

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01053

链脲佐菌素诱发性糖尿病大鼠早期视网膜病变模型的建立

高 玉¹, 吴晋晖^{2*}, 柳 林²

1. 解放军 411 医院眼科, 上海 200081

2. 第二军医大学长海医院眼科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病(DM)大鼠早期视网膜的形态学改变,评价该方法作为早期糖尿病视网膜病变(DR)动物模型的可行性。**方法** 64只体质量(180±20)g的雄性SD大鼠随机均分为CON组、DM组($n=32$),DM组按60 mg/kg体质量腹腔注射1%STZ 1次建立DM大鼠模型;CON组腹腔注射等量柠檬酸缓冲液作为对照。注射前DM组、CON组平均体质量、血糖水平差异均无统计学意义。DM成模后每周测量各组体质量、血糖等一般生理指标。成模后第10周,各组随机抽样对视网膜组织进行H-E染色、FITC-dextran灌注视网膜血管铺片及透射电镜超微结构观察。**结果** STZ腹腔注射诱导DM成模率100%。STZ腹腔注射后,DM组体质量增加不明显,后期甚至有所减轻;CON组体质量逐步增长,10周时DM组体质量明显低于CON组[(169.9±26.9)g vs (439.2±23.5)g, $P<0.001$]。STZ腹腔注射72h后,DM组血糖明显高于CON组[(26.63±4.54)mmol/L vs (6.37±0.49)mmol/L, $P<0.001$],至第10周DM组血糖均>16.7 mmol/L,CON组保持在5.6~7.4 mmol/L。H-E染色显示DM组大鼠视网膜毛细血管扩张,间质水肿;CON组视网膜未见明显异常。FITC-Dextran灌注视网膜显示DM组血管迂曲,管径不规则,未见毛细血管荧光渗漏、微血管瘤、视网膜无灌注区等;CON组血管管径均匀一致、分支自然流畅。透射电镜下DM组视网膜超微结构的改变主要有:毛细血管基底膜增厚,内皮细胞指状突起,线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变,周细胞线粒体肿胀、嵴脱落;内核层双极细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变;感光细胞膜盘间隙增宽、数量减少;神经节细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变。CON组视网膜超微结构未见明显异常改变。**结论** STZ诱导的DM大鼠在病程10周时即已出现类似人类早期背景型糖尿病视网膜病变(BDR)的相关形态学改变,可作为早期DR的动物模型以用于相关研究,且该方法简单经济、用时较短、重复性好、成功率高。

[关键词] 糖尿病;视网膜;动物模型;链脲佐菌素

[中图分类号] R 587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)10-1053-07

Streptozotocin-induced early diabetic retinopathy model in rats

GAO Yu¹, WU Jin-hui^{2*}, LIU Lin²

1. Department of Ophthalmology, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China

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

[Abstract] **Objective** To observe the morphological changes of the retina at early stage of streptozotocin (STZ)-induced diabetes mellitus (DM) model, so as to assess the feasibility of using STZ-induced DM as an animal model of early diabetic retinopathy (DR). **Methods** Sixty-four male SD rats (body weight [180±20] g) were randomly divided into the CON and DM groups ($n=32$). Rats in DM group received intraperitoneal injection of 1% STZ once and those in the CON group were given same volume of citrate buffer in the same manner. The average body weight and blood glucose were similar in the two groups before intraperitoneal injection. The blood glucose, body weight, and other parameters were determined once a week after intraperitoneal injection. In the 10th week, the morphological changes of the retina were observed by H-E staining, stretched preparation of FITC-dextran perfused retinal blood vessels, and transmission electron microscopy in randomly chosen samples. **Results** The successful rate of STZ-induced DM model was 100%. The body weight of animals in DM group had no obvious increase after injection, and it even decreased at late stage. The body weight increased gradually in the CON group. The average body weight of DM group ([169.9±26.9] g) was significantly lower than that of the CON group ([439.2±23.5] g) in the 10th week ($P<0.001$). The average blood glucose of DM group ([26.63±4.54] mmol/L) was significantly higher than that of the CON group ([6.37±0.49] mmol/L) 72 h after injection ($P<0.001$). DM group had a blood glucose > 16.7 mmol/L and

[收稿日期] 2010-05-12 **[接受日期]** 2010-07-16

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(30801268), 第二军医大学灾害医学基金. Supported by Youth Found of National Natural Science Foundation of China(30801268) and Disaster Medicine Foundation of Second Military Medical University.

