, 样品制作完成。加入 15 μL 蛋白质样品于凝胶上样孔内进行电泳, 然后将凝胶中的蛋白质转印至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 280 mA 恒流 90 min, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2.5 h 后, 剪切目标条带分别加入 VEGF 一抗(美国 Affinity Biosciences 公司)、VEGFR1 一抗和 VEGFR2 一抗(武汉三鹰生物技术有限公司)和内参照 GAPDH 一抗(美国 Abclonal 公司)孵育, $4 ^\circ\text{C}$ 摇床过夜(14~16 h)。用 $1 \times$ Tris 盐酸盐缓冲液 + Tween 洗涤 3 次后, 加入抗兔二抗(美国 Invitrogen 公司), 室温孵育 2 h, 用 $1 \times$ Tris 盐酸盐缓冲液 + Tween 洗涤 3 次后, 置于凝胶成像仪(美国 Syngene 公司)曝光显影。

1.4.2 实时定量 PCR 将显微镜下分离的 2 个小鼠视网膜放入 1.5 mL EP 管中, 加入 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司), 同 1.4.1 项下方法研磨组织; 将上清液转移至新的 EP 管中, $4 ^\circ\text{C}$ 裂解 30 min, 采用 TRIzol 一步法提取视网膜总 RNA。使用酶标仪检测总 RNA 浓度, 采用反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)将等量的 RNA 反转录合成 cDNA。使用 SYBR 定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)对相同量的 cDNA 进行 PCR。反应条件: $50 ^\circ\text{C}$ 2 min, $95 ^\circ\text{C}$ 10 min, $95 ^\circ\text{C}$ 5 s, $60 ^\circ\text{C}$ 30 s 40 个循环。检测对照组和模型组小鼠视网膜 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 的 mRNA 表达水平, 以 GAPDH 为内参照。引物序列如下: VEGF 正

义引物 5'-GCT ACT GCC GTC CGA TTG AG-3', 反义引物 5'-ACT CCA GGG CTT CAT CGT TAC AG-3'; *VEGFR1* 正义引物 5'-CCT GAT GGG CAA AGA ATA ACA T-3', 反义引物 5'-ATT TGG ACA TCT AGG ATT GTA TTG G-3'; *VEGFR2* 正义引物 5'-GTG GTA AGT TGC GAT TGT TGT G -3', 反义引物 5'-TGA ACA TTG GCC TTC TTT GAT A-3'; *GAPDH* 正义引物 5'-CAA TGA ATA GGG CTA CAG CA-3', 反义引物 5'-AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG-3'。使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法分析数据。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

表 1 对照组小鼠与链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠模型在注射后不同时间点血糖水平

Tab 1 Blood glucose levels in control mice and streptozotocin-induced diabetic mice at different time points after injection

Group	$c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}), \bar{x} \pm s$					
	1 week	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months
Control <i>n</i> =12	6.60±0.45	7.15±0.58	7.07±0.66	7.07±0.60	6.73±0.52	6.81±0.61
Model <i>n</i> =24	22.87±2.77**	22.63±2.55**	24.67±2.57**	24.04±2.71**	22.38±2.77**	22.96±3.14**

***P*<0.01 vs control group

2 结果

2.1 糖尿病小鼠模型血糖变化 对照组与模型组小鼠在注射前血糖水平差异无统计学意义 [(6.81±0.61) mmol/L vs (6.82±0.36) mmol/L, *P*>0.05]。对照组注射前后血糖水平差异无统计学意义 (*P*>0.05)。模型组小鼠注射 STZ 1 周后出现多饮、多食、多尿等症状; 检测结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠血糖水平升高, 差异有统计学意义 (*P*<0.01), 表明模型组小鼠成功构建糖尿病模型。继续饲养至 1~5 个月时模型组小鼠血糖水平均高于对照组, 差异均有统计学意义 (*P*均<0.01)。见表 1。

