

不同剂量链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病小鼠角膜病变模型的对比研究

张真真 胡晓丽 华英彬 周庆军

250000 济南, 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院 山东省眼科研究所(张真真); 266071 青岛, 山东省医学科学院 山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室(胡晓丽、华英彬、周庆军)

通信作者: 周庆军, Email: qjzhou2000@hotmail.com

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2018.06.006

【摘要】 目的 比较研究单次高剂量和多次低剂量链脲佐菌素(STZ)腹腔内注射诱导糖尿病小鼠角膜病变的成模情况及其病理表现的异同。方法 正常 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 80 只, 随机分为正常对照组、多次低剂量 1 个月组、多次低剂量 3 个月组(60 mg/kg STZ 连续腹腔内注射 5 次)和单次高剂量 1 个月组(150 mg/kg STZ 腹腔内注射 1 次), 每组 20 只。比较各模型组小鼠成活率、糖尿病成模率、平均体质量、糖化血红蛋白(HbA1c)水平。各组小鼠均行角膜上皮刮除术, 采用荧光素钠染色法检测角膜上皮的缺损面积百分比。采用免疫荧光染色法检测角膜上皮 p-Akt、Sirt1 和 Ki67 的表达情况。采用 Cochet-Bonnet 触觉测量器检测角膜上皮刮除前、刮除后 3、7、10 和 14 d 角膜敏感度, 采用免疫荧光染色检测角膜上皮刮除前、刮除后 14 d 角膜神经密度。结果 多次低剂量 1 个月组、多次低剂量 3 个月组和单次低剂量 1 个月组小鼠糖尿病成模率分别为 90%、80% 和 70%。各糖尿病模型组小鼠血液 HbA1c 水平较正常对照组明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 各糖尿病模型组间小鼠血液 HbA1c 水平比较, 差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。角膜上皮刮除后 24 h 和 48 h, 多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠角膜上皮缺损面积百分比均高于正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠角膜上皮 p-Akt、Sirt1 和 Ki67 的荧光强度均低于正常对照组。角膜上皮刮除前和刮除后 14 d, 多次低剂量 1 个月组小鼠角膜敏感度、角膜神经密度与正常小鼠相比, 差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 但多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠角膜神经敏感度、角膜神经密度明显下降, 与正常对照组相比差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 低剂量 STZ 注射 1 个月不能诱导糖尿病小鼠出现角膜病变特征, 而高剂量 STZ 注射后 1 个月和低剂量 STZ 注射后 3 个月的糖尿病小鼠出现典型的角膜上皮和神经病变, 可作为研究 1 型糖尿病性角膜病变的理想动物模型。

【关键词】 链脲佐菌素; C57BL/6J 小鼠; 糖尿病; 角膜病变

基金项目: 山东省自然科学基金杰出青年基金项目(JQ201518)

Comparison of different doses streptozotocin-induced mouse models for the research of type 1 diabetic keratopathy

Zhang Zhenzhen, Hu Xiaoli, Hua Yingbin, Zhou Qingjun

School of Medicine and Life Science, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Eye Institute, Jinan 250000, China (Zhang ZZ); State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao 266071, China (Hu XL, Hua YB, Zhou QJ)

Corresponding author: Zhou Qingjun, Email: qjzhou2000@hotmail.com

[Abstract] **Objective** To compare the rates and pathological features of diabetic keratopathy in mice induced by single high dose or multiple low dose streptozotocin (STZ) injections. **Methods** Eighty male C57BL/6 mice (6–8 weeks old) were randomly divided into 4 groups with each group contain 20 mice: normal control group, multiple low dose 1 month group and multiple low dose 3 months group (injected with 60 mg/kg STZ for 5 consecutive times), single high dose 1 month group (injected with 150 mg/kg STZ). The survival rate, model success rate, body weight, glycosylated hemoglobin (HbA1c) content were compared among different modeling group. The percentages of residual epithelial defect area were examined by fluorescein sodium staining after removal of central corneal