[作者简介] 高 玉, 博士, 主治医师. E-mail: gyhqygy@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873559, E-mail: wjh2042@yahoo.com.cn

CON group had a blood glucose of 5.6-7.4 mmol/L throughout the 10 weeks. Retina H-E staining showed retinal capillary dilatation and interstitial edema in DM group in the 10th week, and the CON group had no obvious abnormalities. Stretched preparation of FITC-Dextran perfused retinal blood vessels showed vascular tortuosity and caliber irregularity in the DM group, but with no leakage, microvascular tumor or retinal non-perfusion area. The retinal vessel diameter was uniform and the branching was natural and smooth in the CON group. TEM results showed the following retinal ultrastructural changes in the DM group: thicker capillary basement membrane, digitation of capillary endothelial cells, mitochondrial swelling, cristae disruption, and vacuolar degeneration in capillary endothelial cells, bipolar cells and ganglion cells, mitochondrial swelling and cristae disruption in pericytes, decreased membranous disc (photoreceptor cell's outer segment), and widened gap between membranous discs. **Conclusion** The retina morphological changes of early stage background diabetic retinopathy(BDR) can be found in the 10th week after STZ injection in rats, and STZ-induced DR model can be used as an early stage DR model; besides, the method is simple, economical, quick, with good reproducibility and high successful rate.

[**Key words**] diabetes mellitus; retina; animal model; streptozotocin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1053-1059]

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最为常见和严重的微血管并发症之一,是全世界导致视力缺损和失明的第二大因素。86%的1型DM失明患者及约1/3的2型DM失明患者因DR致盲^[1]。目前,DR发生的确切机制还不十分清楚,而作为研究该疾病发生、发展规律和防治疗效机制等极为重要的工具和手段——理想的DR动物模型仍处发展阶段。因操作简单、发病迅速、血糖稳定、胰岛B细胞损伤特异性高等优点,链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)大鼠腹腔注射是目前建立诱发性DM动物模型较为常用的方法。DR动物模型是在DM动物模型基础上发展而来的。有报道^[2]采用2%STZ一次性大剂量腹腔注射造模,认为病程6个月以上时可作为类似人类早期背景型糖尿病视网膜病变(background diabetic retinopathy, BDR)的模型,但该方法耗时长、饲养成本大、动物死亡率也较高。因此,本研究拟通过观察1%STZ诱导的DM大鼠病程10周时视网膜的形态学改变,来评价其作为早期DR动物模型的应用价值。

1 材料和方法

1.1 动物来源及分组 清洁级雄性成年Sprague-Dawley(SD)大鼠64只,体质量(180±20)g,由上海SIPPR/BK实验动物中心提供(购于第二军医大学实验动物中心)。标准颗粒饲料(由第二军医大学实验动物中心提供)饲养,自由饮水。自然昼夜光线照明,室温18~22℃,相对湿度40%~70%,氨浓度小于20 mg/L。适应性饲养7 d后随机分成实验组(DM组)32只和对照组(CON组)32只。腹腔注射STZ后大鼠单独置于干净的塑料笼内,笼底铺以3~6 cm锯木屑,每日更换垫料。所有实验动物的使用均严格按照第二军医大学动物伦理委员会的规定执行。

1.2 DM模型的建立 所有实验大鼠禁食12 h,自由饮水。柠檬酸缓冲液的配制方法为:称取柠檬酸2.1 g加双蒸水至100 ml为A液,称取柠檬酸三钠2.94 g加双蒸水至100 ml为B液;取A液28 ml及B液22 ml混合,混合液用双蒸水稀释至100 ml即为柠檬酸缓冲液,测pH约4.5。将STZ[N-(methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine, 分子式C₈H₁₅N₃O₇, 相对分子质量265.22, 购于美国Sigma公司]按1%浓度溶解于新鲜配制的柠檬酸缓冲液中,置于冰浴备用。实验大鼠经电子天平称得体重后,DM组按60 mg/kg体质量用1 ml注射器腹腔注射STZ诱发糖尿病,CON组按60 mg/kg体质量腹腔注射柠檬酸缓冲液。整个过程无菌操作,10 min内完成。注射后30 min恢复进食。72 h后采尾血测量血糖,DM组剔除血糖低于16.7 mmol/L大鼠。

1.3 一般指标的测定 成模后每周测量实验大鼠体质量1次。同时记录饮食、饮水量、精神状态等变化情况。每周测量实验大鼠血糖1次。乙醇消毒实验大鼠尾部皮肤,尾静脉取血,血糖仪(Accu-chek advantage II血糖仪,德国Roche公司)测血糖。该血糖仪检测范围为0.6~33.3 mmol/L,显示“Lo”说明测定值低于仪器的检测范围,将之记为0.6 mmol/L;显示“Hi”说明测定值高于仪器的检测范围,将之记为33.3 mmol/L。每周测量实验大鼠尿糖1次。尿糖>+++ ,血糖 \geq 16.7 mmol/L即认为DM模型建立成功。

1.4 视网膜H-E染色观察 成模10周时,每组随机抽取3只大鼠6眼行石蜡切片H-E染色。100 g/L水合氯醛按0.35 ml/100 g腹腔注射全身麻醉后,摘除眼球,中央角膜穿刺一小口浸泡于中性甲醛中固定,12 h后充分水洗,沿角膜缘环形剪开眼球,去除眼前节、玻璃体,将含视网膜的眼杯浸泡于中性甲醛中再次固定24 h。经乙醇常规脱水,二甲苯透明后浸蜡包

