

# 糖尿病合并高度近视动物模型的制作

万光明 孔晓路 王 爽

## Establishment of animal model for high myopia associated with diabetes mellitus

Wan Guangming, Kong Xiaolu, Wang Shuang. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

**Abstract Objective** Some clinical researches on myopia associated with diabetic retinopathy (DR) determined that there is a negative correlation between extent of myopia and progress of DR. However, the laboratory evidence of this conclusion is absent. This work was to establish an animal model for high myopia associated with diabetes mellitus (DM) in guinea pigs and provide a reference for the study on the correlation of diabetic retinopathy (DR) with refractive error. **Methods** Sixty one-week-old tricolor guinea pigs were selected in this study and divided into four groups. The only buffer solution was intraperitoneally injected as normal control in group I. DM was induced by repeatedly intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a low-dose in group II after regular raise for 6 weeks. In group III, the right eyes of the animals without DM were occluded with self-made transparent eye-goggles to induce the high myopia, and in group IV, the DM was induced at the same way after occluding procedure of the right eyes for 6 weeks. The DM model was identified as the blood glucose  $\geq 16.7$  mmol/L, and the high myopia was determined as the diopter  $\geq -6.00$  D. The diopter was detected by retinoscopy. The ocular axial length was measured with caliper 20 weeks later. **Results** The DM model was successfully established in 26 animals from group II and group IV, and high myopic eyes were successfully induced in 28 right eyes from group III and group IV. The DM outcomes were revealed by the much higher blood glucose level and significantly lower body weight in the animals of group II and group IV compared with group I and group III ( $P < 0.01$ ). The absolute value of diopter and ocular axial length were considerably elevated in group III and group IV compared with group I and group III ( $P < 0.01$ ). None of guinea pigs in group I and group III dead through the experimental duration, and the mortality of group II and group IV was 13.3%. **Conclusion** The animal model for high myopia associated with DM can be created successfully by a joint procedure of occlusion with self-made transparent eye-goggles and low-dose of repeated injection of STZ.

**Key words** high myopia; diabetes mellitus; animal model; diabetic retinopathy

**摘要 目的** 探讨糖尿病合并高度近视动物模型的制备方法,为糖尿病视网膜病变(DR)进展与屈光不正的相关性研究提供实验依据。**方法** 选取出生1周龄的三色豚鼠60只,随机分为4个组,每组15只,I组为正常对照组;II组饲养6周后,腹腔小剂量多次注射链脲佐菌素(STZ)诱发糖尿病;III组用自制透明眼罩遮盖右眼诱导形觉剥夺性近视;IV组为形觉剥夺性近视+糖尿病组。**结果** III组、IV组均能成功诱导高度近视模型;腹腔注射STZ豚鼠的血糖、体重与其他组比较,差异均有统计学意义。I组、III组死亡率为0,II组、IV组死亡率为13.3%。**结论** 透明眼罩遮盖联合STZ小剂量多次腹腔注射是一种可靠的制备糖尿病合并高度近视动物模型的方法。

**关键词** 高度近视;糖尿病;动物模型;糖尿病视网膜病变

**分类号** R 774.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)06-0511-03

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一组以慢性血糖水平增高为特征的代谢疾病群,其广泛而严重的并发

症具有很高的致残率,随着人们生活水平的提高,糖尿病的发病率呈上升趋势,糖尿病的相关研究越来越受到人们的重视,其中糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病患者的严重并发症之一,是导致失明的重要原因。已有研究表明,近视的程度与

DR 的严重程度呈负相关<sup>[1-5]</sup>,但缺乏相应的实验室研究,而建立理想的动物模型是糖尿病相关研究的重要手段之一。本研究探讨糖尿病合并高度近视动物模型的制备方法,为 DR 的进展与屈光不正的相关性研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及饲料** 选用出生 1 周的健康三色豚鼠(河南省实验动物中心提供)60 只,体重 100 ~ 130 g,雌雄不限,豚鼠全价颗粒饲料喂养,同时每日早晚给予蔬菜,并补充维生素 C。室内人工饲养,自然昼夜节律,环境保持通风、安静及恒温(25 ~ 28 ℃)。