epithelium. The expression of p-Akt, Sirt1 and Ki67 were evaluated by immunofluorescent staining. The corneal sensitivity were compared among different groups before corneal epithelial curettage, 3, 7, 10 and 14 days after corneal epithelial curettage. The corneal subbasal nerve density at 14 days after corneal epithelial curettage were compared among different groups. This study complied with the declaration of ARVO. **Results** The success rate of diabetic modeling in multiple low dose 1 month group, multiple low dose 3 months group and single high dose 1 month group was 90%, 80% and 70%, respectively. The HbA1c levels in the diabetic modeling groups were significantly higher than that in the normal control group (all at $P < 0.05$). The percentage of residual epithelial defect area 24 and 48 hours after corneal epithelial curettage in the multiple low dose 3 months group and single high dose 1 month group were significantly higher than those in the normal control group (all at $P < 0.05$). The fluorescence intensity of p-Akt, Sirt1 and Ki67 in the multiple low dose 3 months group and single high dose 1 month group were stronger than those in the normal control group. There were no significant differences on corneal sensitivity and corneal nerve density between normal control and multiple low dose 3 months group before and 14 days after the corneal epithelial removal (all at $P > 0.05$). However, the corneal sensitivity and corneal nerve density were dramatically decreased in the multiple low dose 3 months group and single high dose 1 month group before and 14 days after the corneal epithelial removal, and there were significant differences compared with normal control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** The injection of 60 mg/kg STZ can not induce the features of diabetic keratopathy in mice within 1 month. However, the mice of both 1 month after 150 mg/kg STZ injection and 3 months after 60 mg/kg STZ injection appear the typical epithelial and nerve features of diabetic keratopathy, therefore can be the ideal animal models for research.

[Key words] Streptozotocin; C57BL/6 mice; Diabetes mellitus; Corneal keratopathy

Fund program: Shandong Provincial Nature Science Fund for Distinguished Young Scholars (JQ201518)

糖尿病是以高血糖为特征的慢性代谢性疾病,主要分为 1 型糖尿病和 2 型糖尿病,其中 1 型糖尿病被认为是由 T 细胞介导的胰岛 β 细胞选择性破坏而引起的自身免疫性疾病^[1]。中国是全世界糖尿病患者最多的国家,且发病率逐年升高^[2]。有文献报道,近一半的糖尿病患者可出现原发性糖尿病性角膜病变(diabetic keratopathy, DK),其主要临床特征包括角膜触觉阈值明显升高、敏感性明显下降、角膜上皮损伤后修复延迟、神经营养障碍性角膜溃疡等^[3-6]。目前对于 DK 的发病机制研究和治疗手段非常有限,相关的基础研究仍处于起步阶段。因此,建立与 DK 临床特征接近的动物模型对于基础研究和相关药物评价十分重要。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)对胰岛 β 细胞有选择性破坏作用,采用 STZ 腹腔注射是诱导 1 型糖尿病动物模型和研究糖尿病及其并发症发病机制的经典方法,雄性动物的糖尿病成模率明显高于雌性^[7-9]。目前多数研究采用多次低剂量 STZ 腹腔内注射进行诱导 DK 动物模型,末次注射 3 个月后可出现典型的 DK 特征,实验周期长、成本高^[10-12]。本研究的目的是研究单次高剂量和多次低剂量 STZ 腹腔内注射诱导糖尿病小鼠角膜病变的成模情况及其病理表现的异同。基于此,本研究中选用雄性 C57BL/6J 小鼠行腹腔内 STZ 注射建立 1 型糖尿病小鼠模型,通过比较单次高剂量和多次低剂量 STZ 注射对血糖和糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)水平、角膜神经密度、角膜敏感度、角膜上皮和神经再生情况、上皮再生相关因

子表达的异同,评价 2 种造模方式在 DK 研究方面的适用性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周雄性 C57BL/6 小鼠(均购自中国医学科学院实验动物研究所),由山东省眼科研究所实验室动物中心饲养,研究设计符合视觉与眼科学研究协会(Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO)制定的动物使用规范。

1.1.2 主要试剂及仪器 STZ(美国 Sigma-Aldrich 公司);兔抗小鼠 p-Akt 抗体(Ab66138)、兔抗小鼠 Ki67 抗体(Ab16667)、兔抗小鼠 Sirt1 抗体(Ab12193)(美国 Abcam 公司);Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG 二抗(A21206, 美国 Life 科技公司);兔抗小鼠 anti- β -III tubulin 抗体(AB15708A4, 美国 Millipore 公司)。血糖测量仪(Lifescan, 美国强生公司);电动角膜去上皮刀(美国 Alger 公司);BQ900 裂隙灯显微镜(瑞士 Haag-Streit 公司);Cochet-Bonnet 触觉测量器(法国 Luneau Ophtalmologie 公司);Eclipse TE2000-U 显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 不同糖尿病小鼠模型的建立 取 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 80 只,分别称质量并记录,应用随机数字表法随机分为:正常对照组、多次低剂量 1 个月组、多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组,每组