理,连续 4~5 μm 厚的薄片用于 H-E 染色。

1.5 视网膜血管铺片的制备 成模 10 周时,每组随机抽取 3 只大鼠同前法全麻后,取相对分子质量 2×10^6 荧光素粉异硫氰酸葡聚糖荧光素 (FITC-dextran, 美国 Sigma 公司) 50 mg, 溶于 1 ml 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 直接左心室内注射。立即摘除眼球, 4% 多聚甲醛固定, 去除眼前节, 完整游离视网膜组织。将视网膜放射状切开 4 刀, 平铺到载玻片上, 滴上少许中性树脂胶后, 加盖玻片, 荧光显微镜 (AH-2, 日本 Olympus 公司) 观察、拍片。

1.6 视网膜超薄切片的制备及透射电镜观察 成模 10 周时, 每组随机抽取 3 只大鼠同前法全麻后, 摘除眼球, 沿角膜缘环形剪开眼球, 去除眼前节、玻璃体, 将含视网膜的眼杯放入 2.5% 戊二醛溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 1% 四氧化锇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 梯度乙醇、丙醇逐级脱水后, 环氧树脂 EPON618 浸透包埋, 聚合后作 1 μm 半超薄切片, 美蓝染色后光学显微镜 (SZ61, 日本 Olympus 公司) 下定位, 瑞典 LKB-I 型超薄切片机进行超薄切片 50~60 nm, 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色后, 透射电镜 (CM-120, 荷兰 Philips 公司) 观察、拍片。

1.7 统计学处理 用 SPSS v11.5 版统计软件对相关参数进行统计学分析。美国 Image-Pro Plus 专业图像分析软件测定视网膜毛细血管基底膜厚度 (retinal capillary basement membrane thickness, T_{RBM})。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 t 检验, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 实验 SD 大鼠一般情况 CON 组大鼠活跃好动, 每日饮水量、进食量、尿量适中, 毛色光滑、柔顺, 尾部圆润; DM 组大鼠成模后 2 周即出现多饮、多食、多尿等症状, 至后期消瘦萎靡, 弓背蜷缩, 毛色枯黄、竖糙, 尾部苍白。

2.2 体质量的变化 结果 (图 1A) 表明: 注射前 DM 组大鼠平均体质量为 (187.5 \pm 5.4) g, CON 组平均为 (185.0 \pm 6.9) g, 二者间差异无统计学意义。STZ 腹腔注射后, DM 组体质量增加不明显, 后期甚至有所减轻; CON 组体质量逐步增长。至 10 周时, DM 组平均体质量为 (169.9 \pm 26.9) g, CON 组平均为 (439.2 \pm 23.5) g, 约为 DM 组的 2.6 倍, 二者间差异显著, 具有统计学意义 ($|t| = 32.862, P < 0.001$)。

2.3 血糖的变化 结果 (图 1B) 表明: 注射前 DM 组大鼠平均血糖为 (6.49 \pm 0.68) mmol/L, CON 组平均为 (6.60 \pm 0.59) mmol/L, 二者间差异无统计

学意义 ($|t| = 0.621, P > 0.05$)。STZ 腹腔注射 72 h 后, DM 组平均血糖为 (26.63 \pm 4.54) mmol/L, CON 组平均为 (6.37 \pm 0.49) mmol/L, 二者间差异显著, 具有统计学意义 ($|t| = 25.386, P < 0.001$)。至 10 周时, DM 组平均血糖为 (24.81 \pm 4.86) mmol/L, CON 组平均为 (6.47 \pm 0.60) mmol/L, 二者间差异显著, 具有统计学意义 ($|t| = 12.594, P < 0.001$)。期间, DM 组血糖均 > 16.7 mmol/L, CON 组保持在 5.6~7.4 mmol/L。

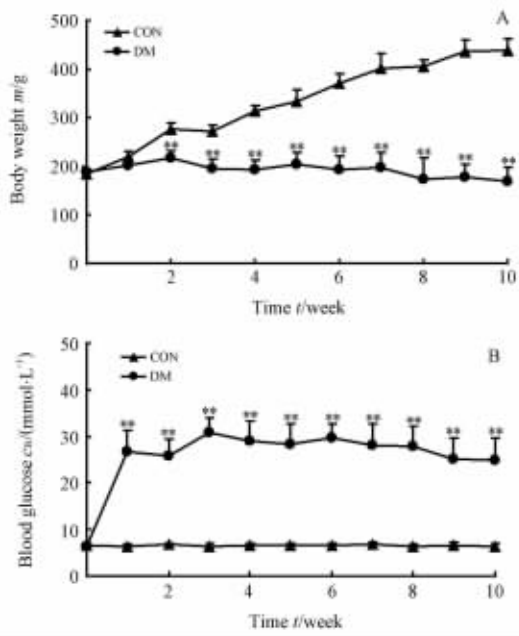


图 1 DM 组与 CON 组大鼠体质量 (A)、血糖 (B) 的变化

Fig 1 Changes of body weight (A) and blood glucose levels (B) of CON and DM groups