2.2 糖尿病小鼠视网膜病变模型视网膜组织学变化, 可见无细胞毛细血管形成, 并出现管腔闭塞。

2.2.1 H-E 染色结果 对照组小鼠视网膜全层细胞排列整齐, 各细胞层细胞核染色清晰, 组织形态未见异常 (图 1A、1B)。造模 5 个月时, 模型组小鼠视网膜明显变薄, 神经节细胞数量减少, 但感光细胞层厚度增加 (图 1C、1D)。与对照组小鼠视网膜 (图 1B) 比较, 模型组小鼠视网膜内核层和外核层的细胞分布紊乱, 数量明显减少 (图 1D)。

2.2.2 伊文思蓝灌注造影结果 共聚焦显微镜下可见对照组小鼠视网膜血管层次清晰, 走行正常, 无迂曲、渗漏等 (图 2A)。模型组小鼠的视网膜血管走行迂曲, 结构紊乱, 层次模糊, 出现渗漏及渗漏斑 (图 2B)。

2.2.3 视网膜血管网铺片 光学显微镜下正常组小鼠视网膜血管网铺片结果如图 3A 所示, 视网膜血管走行流畅, 管径大小均匀一致, 管壁的内皮细胞核呈椭圆形、淡染, 在血管周边可见圆形的周细胞核、深染, 分布均匀。图 3B 所示的模型组小鼠视网膜血管扭曲, 走行不规则, 周细胞数量明显减少, 内皮细胞增殖, 呈椭圆形、梭形或多边形, 核深

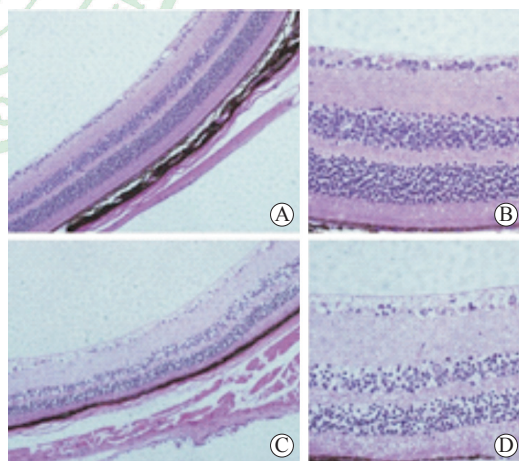


图 1 H-E 染色观察链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠模型视网膜病变情况

Fig 1 H-E staining of diseased retina in streptozotocin-induced diabetic mice

A, B: Normal retina; C: The thinned retina 5 months after diabetic mouse model establishment; D: Five months after diabetic mouse model establishment, the cells in the inner nuclear layer and outer nuclear layer of the retina were in disorder and the number was decreased obviously. Original magnification: $\times 100$ (A, C), $\times 200$ (B, D)

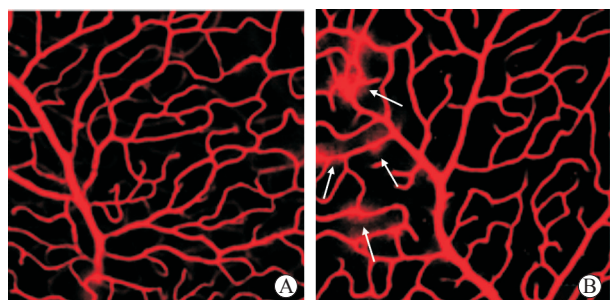


图2 共聚焦显微镜下观察链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠模型视网膜伊文思蓝灌注造影结果

Fig 2 Retinal vascular Evans blue perfusion angiography in streptozotocin-induced diabetic mice under confocal microscopy

A: Normal retinal vessels; B: Five months after diabetic mouse model establishment, the retinal vessels of mice in model group were distorted, structurally disordered, and the layers were blurred (the white arrows indicate leakage and leakage spots). Original magnification: $\times 200$