20 只。STZ 溶解于 0.1 mmol/L 预冷的枸橼酸盐-枸橼酸缓冲液 (pH=4.5), 多次低剂量 1 个月组和多次低剂量 3 个月组小鼠每日 60 mg/kg STZ 腹腔内注射, 连续注射 5 d, 分别于末次注射后 1 个月、3 个月取鼠尾静脉血。单次高剂量 1 个月组小鼠 150 mg/kg STZ 腹腔内注射 1 次, 于注射后 1 个月取鼠尾静脉血, 检测血糖和 HbA1c 水平, 血糖水平 >16.7 mmol/L 被认为糖尿病小鼠建模成功。注射完成后, 将小鼠饮水换成质量分数 5% 葡萄糖水, 每晚禁食前将葡萄糖水换成普通水。

1.2.2 角膜上皮缺损面积百分比测量 各组小鼠任意取 6 只, 盐酸氯胺酮注射液 2.0 ml 和盐酸氯丙嗪注射液 0.5 ml 混合, 稀释于 22.5 ml 质量分数 0.9% 氯化钠注射用水中, 配制成 25 ml 作为麻醉药品, 4 °C 冰箱保存, 采用腹腔内注射方式全身麻醉后, 以质量分数 2% 利多卡因滴眼液点眼行眼局部麻醉, 电动刮刀刮除中央 2 mm 直径内的角膜上皮, 每只小鼠只进行单眼操作。在角膜上皮刮除后 0、24 和 48 h 行质量分数 0.25% 荧光素钠染色、BQ900 裂隙灯显微镜照相, 应用 Image J 软件 (NIH, Bethesda, MD) 分析计算角膜上皮缺损面积百分比, 角膜上皮缺损面积比 = 各时间点缺损面积/0 h 缺损面积 × 100%。

1.2.3 免疫荧光染色法检测各组小鼠角膜上皮中 p-Akt、Sirt1 和 Ki67 的表达分布 各组于角膜上皮刮除后 48 h 取 4 只小鼠眼球置于冰冻切片包埋剂中速冻并切片, 以质量分数 4% 多聚甲醛固定, Triton X-100 透化处理, 体积分数 5% 牛血清白蛋白封闭, 分别加入 p-Akt、Sirt1 和 Ki67 一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗后加入相应荧光标记二抗, 室温孵育 1 h, DAPI 复染细胞核, Eclipse TE2000-U 荧光显微镜观察染色结果。

1.2.4 角膜敏感度测定

分别任意取 4 只角膜上皮刮除前, 刮除后 3、7、10 和 14 d 小鼠采用 Cochet-Bonnet 触觉测量器对各组小鼠进行测量。引起瞬目的最长细丝长度作为角膜敏感度的阈值。

1.2.5 免疫荧光染色法观察角膜神经密度 分别任意取 4 只角膜上皮刮除前, 角膜上皮刮除后 14 d 小鼠眼球置于 Zamboni 固定液中固定 1 h, 剪取角膜, Triton X-100 透化处理, 质量分数 1% 牛血清白蛋白封闭, 加入 anti- β -III tubulin 直标抗体 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗 6 次, Eclipse TE2000-U 荧光显微镜观察染色结果。使

用 Photoshop 软件将神经染色图片沿角膜边缘截取后保存, 用 Image J 软件采用同一标准分析角膜神经纤维密度, 得出量化的数值, 最终结果为 3 个组独立重复实验结果的平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件 (美国 IBM 公司) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计, 各组间不同时间点角膜上皮缺损面积百分比和神经敏感度的总体差异比较采用区组设计两因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验; 各组间小鼠 HbA1c、角膜敏感度、角膜神经密度以及再生角膜神经密度的比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各模型组成活率、糖尿病成模率及平均体质量的比较

多次低剂量 1 个月组小鼠全部存活, 糖尿病成模率达 90%。多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠成活率均为 95%, 糖尿病成模率分别为 80% 和 70% (表 1)。多次低剂量 1 个月组、多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠平均体质量分别为 (21.44 ± 0.48)、(22.16 ± 0.61) 和 (21.78 ± 0.41) g, 总体比较差异无统计学意义 ($F = 0.499, P > 0.05$)。