**1.1.2 药物** 链脲佐菌素(Streptozocin, STZ)(美国 Sigma 公司),使用前用无菌枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液配制成浓度为 2% 的溶液, pH = 4.5。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的制作及分组** 所有豚鼠均经复方托品酰胺滴眼液点眼后检影验光,排除先天性近视及其他眼部疾病。按体重编号随机分为 4 组,每组 15 只, I 组为正常对照组,腹腔注射等量空白缓冲液; II 组为糖尿病组,饲养 6 周后,按 65 mg/kg 剂量连续 3 周豚鼠左下腹腔小剂量多次注射 STZ 诱发糖尿病; III 组为高度近视组,用自制透明眼罩遮盖右眼 6 周后,腹腔内注射等量空白缓冲液; IV 组为糖尿病合并高度近视组,用自制透明眼罩遮盖右眼 6 周后,按 65 mg/kg 剂量连续 3 周豚鼠左下腹腔小剂量多次注射 STZ 诱发糖尿病。各组豚鼠双眼结膜囊点复方托品酰胺滴眼液散瞳,于暗室内带状光检影验光,测各组豚鼠双眼屈光度(在工作距离 0.5 m 处分别进行水平及垂直子午线上的检影,散光以半量等效球镜计算)。以屈光度在 -6.00 D 以上为高度近视豚鼠。在糖尿病造模第 4 周,用穿刺法从眼眶后静脉丛采血,测定血糖。

**1.2.2 成模标准** 糖尿病成模标准<sup>[5]</sup>:以血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 及尿糖阳性为糖尿病豚鼠。高度近视成模标准:以屈光度在 -6.00 D 以上为高度近视豚鼠。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件对数据进行处理。实验检测指标的数据资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,4 个组豚鼠血糖、体重、屈光度、眼轴长情况的总体比较采用单因素方差分析,各测试指标组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

对照组豚鼠每日饮水及尿量无明显变化,毛色光滑,体质量随周龄增加而稳定增长,实验过程中无死亡。 II 组及 IV 组腹腔注射 STZ 的豚鼠于造模后第 4 周,血糖和尿糖均达成模标准,成模后第 2 周即出现多饮、多食、多尿等糖尿病症状,体质量减小, II 组豚鼠于成模后第 6 周及第 10 周各有 1 只死亡, IV 组豚鼠于成模后第 6 周及第 12 周各有 1 只死亡。饲养 20 周后处死豚鼠,摘除眼球,用游标卡尺测量眼轴长度。

### 2.2 豚鼠尿糖测试结果

注射 STZ 第 1 周有 2 只豚鼠(6.7%)出现尿糖阳性。第 2 次注射 STZ 后,7 只(23.3%)豚鼠出现尿糖阳性,第 3 次注射 STZ,30 只豚鼠均呈尿糖阳性,共 3 周。

### 2.3 血糖、体重、屈光度及眼轴长度的变化

腹腔内注射 STZ 的 II 组及 IV 组血糖值明显高于其他 2 组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),而体重低于其他 2 组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。 III 组与 IV 组屈光度高于其他 2 组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),且眼轴长也高于其他组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(表 1)。

表 1 各组豚鼠血糖、体重、屈光度、眼轴长情况比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Comparison of blood glucose, body weight, diopter and ocular axial length in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	<i>n</i>	Blood glucose (mmol/L)	Body weight (g)	Diopter(D)	Ocular axial length(mm)
I	15	5.32 ± 0.56	562.00 ± 34.48	1.88 ± 1.86	8.41 ± 0.38
II	13	20.73 ± 1.45 <sup>cf</sup>	228.46 ± 23.66 <sup>cf</sup>	1.52 ± 1.92	8.37 ± 0.30
III	15	5.65 ± 0.78	554.33 ± 27.25	-9.57 ± 2.52 <sup>ci</sup>	9.24 ± 0.19 <sup>ci</sup>
IV	13	21.24 ± 2.12 <sup>cf</sup>	218.08 ± 11.64 <sup>cf</sup>	-9.12 ± 2.15 <sup>ci</sup>	9.21 ± 0.14 <sup>ci</sup>
<i>F</i>		630.640	765.911	124.796	44.684
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>c</sup> $P < 0.01$  vs respective I group, <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs respective III group, <sup>i</sup> $P < 0.01$  vs respective II group (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