** $P < 0.001$ vs CON group. $n = 32, \bar{x} \pm s$

2.4 H-E 染色结果 结果 (图 2) 表明: 10 周时, DM 组大鼠视网膜毛细血管扩张、间质水肿; CON 组视网膜未见明显异常改变。

2.5 视网膜血管形态观察 10 周时, DM 组大鼠视网膜血管迂曲, 管径不规则, 未见毛细血管荧光渗漏、微血管瘤、视网膜无灌注区等 (图 3A); CON 组大鼠视网膜血管管径均匀一致、分支自然流畅 (图 3B)。

2.6 透射电镜观察结果 10 周时, DM 组视网膜毛细血管基底膜增厚; 内皮细胞指状突起, 吞饮泡增多, 线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变; 周细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变 (图 4A); 内核层双极细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变 (图 4B); 感光细胞外节膜盘间隙增宽、数量减少 (图 4C); 神经节细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变 (图 4D)。CON 组视网膜超微结构未见明显异常改变 (图 4E~图 4H)。

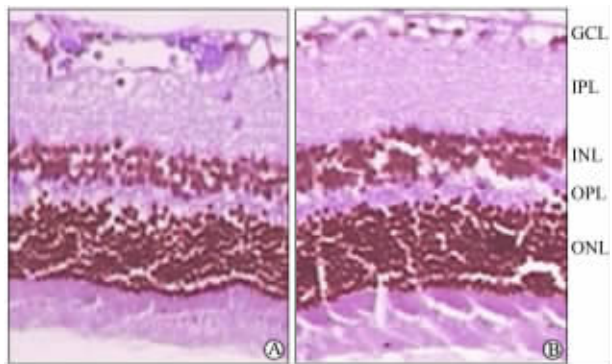


图2 DM组(A)和CON组(B)H-E染色结果

Fig 2 Light photomicrographs of retinal sections of DM (A) and CON (B) groups by H-E staining

GCL: Ganglion cell layer; IPL: Inner plexiform layer; INL: Inner nuclear layer; OPL: Outer plexiform layer; ONL: Outer nuclear layer. Original magnification: ×400

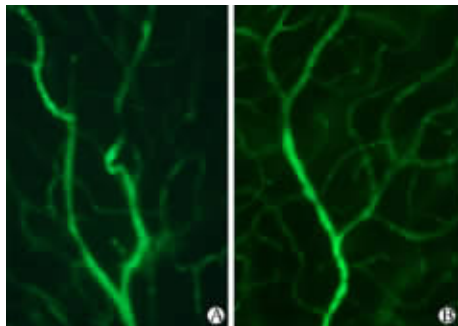


图3 DM组(A)和CON组(B)视网膜血管形态观察

Fig 3 Retinal vessel morphology in DM(A) and CON(B) groups FITC-dextran perfused retinas showing vascular tortuosity, caliber irregularity, but no leakage, microvascular tumor or retinal non-perfusion area in DM group (A), and retinal vessel diameter is uniform and branching is natural and smooth in CON group (B). Original magnification: ×400

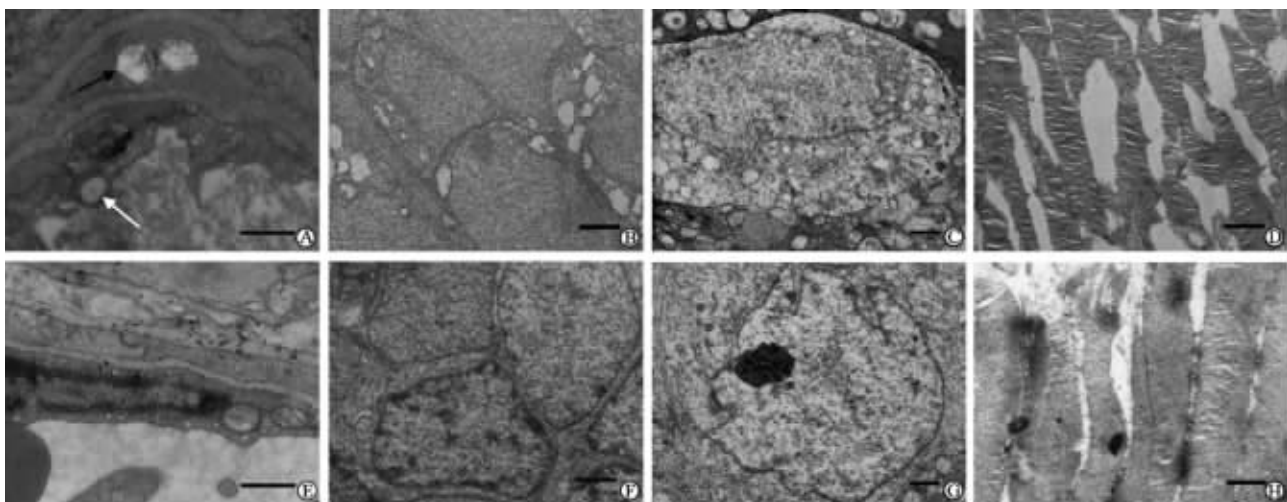


图4 DM组(A~D)、CON组(E~H)透射电镜观察视网膜超微结构

Fig 4 TEM observation of retinal ultrastructural changes in DM (A-D) and CON groups (E-H)