表 1 各模型组小鼠成活率及成模率

| 组别 | 样本量 | 成活率 | 不同血糖浓度样本数 (n) | | | | 成模率 |
|-------------|-----|------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|-----|
| | | | ≤16.7 mmol/L | >16.7 mmol/L | 25~30 mmol/L | >30 mmol/L | |
| 多次低剂量 1 个月组 | 20 | 100% | 2 | 18 | 8 | 5 | 90% |
| 多次低剂量 3 个月组 | 20 | 95% | 3 | 16 | 4 | 2 | 80% |
| 单次高剂量 1 个月组 | 20 | 95% | 5 | 14 | 0 | 0 | 70% |

注: STZ: 链脲佐菌素

2.2 各组小鼠血液 HbA1c 含量变化

正常对照组、多次低剂量 1 个月组和多次低剂量 3 个月组、单次高剂量 1 个月组间 HbA1c 水平的总体比较差异有统计学意义 ($F = 17.939, P < 0.001$)。与正常对照组相比, 各糖尿病模型组小鼠血液 HbA1c 水平明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 各糖尿病模型组间 HbA1c 水平比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 2)。

2.3 各组小鼠角膜上皮缺损面积百分比比较

不同时间点角膜上皮缺损面积百分比总体比较差

表 2 各组小鼠血液 HbA1c 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, mg/dl)

| 组别 | 样本量 | HbA1c 质量浓度 |
|-------------|-----|---------------------------|
| 正常对照组 | 7 | 5.64 ± 0.09 |
| 多次低剂量 1 个月组 | 7 | 9.60 ± 0.22 ^a |
| 多次低剂量 3 个月组 | 7 | 10.14 ± 0.66 ^a |
| 单次高剂量 1 个月组 | 7 | 9.93 ± 0.73 ^a |
| F 值 | | 17.939 |
| P 值 | | <0.001 |

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)
HbA1c: 糖化血红蛋白

异有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 438.725, P < 0.001$); 各组小鼠上皮刮除后 48 h 角膜上皮缺损面积百分比显著低于上皮刮除后 24 h, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。各组小鼠角膜上皮缺损面积百分比总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 31.515, P < 0.001$); 多次低剂量 1 个月组小鼠角膜上皮刮除后 24 h 和 48 h 的角膜上皮缺损面积百分比与正常小鼠组比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 但多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠角膜上皮缺损面积百分比均高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 且多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组间小鼠在角膜上皮刮除后 24 h 和 48 h 的角膜上皮缺损面积百分比比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1, 表 3)。

2.4 各组角膜上皮再生相关因子表达情况

多次低剂量 1 个月组小鼠角膜上皮 p-Akt、Sirt1 和 Ki67 的荧光强度均与正常对照组小鼠相近; 多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠角膜上皮 p-Akt、Sirt1 和 Ki67 的荧光强度均低于正常对照组, 而单次高剂量 1 个月组和多次低剂量 3 个月组间小鼠角膜再生相关因子荧光强度的差异不大 (图 2)。

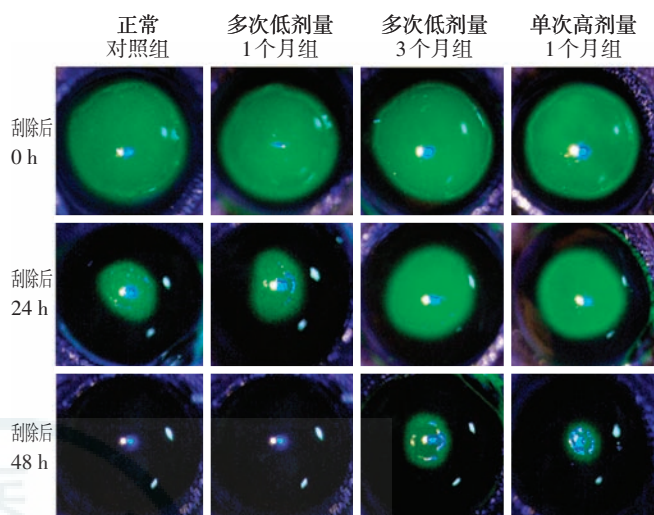


图 1 各组角膜上皮缺损荧光素钠染色观察 多次低剂量 1 个月组小鼠角膜上皮修复速度与正常对照组小鼠相近, 多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠角膜上皮修复延迟