## 3 讨论

糖尿病是一种发病率较高的代谢性疾病,具有广泛而严重的并发症,对糖尿病的研究已经成为世界范围内的热点<sup>[6]</sup>。而 DR 是糖尿病严重的微血管并发症之一,其发病率较高,是目前致盲的主要原因之一<sup>[7-8]</sup>,但其发病机制尚不完全清楚。临床研究表明,高度近视的程度与 DR 的严重程度呈负相关<sup>[2-5]</sup>,但缺乏相应的实验室依据。目前 DR 的研究多采用动物实验,DR 动物模型是在糖尿病模型上建立起来的。因此建立理想的糖尿病动物模型,是糖尿病相关研究的必然趋势。

### 3.1 多次小剂量注射 STZ 的机制

STZ 诱导的大鼠糖尿病模型广泛用于糖尿病研究的各个领域,且较多应用 STZ 一次性剂量 60 mg/kg,数日后可以产生持续性高血糖,但使用一次性剂量集中大量破坏  $\beta$  细胞,使糖尿病很快发生,短期内即达到 DM 的临床症状,与 DM 患者的实际发病有一定差距<sup>[9-10]</sup>。本实验用豚鼠作为实验动物,采用 65 mg/kg 剂量多次注射 STZ 诱导 DM,较好地模拟了 DM 的自然病程,以小剂量 STZ 作为诱发自身损害的诱因,逐渐加重胰岛功能损伤,终达失代偿,出现多饮、多尿、尿糖持续阳性等一系列临床症状。

STZ 是一种含亚硝基的化合物,能特异性地破坏胰岛  $\beta$  细胞<sup>[11]</sup>。其机制之一是通过诱导 NO 的合成,增加对胰岛  $\beta$  细胞的氧化侵袭<sup>[12]</sup>,与胰岛素依赖性糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) 患者发病时体内氧化侵袭增加类似;其二是小剂量注射 STZ 可破坏少量胰岛细胞,死亡胰岛细胞作为抗原被巨噬细胞吞噬,产生 I 类辅助 T 细胞 (T helper 1, Th1) 刺激因子,使 Th1 细胞系占优势而产生 IL-2 及 INF- $\gamma$ ,在胰岛局部促使炎性细胞浸润,并活化释放 IL-1、INF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  及 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等物质,杀伤细胞<sup>[13]</sup>。死亡细胞再次以自身抗原释放,并再次递呈给 APC 细胞进行处理,释放细胞因子,放大细胞损伤效应,最终导致 DM<sup>[14-15]</sup>。

由于正常机体免疫系统存在自我调控机制,仅进行单次小剂量 STZ 注射引发的自身免疫反应很快就会被减弱或者终止。本研究结果表明,单次小剂量 STZ 注射时,仅有极少数大鼠发生尿糖阳性,说明自身免疫反应被阻断,未形成  $\beta$  细胞破坏、抗原递呈细胞处理抗原产生细胞因子、TH1 细胞增生、 $\beta$  细胞破坏的循环放大效应。因此通过多次小剂量 STZ 注射,不断强化自身免疫反应,破坏免疫抑制机制,最终导致稳定持久的 2 型糖尿病,即非 IDDM<sup>[16]</sup>。

### 3.2 动物死亡率

传统单次大剂量注射 STZ 动物死亡率为 35% ~ 40%<sup>[10]</sup>。本实验中 I 组及 III 组豚鼠无 1 例死亡,均成功造成高度近视眼模型,II 组及 IV 组通过小剂量多次腹腔注射 STZ 均达到糖尿病成模标准,II 组豚鼠于成模后第 6 周及第 10 周各有 1 只死亡,IV 组豚鼠于成模后第 6 周及第 12 周各有 1 只死亡,均死于极度消瘦、不能进食,成模率达 93.3%,动物死亡率明显低于单次大剂量注射,可以看出小剂量多次注射可明显降低实验动物的死亡率,在动物存活方面占明显优势。本实验模型制作的关键是 STZ 溶液的配制、保存及应