TEM results showed the following retinal ultrastructural changes in the DM group: thicker capillary basement membrane, digitation of capillary endothelial cell, mitochondrial swelling, cristae disruption and vacuolar degeneration in capillary endothelial cells(A, white arrow), bipolar cells (B) and ganglion cells(C); mitochondrial swelling and cristae disruption in pericytes(A, black arrow); and the number of membranous disc decreased and the gap between membranous disc widened(D). Capillary basement membrane, capillary endothelial cell, pericytes(E), bipolar cells (F), ganglion cells(G), and membranous disc(H) of the CON group had no obvious abnormalities. Bar=0.5 μm (A, E); Bar=1.0 μm (B, C, D, F, G, H)

2.7 视网膜毛细血管基底膜厚度的测量结果 美国 Image-Pro Plus 专业图像分析软件测量视网膜毛细血管基底膜厚度 T_{RBM} 。DM组和CON组视网膜各6张透射电镜图像,在同倍率条件下分别随机取5段RBM测距,结果为:DM组平均 T_{RBM} 为 (141.54 ± 15.67) nm,CON组平均为 (74.03 ± 14.39) nm,二者间差异显著,具有统计学意义 ($|t|=13.772, P<0.001$)。

3 讨论

DM动物模型主要分为自发性遗传性动物模

型、诱发性动物模型、转基因动物模型等。遗传性DM动物模型易受环境或基因突变等因素影响,饲养、繁殖条件要求严格,发病程度亦较难控制。随着转基因技术的不断发展,更为接近人类DM的转基因DM动物模型也必然会大量出现。但目前,最为常用的还是通过注射化学试剂、激素,接种病毒或手术切除胰腺等方法建立诱发性DM动物模型。STZ具有抗菌、抗肿瘤和致DM作用^[3],对机体组织毒性相对较小,是建立诱发性DM动物模型常用的一种化学药物^[4]。STZ对实验动物胰岛B细胞具有高

度选择性的毒性作用^[5],其诱导的DM动物模型存活率高,用药24 h后即可出现持续高血糖,不引起酸中毒,不升高血浆游离脂肪酸(FFA),且所致DM作用几乎不受饲养成分和营养状况的影响^[6-7]。大剂量(一般为50~65 mg/kg 体质量^[3,5])注射STZ时,由于直接引起胰岛B细胞的广泛破坏,可诱导出接近人类1型DM的动物模型;而注射较少量STZ,则只能破坏部分胰岛B细胞的功能,造成外周组织对胰岛素不敏感,若同时喂养高热量饲料,便可诱导出病理、生理改变都接近人类2型DM的动物模型。STZ能使许多种属动物产生DM,而一般采用大鼠或小鼠来制造动物模型。由于雌激素对血管具有保护作用,选用雄性鼠建立DM动物模型的成模率明显高于雌性鼠^[8]。本实验选用雄性SD大鼠按60 mg/kg 体质量剂量腹腔注射STZ,实为诱发接近人类1型DM的大鼠模型。本实验共32只大鼠腹腔注射STZ,72 h后所有大鼠血糖>16.7 mmol/L,建模成功率100%。至第10周时,无血糖下降至小于16.7 mmol/L大鼠,无死亡大鼠。

DR动物模型是在DM动物模型基础上发展而来的,但要得到与人类DR相同的动物模型却极其困难。Kador等^[9]报道,用半乳糖食物长期饲养犬,74~80个月后的5只中有1只;84个月后的4只中有1只半乳糖犬分别观察到视网膜前纤维血管膜等增殖期糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)样改变,其余7只犬均产生明显类似人类BDR的表现,包括微动脉瘤、无细胞毛细血管、视网膜无灌注区及其他视网膜内微血管异常(intraretinal microvascular abnormalities, IRMA)。尽管半乳糖血症的DR动物模型可产生类似人类DR在临床及组织学上所能观察到的所有视网膜改变,但因所需时间较长加之种属及解剖学的差异,其真正实用性受到一定限制。探寻一种经济实用、易于饲养且更为接近人类DR的理想动物模型对于研究DR是极为必要和关键的,而至目前相关研究尚处于发展阶段。STZ诱发的DR大鼠模型是目前比较公认的经典模型,但视网膜毛细血管栓塞、无细胞毛细血管及视网膜无灌注等在5个月左右时才能观察到^[10],微血管瘤的出现最早可能要第32周^[11],即使饲养到12个月也很难发现有PDR样改变^[10]。鉴于此,本研究仅旨在建立类似人类早期BDR的动物模型。

人及动物的视网膜微循环内屏障是由视网膜毛细血管中无孔的内皮细胞、连续的RBM及无细胞间隙的周细胞构成的血-视网膜屏障(blood retinal barrier, BRB)。BRB破坏和血管通透性增加是IR-