表 3 各组小鼠角膜上皮缺损面积百分比的比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

| 组别 | 样本量 | 不同时间点角膜上皮缺损面积百分比 | |
|-------------|-----|---------------------------|---------------------------|
| | | 刮除后 24 h | 刮除后 48 h |
| 正常对照组 | 6 | 19.51 ± 1.86 | 1.05 ± 0.37 ^a |
| 多次低剂量 1 个月组 | 6 | 21.44 ± 1.40 | 2.31 ± 1.10 ^a |
| 多次低剂量 3 个月组 | 6 | 42.41 ± 3.05 ^b | 6.01 ± 1.88 ^{ab} |
| 单次高剂量 1 个月组 | 6 | 40.71 ± 2.27 ^b | 5.56 ± 1.55 ^{ab} |

注: $F_{\text{时间}} = 438.725, P < 0.001$; $F_{\text{分组}} = 31.515, P < 0.001$. 与各自组内上皮刮除后 24 h 值比较, ^a $P < 0.05$; 与正常对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验)

2.5 各组小鼠角膜敏感度与神经密度的比较

各组小鼠在角膜上皮刮除前后不同时间点角膜神经敏感度总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 234.720, P < 0.001$; $F_{\text{分组}} = 25.921, P < 0.001$)。角膜上皮刮除后 3 d, 各组间小鼠角膜敏感度比较差异均无统

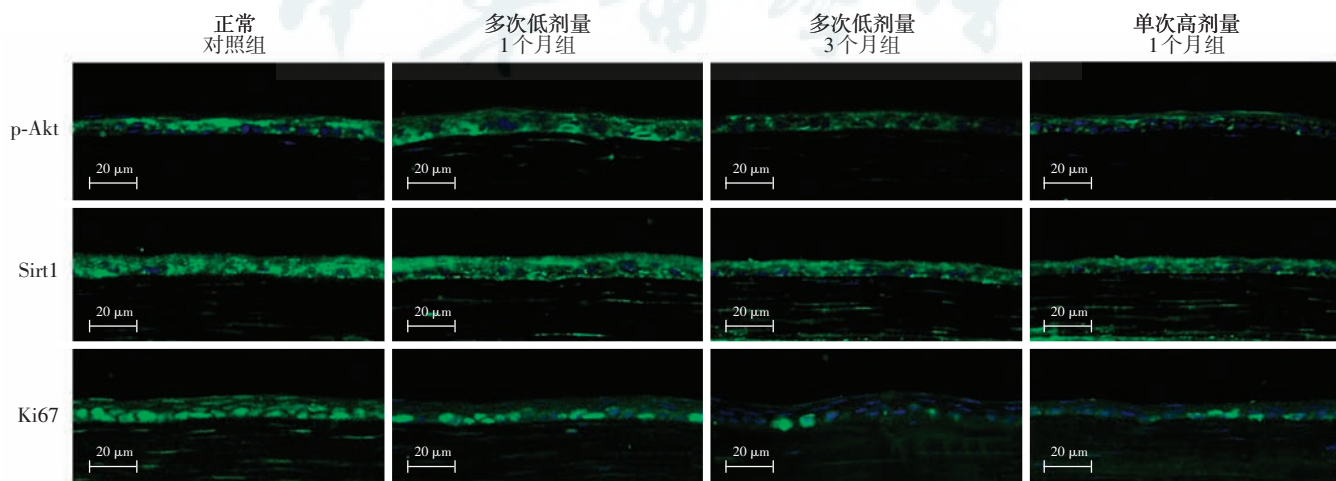


图 2 免疫荧光染色观察各组角膜上皮再生相关因子表达变化 ($\times 200$, 标尺 = 20 μm) 多次低剂量 1 个月组小鼠角膜上皮再生相关因子的荧光强度与正常对照组小鼠相近, 多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠角膜上皮再生相关因子的荧光强度低于正常对照组

表 4 各组小鼠角膜上皮刮除前后角膜神经敏感度的比较($\bar{x}\pm s, \text{mm}$)

| 组别 | 样本量 | 不同时间点损伤角膜敏感度 | | | | |
|-------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 刮除前 | 刮除后 3 d | 刮除后 7 d | 刮除后 10 d | 刮除后 14 d |
| 正常对照组 | 4 | 5.58±0.15 | 1.75±0.14 | 4.25±0.25 | 4.88±0.24 | 5.75±0.25 |
| 多次低剂量 1 个月组 | 4 | 5.50±0.18 | 1.38±0.24 | 3.75±0.14 | 4.63±0.13 | 5.50±0.20 |
| 多次低剂量 3 个月组 | 4 | 4.67±0.17 ^a | 1.50±0.20 ^a | 3.25±0.14 ^a | 3.50±0.20 ^a | 5.00±0.20 ^a |
| 单次高剂量 1 个月组 | 4 | 4.75±0.21 ^a | 1.38±0.13 ^a | 3.25±0.14 ^a | 3.63±0.31 ^a | 4.63±0.13 ^a |