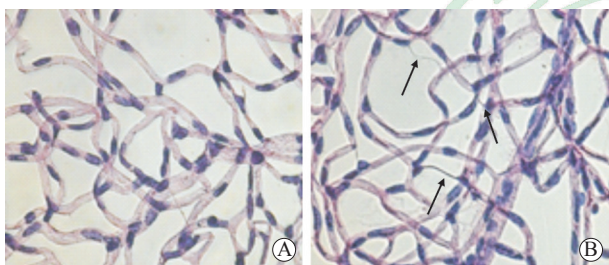


图3 链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠模型视网膜血管网铺片结果

Fig 3 Retinal vascular network digestion of streptozotocin-induced diabetic mice

A: Normal retinal vessels; B: Five months after diabetic mouse model establishment, the mice in model group had twisted retinal vessels with irregular walking, significantly decreased number of pericytes, and proliferated endothelial cells with oval, fusiform or polygonal nuclear, deeply dyed (black arrows indicate the cell-free capillaries and lumen occlusion). H-E staining. Original magnification: $\times 200$

2.3 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 蛋白质与 mRNA 的表达情况 图 4A 显示, 与对照组小鼠相比, 造模 5 个月时模型组小鼠视网膜中 VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 的蛋白质表达量增高。图 4B 显示, 模型组小鼠 VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 的 mRNA 表达水平升高, 与对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 与蛋白质表达一致。上述结果表明模型组小鼠视网膜出现病理性新生血管的可能性较高。

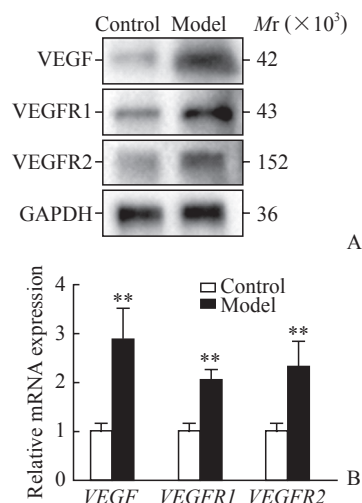


图4 链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠模型视网膜中 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 蛋白质和 mRNA 表达

Fig 4 Protein and mRNA expression of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 in retina of streptozotocin-induced diabetic mice

A: Protein expression by Western blotting; B: mRNA expression by quantitative real-time PCR. VEGF: Vascular endothelial growth factor; VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

到 2035 年, 全世界糖尿病患者人数预计将增加至近 6 亿人, 这种疾病会导致许多长期的微血管和大血管并发症, 并对身体、情感和经济造成毁灭性的损害^[13]。DR 的发病机制复杂, 对其发展过程的研究一直是热点。

STZ 会破坏胰腺 β 细胞, 使胰岛素合成和分泌减少, 引起糖代谢紊乱, 导致血糖升高, 诱发糖尿病, 因此被广泛用于糖尿病动物模型的构建^[14-16]。啮齿类小动物生命周期短、易于繁殖饲养、成本小、易操作且短期可诱导大批模型, 是理想的实验对象。其中, 小鼠的基因和表型与人类相似, 小鼠模型能很好地模拟人类疾病, 且便于构建基因敲除动物模型, 因而被广泛使用。

既往采用单次大剂量注射 STZ 诱导的 DR 模型一般需要在 6 个月以上才出现典型的视网膜病理和形态学改变。相比之下, 本研究采用小剂量多次注射 STZ 的方法建立的 DR 模型, 不仅能够满足 DR 动物模型的实验需求, 而且具有成模率高、死亡率低、糖尿病病理改变明显和出现时间早等优点^[17]。目前糖尿病动物模型发生 DR 的具体时间仍未明

确,有研究表明 DR 在糖尿病动物模型构建成功 4 个月后才出现,但也有研究表明 DR 在糖尿病动物模型构建成功 6 个月后才出现。即使是建立相同的动物模型,不同实验室之间对 DR 的具体发生时间也不能达成一致^[14,18]。余增洋等^[19]研究表明,与正常小鼠相比,糖尿病小鼠模型构建成功后 5 个月时小鼠视网膜毛细血管出现增生并排列紊乱,神经节细胞层和内核层可出现增生的血管群,说明在糖尿病小鼠模型构建成功 5 个月后可观察到 DR 的典型特征性病理学改变。因此,本研究在糖尿病小鼠模型构建成功 5 个月时,通过 H-E 染色、伊文思蓝灌注造影、血管网铺片方法,以及检测视网膜中 VEGF 及其受体 VEGFR1 和 VEGFR2 的表达,研究糖尿病小鼠模型视网膜的病理学改变和分子水平的变化,判断本实验是否成功构建糖尿病小鼠 DR 模型,并进一步对糖尿病小鼠 DR 模型的构建和视网膜病理学改变的检测方法进行创新。