MA的主要病理学基础^[12],是糖尿病视网膜病变的标志之一^[13-14]。周细胞及毛细血管内皮细胞的病变、RBM的增厚和(或)损伤均会造成BRB的结构破坏和功能障碍。周细胞嵌于微血管基底膜,具有调节毛细血管内皮细胞增殖,毛细血管通透性、稳定性、血流动力学,以及新生血管生长等多种功能,与DR的发生发展密切相关^[15-20]。DR时,周细胞数量减少破坏了BRB结构的完整,从一定程度上促进了微血管瘤和新生血管的形成^[21]。卢艳等^[22]电镜观察成模1个月的DM大鼠视网膜,周细胞未见明显病变;萧鸿等^[23]、孟旭霞等^[24]等在1个月时观察到周细胞核膜轻微凹陷,异染色质聚集靠边,3个月时周细胞线粒体肿胀、嵴消失,甚至空泡性变;Murata等^[10]在DM成模3个月时观察到周细胞数量的减少。于10周DM大鼠,本研究观察到周细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变等病变。线粒体是真核细胞进行氧化和能量转换的主要场所,细胞生命活动所需能量的95%来自线粒体。此外,它们在氨基酸与血脂新陈代谢、血红素与铁硫群生物合成、细胞信号与细胞凋亡等方面都起着极为重要和关键的作用。正常情况下,细胞色素C(cytochrome C, Cyt-C)定位于线粒体膜间隙,不能通过外膜^[25]。而在高糖环境,局部微环境缺血、缺氧致使线粒体功能破坏、结构损伤,Cyt-C从膜间隙进入细胞质,最终引发凋亡蛋白酶Caspase的级联反应导致细胞凋亡^[26-27]。另外,本实验于DM大鼠成模10周时还观察到视网膜毛细血管内皮细胞的线粒体肿胀、嵴脱落和空泡样变。有研究^[28]表明糖尿病视网膜血管通透性主要通过血管内物质的跨细胞转运(细胞膜穴样凹陷、胞质内囊泡、窗孔等)及穿细胞转运等途径。本实验透射电镜观察到10周时DM组SD大鼠视网膜毛细血管内皮细胞吞饮泡增多,可能正是此期视网膜血管通透性增加的一种形态学表现。实验所观察到的RBM增厚、内皮细胞指状突起等超微结构改变,可导致血管通透性增加、血管腔狭窄及血流动力学改变等,从而逐步造成IRMA。H-E染色所观察到视网膜毛细血管扩张、间质水肿等,可作为视网膜超微结构改变在组织病理学上的佐证。

眼底荧光血管造影检查能发现视网膜微循环的改变,对糖尿病视网膜病变的早期诊断和治疗很有价值。若应用临床常用的造影剂——荧光素钠进行大鼠视网膜实验观察,由于相对分子质量较低,行视网膜固定铺片过程中既有大量荧光素渗透过血管壁,使整个视网膜组织呈现弥散的绿色荧光,不能清楚显示出正常和异常血管,且重复性差^[29]。本实验采用相对分子质量较高的荧光素——FITC-dex-

tran,因渗透异常血管壁的速度慢,在完成造影及随后的视网膜固定铺片时可清晰地显示出正常和异常视网膜血管完整的走行、形态。糖尿病视网膜病变早期通常表现为视网膜毛细血管扩张、渗漏或闭塞;静脉充盈扩张和迂曲。本研究经荧光显微镜观察10周DM大鼠视网膜,仅见静脉迂曲而未见毛细血管荧光渗漏、微血管瘤、视网膜无灌注区等。Sasase等^[30]经荧光素灌注的视网膜铺片发现高血糖使自发性2型糖尿病(spontaneously diabetic torii,SDT)大鼠视网膜静脉扩张,毛细血管网迂曲;王玉莽等^[31]观察6周STZ-DM Wista大鼠FITC-dextran灌注的视网膜,发现荧光素分布不均匀,局部不规则变细,血管迂曲。二者均未报道有荧光渗漏、微血管瘤、视网膜无灌注区等发现。未发现视网膜毛细血管荧光渗漏、微血管瘤等IRMA,或许是因为发病尚早、病程还短;视网膜静脉扩张、迂曲可能与由BRB破坏和血管通透性增加等所导致的血液黏度高、血流动力学异常及高静脉压等多种因素有关,具体机制仍有待进一步深入研究。

经典理论认为DR最基本的病理改变为微血管病变^[32],但经典理论无法解释DM患者/动物模型在出现DR特征性微血管改变之前既已存在的视功能异常,究竟DR早期是血管病变在先还是神经病变在先,目前尚无明确定论^[33]。Barber等^[34]在STZ诱导的DM大鼠发病1个月时,于视网膜中检测到神经细胞的凋亡明显增多;Murata等^[10]在DM1个月时透射电镜观察到视网膜神经细胞的凋亡而微血管未见任何改变;卢艳等^[22]电镜观察成模1个月的DM大鼠,视网膜色素上皮层、微血管RBM和周细胞无明显改变,但从外丛状层至神经纤维层均有明显变化,表现为线粒体数目减少、肿胀、嵴变短、消失和髓样变性等,并认为糖尿病早期大鼠在视网膜微血管内皮细胞和RBM超微结构未见异常时神经细胞已发生损害,神经细胞的损害可能是糖尿病视网膜病变的早期表现。通过透射电镜,本研究观察到10周DM大鼠视网膜双极细胞及神经节细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变;感光细胞外节膜盘间隙增宽、数量减少。上述结果与分析充分说明,10周DM组SD大鼠的视网膜即有DR典型的微血管病变,也有相应的神经元病变。