注: $F_{\text{时间}}=234.720, P<0.001; F_{\text{分组}}=25.921, P<0.001$ 。与正常对照组比较, ^a $P<0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验)

计学意义(均 $P>0.05$)。在角膜上皮刮除前与刮除后 7、10、14 d, 多次低剂量 1 个月组小鼠与正常对照组、多次低剂量 3 个月组与单次高剂量 1 个月组的角膜敏感度比较, 差异均无统计学意义(均 $P>0.05$), 多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组小鼠角膜敏感度低于正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 4)。

角膜上皮刮除前, 正常对照组、单次高剂量、多次低剂量各组小鼠角膜神经密度的总体比较差异有统计学意义($F=6.000, P<0.05$); 角膜上皮刮除后 14 d, 各组小鼠角膜神经密度的总体比较差异有统计学意义($F=35.530, P<0.001$)。角膜上皮刮除前与刮除后 14 d, 多次低剂量 1 个月组小鼠角膜神经密度与正常对照组小鼠相比差异均无统计学意义(均 $P>0.05$); 多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组的小鼠角膜神经密度较正常对照组降低, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$); 而多次低剂量 3 个月组和单次高剂量 1 个月组间小鼠角膜密度比较, 差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(图 3, 表 5)。

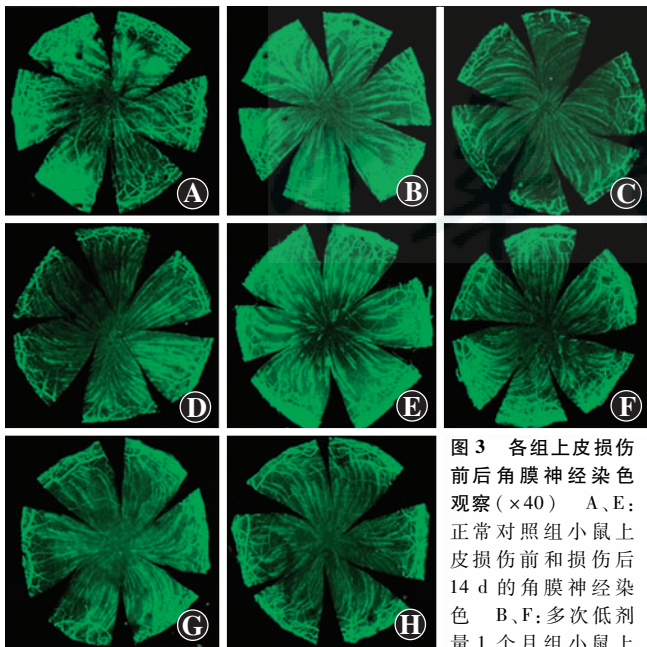


图 3 各组上皮损伤前后角膜神经染色观察($\times 40$) A、E: 正常对照组小鼠上皮损伤前和损伤后 14 d 的角膜神经染色 B、F: 多次低剂量 1 个月组小鼠上皮损伤前和损伤后 14 d 的角膜神经染色 C、G: 多次低剂量 3 个月组小鼠上皮损伤前和损伤后 14 d 的角膜神经染色 D、H: 单次高剂量 1 个月组小鼠上皮损伤前和损伤后 14 d 的角膜神经染色

表 5 各组小鼠角膜上皮刮除前后角膜神经密度的比较($\bar{x}\pm s, \%$)

| 组别 | 样本量 | 角膜神经密度 | |
|-------------|-----|-------------------------|------------------------|
| | | 损伤前 | 损伤后 14 d |
| 正常对照组 | 4 | 22.97±1.23 | 17.20±1.75 |
| 多次低剂量 1 个月组 | 4 | 19.33±3.12 | 14.50±0.56 |
| 多次低剂量 3 个月组 | 4 | 11.87±2.58 ^a | 5.77±0.90 ^a |
| 单次高剂量 1 个月组 | 4 | 13.07±0.66 ^a | 6.46±0.27 ^a |
| F 值 | | 6.000 | 35.530 |
| P 值 | | 0.019 | <0.001 |