与传统的显微镜相比,本研究采用共聚焦显微镜观察血管的走行与分布更加清晰,并可观察到视网膜早期渗漏及渗漏斑的形成。本研究结果显示,在糖尿病小鼠模型构建成功 5 个月后,伊文思蓝灌注造影结果中即出现视网膜渗漏,视网膜血管网铺片结果中出现血管闭塞、内皮细胞增殖、周细胞凋亡减少及血管网结构紊乱等 DR 的典型表现,这表明本研究成功构建糖尿病小鼠 DR 模型。

VEGF 表达水平的升高与视网膜功能障碍密切相关^[20]。研究表明,VEGF/VEGFR 信号通路在血管生成中起着重要作用,抗 VEGF 治疗对于恶性肿瘤等血管生成相关性疾病的治疗非常重要^[21]。以前已有药物通过抗 VEGF 来治疗血管生成相关性疾病,贝伐珠单抗抗体、兰尼单抗抗体均是针对 VEGF 的全长抗体,临床上通常用于治疗恶性肿瘤,也被用于治疗 DR 和其他绒毛膜视网膜血管疾病^[22]。此外,玻璃体腔注射抗血管生成药物(尤其是 VEGF 抑制剂)也被认为是一种可行的临床治疗 DR 的方法^[22-23]。

已有多项研究报道 VEGF 在糖尿病动物模型中表达水平升高^[24-25],但目前对 VEGFR 的研究报道并不多。本研究结果显示,VEGF、VEGFR1、VEGFR2 的 mRNA 及蛋白质表达水平在糖尿病动物模型构建成功 5 个月后才升高。这进一步表明 VEGF 及其受体在 DR 发生、发展过程中发挥着

至关重要的作用。有文献表明,建模成功后 3、4 个月的小鼠并未出现新生血管形成,且视网膜中 VEGFR1 和 VEGFR2 表达水平并不升高,反而在糖尿病发展 5 个月后才出现新生血管时 VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 的表达均明显升高^[25-26]。这与本研究结果一致,这些与血管生成有关的重要分子表达水平的升高也为 PDR 糖尿病小鼠出现视网膜新生血管形成提供依据。我们猜想,实验小鼠个体之间的差异、生存环境、饮食和健康状况等都会影响糖尿病小鼠出现新生血管的具体时间,这些因素实际往往难以达到完全一致,因此会出现差异。

综上所述,本研究成功构建了糖尿病小鼠模型,模型组小鼠在喂养 5 个月时出现视网膜内皮细胞增殖、渗漏、血管闭塞、周细胞凋亡减少及血管网结构紊乱。同时检测到 DR 小鼠视网膜中 VEGF 及其受体 VEGFR1、VEGFR2 的 mRNA 和蛋白质表达水平均升高,证明它们在 DR 小鼠新生血管生成过程中有重要作用,为进一步揭示 DR 的发生机制及研究临床治疗药物提供了参考。

[参考文献]

- [1] CHEUNG N, MITCHELL P, WONG T Y. Diabetic retinopathy[J]. *Lancet*, 2010, 376: 124-136.
- [2] INFELD D A, O'SHEA J G. Diabetic retinopathy[J]. *Postgrad Med J*, 1998, 74: 129-133.
- [3] PELIKÁNOVÁ T. [Diabetic retinopathy: pathogenesis and therapeutic implications][J]. *Vnitr Lek*, 2016, 62(7/8): 620-628.
- [4] SOLOMON S D, CHEW E, DUH E J, SOBRIN L, SUN J K, VANDERBEEK B L, et al. Diabetic retinopathy: a position statement by the American Diabetes Association[J]. *Diabetes Care*, 2017, 40: 412-418.
- [5] YOSHIDA S, NAKAMA T, ISHIKAWA K, ARIMA M, TACHIBANA T, NAKAO S, et al. Antiangiogenic shift in vitreous after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 6997-7003.
- [6] LAI A K, LO A C. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison[J/OL]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013: 106594. doi: 10.1155/2013/106594.
- [7] ROBINSON R, BARATHI V A, CHAURASIA S S, WONG T Y, KERN T S. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals[J]. *Dis Model Mech*, 2012, 5: 444-456.
- [8] CAI X, MCGINNIS J F. Diabetic retinopathy: animal models, therapies, and perspectives[J/OL]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 3789217. doi: 10.1155/2016/3789217.