关于SD大鼠RBM超微结构的定量观察,庞东渤等^[35]报道随着病程进展,RBM逐渐增厚,DM3个月时 T_{RBM} 为 (245.5 ± 11.9) nm,6个月时为 (310.6 ± 28.0) nm;周水平等^[36]报道正常对照6个月时为 (0.113 ± 0.009) μm ,9个月时为 (0.122 ± 0.020) μm ,12个月时为 (0.132 ± 0.013) μm ,DM6

个月时为 (0.250 ± 0.011) μm ,9个月时为 (0.366 ± 0.028) μm ,12个月时为 (0.423 ± 0.022) μm ;魏玲格等^[37]报道正常对照2周时 (97.4 ± 13.0) nm,1个月时 (83.2 ± 19.5) nm,3个月时 (203.5 ± 16.3) nm,6个月时为 (236.3 ± 20.7) nm,DM2周时为 (97.6 ± 9.6) nm,1个月时为 (97.6 ± 17.6) nm,3个月时为 (248.3 ± 14.2) nm,6个月时为 (318.6 ± 23.4) nm。而萧鸿等^[23]报道的Wistar大鼠 T_{RBM} 结果为:正常对照 (0.075 ± 0.020) μm ,DM1个月时 (0.077 ± 0.028) μm ,3个月时 (0.126 ± 0.048) μm ,6个月时 (0.157 ± 0.26) μm ;Anderson等^[38]的研究结果更为细化。本研究测量结果为SD大鼠正常对照平均 T_{RBM} 为 (74.03 ± 14.39) nm,DM10周时平均为 (141.44 ± 15.68) nm。由于均是在二维图像上测量多处毛细血管断面RBM厚度,也即将管状三维结构的RBM仅以二维图像来对其定量,再加之取材方向上可能发生的偏差,上述结果难言准确或者说谁更为准确,但对“DM大鼠RBM增厚”的结论是一致的。

综上所述,STZ诱导的DM大鼠10周时视网膜已出现类似早期DR微血管及神经元的相关病变,具体表现为:(1)毛细血管基底膜增厚,内皮细胞指状突起、吞饮泡增多,线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变,周细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变;(2)双极细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变;(3)神经节细胞线粒体肿胀、嵴脱落、空泡样变;(4)视网膜感光细胞外节膜盘数量减少、间隙增宽;(5)血管迂曲、毛细血管扩张。因此,可以认为:10周STZ-DM SD大鼠可作为接近人类早期BDR的动物模型以用于DR的相关实验研究,并且该造模方法简单经济、用时较短、重复性好、成模率高。

[参考文献]

- [1] Fong D S, Aiello L P, Ferris F L 3rd, Klein R. Diabetic retinopathy[J]. Diabetes Care, 2004, 27: 2540-2553.
- [2] 李明新. 早期大鼠实验性糖尿病视网膜病变模型的建立及观察[J]. 徐州医学院学报, 2005, 25: 436-440.
- [3] Junod A, Lambert A E, Orci L, Pictet R, Gonet A E, Renold A E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1967, 126: 201-205.
- [4] Courteix C, Eschaliere A, Lavarenne J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain[J]. Pain, 1993, 53: 81-88.
- [5] Rakićen N, Rakićen M L, Nadkarni M V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)[J]. Cancer Chemother Rep, 1963, 29: 91-98.
- [6] Brosky G, Logothetopoulos J. Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig[J]. Diabetes, 1969, 18: 606-611.