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

3 讨论

近年来, 糖尿病的发病率迅速上升, 据国际糖尿病联合会估算, 到 2045 年, 全世界糖尿病患者将由 2017 年的 4.25 亿上升至 6.29 亿^[13]。在糖尿病眼部并发症中, DK 的发病率仅次于糖尿病视网膜病变和白内障。因此, 对 DK 的发病机制、预防与治疗的研究已不容忽视, 理想可靠的动物模型是研究 DK 机制和研发新药的重要手段。目前使用多次低剂量和单次高剂量 STZ 腹腔内注射诱导 1 型糖尿病动物模型报道较多, 但多数是作为研究糖尿病肾病和视网膜病变的模型, 针对 DK 模型报道较少^[14-16]。

糖尿病小鼠体内血糖水平升高, 由于 HbA1c 可较稳定地反映 8~12 周的血糖变化^[17-18], 因此作为本实验中表征小鼠体内血糖水平的重要指标。DK 以角膜上皮和神经病变特征最为明显, 1 型和 2 型糖尿病的角膜病变特征类似^[19-21]。此外, 我们前期研究已证实 p-Akt、Sirt1、Ki67 等角膜再生相关因子在糖尿病小鼠角膜上皮的表达下降^[11, 19, 22]。关于 DK 模型的建立, 目前多数采用多次低剂量 STZ 腹腔内注射后 3 个月的动物模型开展研究, 周期较长。因此, 本研究中采用 C57BL/6J 小鼠为研究对象, 比较了单次高剂量和多次低剂量 STZ 注射诱导的糖尿病小鼠角膜病变的区别。预实验结果发现, 按 150、180 和 200 mg/kg STZ 腹腔内注射均能诱导小鼠出现高血糖现象, 但 180 mg/kg 和 200 mg/kg 组小鼠的体质量降低程度和死亡率均较高, 因此, 本研究中选用 150 mg/kg STZ 为单次高剂量诱导糖尿病小鼠模型的浓度, 通过比较 150 mg/kg STZ

单次注射建模 1 个月和 60 mg/kg STZ 多次注射建模后 3 个月糖尿病小鼠的 HbA1c 值、角膜神经密度、角膜敏感度、角膜上皮和神经再生速度、角膜上皮再生相关因子表达情况,发现 2 个组间差异无统计学意义,且均符合 DK 的临床特征。但多次低剂量 STZ 注射建模后 1 个月的糖尿病模型小鼠与正常小鼠的角膜神经密度、角膜敏感度、角膜上皮和神经再生速度无显著性差异,说明多次低剂量组糖尿病模型小鼠在造模后 1 个月内未出现角膜病变特征。

综上所述,多次低剂量 STZ 注射后 1 个月不能诱导糖尿病小鼠出现角膜病变特征,而单次高剂量 STZ 注射后 1 个月和多次低剂量 STZ 注射后 3 个月的糖尿病模型小鼠出现典型的角膜上皮和神经病变,可作为研究 1 型 DK 的理想动物模型。