- [9] CAMPOCHIARO P A. Molecular targets for retinal vascular diseases[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210: 575-581.
- [10] YU Y, ZHANG J, ZHU R, ZHAO R, CHEN J, JIN J, et al. The profile of angiogenic factors in vitreous humor of the patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *Curr Mol Med*, 2017, 17: 280-286.
- [11] FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. *Endocr Rev*, 1997, 18: 4-25.
- [12] SIMONS M, GORDON E, CLAESSEON-WELSH L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 611-625.
- [13] KOWLURU R A, MISHRA M. Regulation of matrix metalloproteinase in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148: 67-85.
- [14] ZHANG W, YAN H. Dysfunction of circulating endothelial progenitor cells in type 1 diabetic rats with diabetic retinopathy[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 251: 1123-1131.
- [15] DAVIDSON E P, COPPEY L J, YOREK M A. Early loss of innervation of cornea epithelium in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats: improvement with ilepatril treatment[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 8067-8074.
- [16] OLIVARES A M, ALTHOFF K, CHEN G F, WU S, MORRISSON M A, DEANGELIS M M, et al. Animal models of diabetic retinopathy[J/OL]. *Curr Diab Rep*, 2017, 17: 93. doi: 10.1007/s11892-017-0913-0.
- [17] 朱华,李彦红,徐艳峰,徐玉环,许庆刚,尹红霞,等. 小剂量多次注射链脲佐菌素建立糖尿病早期视网膜病变动物模型[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24: 487-493.
- [18] GONG C Y, LU B, HU Q W, JI L L. Streptozotocin induced diabetic retinopathy in rat and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptor[J]. *Int J Ophthalmol*, 2013, 6: 573-577.
- [19] 余增洋,陆宾,龚陈媛,季莉莉. 链脲佐菌素诱导的小鼠糖尿病视网膜病模型及促血管新生分子的表达[J]. *国际眼科杂志*, 2016, 16: 1-6.
- [20] ALDEBASI Y H, RAHMANI A H, KHAN A A, ALY S M. The effect of vascular endothelial growth factor in the progression of bladder cancer and diabetic retinopathy[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2013, 6: 239-251.
- [21] HOEBEN A, LANDUYT B, HIGHLEY M S, WILDIERS H, VAN OOSTEROM A T, DE BRUIJN E A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis[J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56: 549-580.
- [22] CAI S, BRESSLER N M. Aflibercept, bevacizumab or ranibizumab for diabetic macular oedema: recent clinically relevant findings from DRCR.net Protocol T[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2017, 28: 636-643.
- [23] URIAS E A, URIAS G A, MONICKARAJ F, MCGUIRE P, DAS A. Novel therapeutic targets in diabetic macular edema: beyond VEGF[J]. *Vision Res*, 2017, 139: 221-227.
- [24] MOHAN N, MONICKARAJ F, BALASUBRAMANYAM M, REMA M, MOHAN V. Imbalanced levels of angiogenic and angiostatic factors in vitreous, plasma and postmortem retinal tissue of patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *J Diabetes Complications*, 2012, 26: 435-441.
- [25] MIMA A, QI W, HIRAOKA-YAMOMOTO J, PARK K, MATSUMOTO M, KITADA M, et al. Retinal not systemic oxidative and inflammatory stress correlated with VEGF expression in rodent models of insulin resistance and diabetes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 8424-8432.
- [26] ZHANG X, BAO S, LAI D, RAPKINS R W, GILLIES M C. Intravitreal triamcinolone acetate inhibits breakdown of the blood-retinal barrier through differential regulation of VEGF-A and its receptors in early diabetic rat retinas[J]. *Diabetes*, 2008, 57: 1026-1033.

[本文编辑] 尹 茶