- [7] Rerupa C, Tarding F. Streptozotocin and alloxan-diabetes in mice[J]. *Eur J Pharm*, 1969, 7: 89-96.
- [8] Rossini A A, Williams R M, Appel M C, Like A A. Sex differences in the multiple-dose streptozotocin model of diabetes[J]. *Endocrinology*, 1978, 103: 1518-1520.
- [9] Kador P F, Takahashi Y, Wyman M, Ferris F 3rd. Diabeteslike proliferative retinal changes in galactose-fed dogs [J]. *Arch Ophthalmol*, 1995, 113: 352-354.
- [10] Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas[J]. *Lab Invest*, 1996, 74: 819-825.
- [11] Hammes H P, Ali S S, Uhlmann M, Weiss A, Federlin K, Geisen K, et al. Aminoguanidine does not inhibit the initial phase of experimental diabetic retinopathy in rats [J]. *Diabetologia*, 1995, 38: 269-273.
- [12] Garner A. Histopathology of diabetic retinopathy in man[J]. *Eye (Lond)*, 1993, 7(Pt 2): 250-253.
- [13] Vinores S A, Van Niel E, Swerdloff J L, Campochiaro P A. Electron microscopic immunocytochemical demonstration of blood-retinal barrier breakdown in human diabetics and its association with aldose reductase in retinal vascular endothelium and retinal pigment epithelium[J]. *Histochem J*, 1993, 25: 648-663.
- [14] Xu Q, Qaum T, Adamis A P. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42: 789-794.
- [15] Anderson D R. Glaucoma, capillaries and pericytes. 1. Blood flow regulation[J]. *Ophthalmologica*, 1996, 210: 257-262.
- [16] Anderson D R, Davis E B. Glaucoma, capillaries and pericytes. 2. Identification and characterization of retinal pericytes in culture[J]. *Ophthalmologica*, 1996, 210: 263-268.
- [17] Ferrari-Dileo G, Davis E B, Anderson D R. Glaucoma, capillaries and pericytes. 3. Peptide hormone binding and influence on pericytes[J]. *Ophthalmologica*, 1996, 210: 269-275.
- [18] Zschauer A O, Davis E B, Anderson D R. Glaucoma, capillaries and pericytes. 4. Beta-adrenergic activation of cultured retinal pericytes[J]. *Ophthalmologica*, 1996, 210: 276-279.
- [19] Anderson D R, Davis E B. Glaucoma, capillaries and pericytes. 5. Preliminary evidence that carbon dioxide relaxes pericyte contractile tone[J]. *Ophthalmologica*, 1996, 210: 280-284.
- [20] Hirschi K K, D'Amore P A. Pericytes in the microvasculature [J]. *Cardiovasc Res*, 1996, 32: 687-698.
- [21] Li W, Shen S, Khatami M, Rockey J H. Stimulation of retinal capillary pericyte protein and collagen synthesis in culture by high-glucose concentration[J]. *Diabetes*, 1984, 33: 785-789.
- [22] 卢艳, 姬志娟, 吴航, 赵志伟, 盛树力. 电镜观察糖尿病模型大鼠神经网膜的超微结构[J]. *首都医科大学学报*, 2002, 23: 45-48.
- [23] 萧鸿, 刘学政, 李永洋, 李莉霞, 李瑞祥. 早期糖尿病大鼠视网膜毛细血管及视细胞超微结构变化[J]. *眼视光学杂志*, 2001, 3: 213-216.
- [24] 孟旭霞, 牛膺筠, 曲虹, 王建波. 大鼠糖尿病视网膜病变模型建立及超微结构观察[J]. *青岛大学医学院学报*, 2007, 43: 217-219.
- [25] Martinou J C, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: E41-E43.
- [26] Kowluru R A. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(11-12): 1581-1587.
- [27] Hu Y, Benedict M A, Ding L, Núñez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis[J]. *EMBO J*, 1999, 18: 3586-3595.
- [28] Barber A J, Antonetti D A. Mapping the blood vessels with paracellular permeability in the retinas of diabetic rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 5410-5416.
- [29] 张敏, 贾丽丽, 宋蓓雯, 杜新华, 吴强. 小鼠视网膜新生血管模型的建立及特征[J]. *国际眼科杂志*, 2008, 8: 1542-1545.
- [30] Sasase T, Ohta T, Ogawa N, Miyajima K, Ito M, Yamamoto H, et al. Preventive effects of glycaemic control on ocular complications of Spontaneously Diabetic Torii rat [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2006, 8: 501-507.
- [31] 王玉彝, 马萍萍, 李斌, 林少芬, 吴炎, 冯锦尚, 等. 胰岛素控制血糖对糖尿病大鼠早期视网膜血管的影响[J]. *眼科学报*, 2007, 23: 205-211.
- [32] Dagher Z, Park Y S, Asnaghi V, Hoehn T, Gerhardinger C, Lorenzi M. Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 2004, 53: 2404-2411.
- [33] 李媛, 卢艳. 糖尿病视网膜病变早期发病机制研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2005, 5: 750-754.
- [34] Barber A J, Lieth E, Khin S A, Antonetti D A, Buchanan A G, Gardner T W. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102: 783-791.
- [35] 庞东渤, 符丽娟, 刘学政. 链脲佐菌素-糖尿病大鼠视网膜微血管病理改变[J]. *眼视光学杂志*, 2005, 7: 47-49.
- [36] 周水平, 仝小林, 潘琳, 高文远. 络通对不同病程糖尿病大鼠视网膜微血管形态学改变的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13: 25-27.
- [37] 魏玲格, 王长龄, 段惠军. 实验性糖尿病视网膜微血管病变的病理研究[J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38: 523-525.
- [38] Anderson H R, Stitt A W, Gardiner T A, Archer D B. Diabetic retinopathy: morphometric analysis of basement membrane thickening of capillaries in different retinal layers within arterial and venous environments[J]. *Br J Ophthalmol*, 1995, 79: 1120-1123.