用,其中,枸橼酸钠的浓度及 pH 值应符合要求,且现配现用;STZ 溶液应充分混匀,避光保存,快速注射,最好在配制后 5 ~ 8 min 用完。注射药物后 48 h,即可出现血糖升高,饮水量、尿量增加,故必需给予充足的水分和食物;动物密度不宜过大,通风要好;血糖较高时,给予长效胰岛素 1 ~ 2 U/kg,可降低成模豚鼠的死亡率。

本实验先用自制半透明眼罩对豚鼠行形觉剥夺性近视,而后行小剂量多次注射 STZ 诱导糖尿病模型,有效模拟了高度近视、糖尿病病程及发病机制,并降低了动物死亡率。为探讨屈光不正与 DR 的关系提供了实验依据。

### 参考文献

- 1 Dujic M, Misailovic K, Nikolic LJ, et al. Occurrence of changes in the eye in diabetic retinopathy with significant myopia [J]. *Srp Arh Celok Lek*, 1998, 126 (11 - 12): 457 - 460
- 2 Perkins ES, Phelps CD. Open angle glaucoma, ocular hypertensi-ion, low-tension glaucoma, and refraction [J]. *Arch Ophthalmol*, 1992, 100 (9): 1464 - 1467
- 3 Coscas G. Diabetic retinopathy: classification and spontaneous development [J]. *Annu Diabetol Hotel Dieu*, 1988, 15: 129 - 140
- 4 孟岩,袁春燕,丁玉芝. 近视性屈光不正与糖尿病视网膜病变的关系 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2007, 43 (1): 55 - 56
- 5 钟学礼. 糖尿病. //戴自英. 实用内科学 (上册) [M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 617 - 655
- 6 张传仓,刘卫鹏,等. 改良四氧嘧啶法制作糖尿病动物模型 [J]. *实用医学杂志*, 2007, 23 (5): 623 - 624
- 7 Robison WG, Laver NM. Efficacy of treatment after measurable diabetic-like retinopathy in galactose-fed rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38 (6): 1066 - 1073
- 8 王姿,蔡玉琴. 2 型糖尿病视网膜病变危险因素分析 [J]. *齐鲁医学杂志*, 2006, 21 (3): 243 - 244
- 9 Herold KC, Bloch TN, Vezys V. Diabetes induced with low-doses of streptozotocin is mediated by V  $\beta$  8. 2 + T-cells [J]. *Diabetes*, 1995, 44: 354 - 359
- 10 Herold KC, Vezys V, Sun Q, et al. Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes [J]. *Immunol*, 1996, 156 (9): 3521 - 3527
- 11 于德民,吴锐,尹淮,等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 1995, 3 (2): 105
- 12 Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitic new model of diabetes mellitus [J]. *Science*, 1976, 193: 415
- 13 Papaccio G, Frascatore S, Esposito V, et al. Early macrophage infiltration in mice with low-dose streptozotocin decreases islet superoxide dismutase levels: Prevention by silica pretreatment [J]. *Acta Anat*, 1991, 142 (2): 141
- 14 Trembleau S, Gemann T, Gately M, et al. The role of L-12 in the induction of organ-specific autoimmune disease [J]. *Immunol Today*, 1995, 16: 383 - 387
- 15 Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine in balances in the pathogenesis of IDDM [J]. *Diabetes*, 1994, 43: 613 - 619
- 16 黄波,刘学政,庞东渤. 不同途径注射链脲佐菌素致糖尿病模型的研究 [J]. *锦州医学院学报*, 2003, 24 (1): 19 - 21

(收稿:2009-01-13 修回:2009-03-22)

(本文编辑:刘 艳)