参考文献

- Pociot F. Type 1 diabetes genome-wide association studies; not to be lost in translation [J/OL]. Clin Transl Immunology, 2017, 6 (12) : e162 [2017-09-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29333267>. DOI:10.1038/cti.2017.51.
- Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Engl J Med, 2010, 362 (12) : 1090-1101. DOI: 10.1056/NEJMoa0908292.
- Schultz RO, van Horn DL, Peters MA, et al. Diabetic keratopathy [J]. Trans Am Ophthalmol Soc, 1981, 79 : 180-199.
- Ljubimov AV, Huang ZS, Huang GH, et al. Human corneal epithelial basement membrane and integrin alterations in diabetes and diabetic retinopathy [J]. J Histochem Cytochem, 1998, 46 (9) : 1033-1041. DOI:10.1177/002215549804600907.
- Bikbova G, Oshitari T, Tawada A, et al. Corneal changes in diabetes mellitus [J]. Curr Diabetes Rev, 2012, 8 (4) : 294-302.
- Schultz RO, Peters MA, Sobocinski K, et al. Diabetic keratopathy as a manifestation of peripheral neuropathy [J]. Am J Ophthalmol, 1983, 96 (3) : 368-371.
- Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. Curr Protoc Pharmacol, 2015, 70 : 1-20. DOI: 10.1002/0471141755.ph0547s70.
- Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN, et al. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia [J]. Diabetes, 1981, 30 (1) : 64-69.
- Gu D, Amush M, Sarvetnick N. Endocrine/exocrine intermediate cells in streptozotocin-treated Ins-IFN-gamma transgenic mice [J]. Pancreas, 1997, 15 (3) : 246-250.
- Yan C, Gao N, Sun H, et al. Targeting imbalance between IL-1 β and IL-1 receptor antagonist ameliorates delayed epithelium wound healing in diabetic mouse corneas [J]. Am J Pathol, 2016, 186 (6) : 1466-1480. DOI:10.1016/j.ajpath.2016.01.019.
- Yang L, Di G, Qi X, et al. Substance P promotes diabetic corneal epithelial wound healing through molecular mechanisms mediated via the neurokinin-1 receptor [J]. Diabetes, 2014, 63 (12) : 4262-4274. DOI:10.2337/db14-0163.
- Zhou Q, Chen P, Di G, et al. Ciliary neurotrophic factor promotes the activation of corneal epithelial stem/progenitor cells and accelerates corneal epithelial wound healing [J]. Stem Cells, 2015, 33 (5) : 1566-1576. DOI:10.1002/stem.1942.
- Karuranga S, Fernandes JR, Huang Y, et al. IDF diabetes atlas [M]. 8th ed. Brussels Belgium: IDF diabetes atlas Press, 2017.
- Azarkish F, Hashemi K, Talebi A, et al. Effect of the administration of solanum nigrum fruit on prevention of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Pharmacognosy Res, 2017, 9 (4) : 325-332. DOI:10.4103/pr.pr_47_17.
- Loeffler I, Liebisch M, Allert S, et al. FSP1-specific SMAD2 knockout in renal tubular, endothelial, and interstitial cells reduces fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition in murine STZ-induced diabetic nephropathy [J]. Cell Tissue Res, 2018, 372 (1) : 115-133. DOI:10.1007/s00441-017-2754-1.
- Yin Y, Chen F, Wang W, et al. Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy rats: possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF- κ B signaling pathway [J]. Mol Vis, 2017, 23 : 242-250.
- Brownlee M, Hirsch IB. Glycemic variability: a hemoglobin A1c-independent risk factor for diabetic complications [J]. JAMA, 2006, 295 (14) : 1707-1708. DOI:10.1001/jama.295.14.1707.
- Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, et al. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay [J]. N Engl J Med, 1984, 310 (6) : 341-346. DOI:10.1056/NEJM198402093100602.
- Di G, Du X, Qi X, et al. Mesenchymal stem cells promote diabetic corneal epithelial wound healing through TSG-6-dependent stem cell activation and macrophage switch [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58 (10) : 4344-4354. DOI:10.1167/iops.17-21506.
- Wang Y, Zhao X, Wu X, et al. microRNA-182 mediates Sirt1-induced diabetic corneal nerve regeneration [J]. Diabetes, 2016, 65 (7) : 2020-2031. DOI:10.2337/db15-1283.
- Dai Y, Zhao X, Chen P, et al. Neuropeptide FF promotes recovery of corneal nerve injury associated with hyperglycemia [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56 (13) : 7754-7765. DOI:10.1167/iops.15-16513.
- Wang Y, Zhao X, Shi D, et al. Overexpression of SIRT1 promotes high glucose-attenuated corneal epithelial wound healing via p53 regulation of the IGFBP3/IGF-1R/AKT pathway [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54 (5) : 3806-3814. DOI:10.1167/iops.13-12091.

(收稿日期:2018-02-19 修回日期:2018-05-08)

(本文编辑:张宇)

广告目次

止血祛瘀明目片 陕西摩美得气血和制药有限公司……封二

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

普诺特(预装式非球面人工晶状体) 爱博诺德(北京)医疗科技有限公司……前插页

普南扑灵(0.1% 普拉洛芬滴眼液) 千寿制药株式会社……前插页

露达舒(氯替泼诺混悬滴眼液) 博士伦(上海)贸易有限公司……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合磺片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

拓普康 OCT(全能真彩扫频源 OCT) 北京拓普康医疗器械有限公司……前插页

见康(拉坦前列素滴眼液) 华润紫竹药业有限公司……前插页

灵光(复方樟柳碱注射液) 华润紫竹药业有限公司……前插页

可乐必妥(左氧氟沙星滴眼液) 参天制药(中国)有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底