

[J].中国民族民间医药,2010,(20):95.

[13]张桂菊,陈海霞.康艾扶正片对恶性肿瘤治疗作用的疗效观察[J].当代医学,2011,17(15):140-141.

[14]黄玉筠.益气除痰法治疗老年晚期非小细胞肺癌的疗效评价及生存分析[D].广州:广州中医药大学,2014.

[15]焦丽静,许玲,李和根,等.中西医结合治疗对晚期肺癌远期生存预后的影响[C].第三届国际中医、中西医结合肿瘤学术交流大会暨第十二届全国中西医结合肿瘤学术大会:174-179.

[16]花宝金,朴炳奎.肿瘤虚证及扶正培本治疗的现代免疫机制研究[J].中国中医基础医学杂志,2000,6(3):60-63.

[17]刘莉,丁乾,曹如波,等.恶性肿瘤患者外周血 CD4+,CD25+调节 T 细胞的检测及其临床意义[J].临床肿瘤学杂志,2005,10(4):342.

[18]孟祥林,李海雷,徐玉玲,等.扶正固本法联合 CIK 细胞过继免疫治疗中晚期恶性肿瘤 70 例[J].中医研究,2013,26(5):19-22.

[19]丁金芳,施志明.2012.益气补肾法对乳腺癌患者外周血肿瘤免疫因子的影响[C].北京中医药学会 2012 年度学术年会论文汇编:北京中医药学会:34-38.

[20]黄桂军,李傅,宋精灵,等.扶正抑瘤汤联用化疗抗晚期前列腺癌患者术后局部病灶进展转移作用的临床研究[J].基础医学论坛,2014,18(1):1-4.

[21]张勇,郭逸,丁晓娟.参芪扶正注射液对肺癌小鼠化疗后免疫功能调节的影响[J].医学综述,2013,19(10):1878.

[22]Ebma T, Muarta K. Anti-tumor effector mechanism of interleukin-1 beat at distant site in the double grafted tumor system[J]. Jan J Cancer Res, 1991, 82(11):1292.

[23]周语平,张敏,刘光炜,等.应用肿瘤双植入模型技术研究扶正消癌方的抑瘤作用及其对 IL-12, MMP-9 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,9,16(12):132-135.

[24]侯力,凌茂英,吕申,等.小鼠肝癌细胞特异性淋巴道转移与其基质金属蛋白酶分泌的关系[J].中华病理学杂志,2000,29(4):276.

课题来源:

《基于“内环境平衡”探索中医药干预乳腺癌的研究》,广东省中医药管理局资助重点项目(2012年)。

《中医“扶正”法对局部晚期/进展期乳腺癌化疗疗效的影响及其代谢组学变化规律的研究》,广东省中医药管理局资助项目(2013年)。

编辑:赵聪 编号:EB-15031133(修回:2015-05-13)

活体荧光眼底造影对长期 2 型糖尿病小鼠视网膜血管损害的观察

Observation of Retinal Blood Vessel Damage in Mice with Long-term type 2 diabetes Mellitus by Fluorescence Fundus Angiography

马红婕^{1,2,3} 张欣³ 唐仕波^{1,2*} 汪建新³ 汪振芳⁴

(1. 深圳爱尔眼科医院, 广东 深圳, 518000; 2. 中南大学爱尔眼科学院, 湖南 长沙, 418003; 3. 美国纽约州立大学布法罗分校眼科, 美国 纽约; 999039; 4. 中山大学中山眼科中心国家重点眼科研究所, 广东 广州, 510060)

中图分类号: R7747.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860(2015)24-0024-03 证型: DBG

【摘要】目的: 活体观察长期 2 型糖尿病小鼠视网膜血管的损害。方法: 应用荧光眼底血管造影(FFA)活体观察视网膜血管, 对长期 2 型糖尿病小鼠视网膜血管数量及渗漏状态进行综合评价。结果: 眼底照相显示长期 2 型糖尿病小鼠视网膜可见动脉反光增强, 静脉迂曲扩张, 未见明显荧光素渗漏, 但可见毛细血管网密度降低。结论: 2 型糖尿病小鼠的视网膜血管损害主要表现为血管退行性变, 而非血管的渗漏。

【摘要】2 型糖尿病; 荧光眼底血管造影

【Abstract】Objective: To observe the damage of retinal blood vessels in mice with long-term type 2 diabetes. Methods: The retinal blood vessels were observed by fluorescence fundus angiography (FFA) and the number and situation of the retinal blood vessels and leakage of type 2 diabetic mice were observed and evaluated. Results: The fundus photography showed that the visibility of type 2 diabetic mice retinal arteries was enhanced and vein dilated, but no obvious fluorescein leakage. Conclusion: The main manifestation of type 2 diabetic mice is retinal vascular damage, not the blood vessels.

【Keywords】Type 2 diabetes; Fluorescence Fundus Angiography
doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.24.011

糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)是最常见的糖尿病微血管并发症。几乎所有的 1 型糖尿病患者和 60.0%

的糖尿病患者合并 DR^[1]。随着糖尿病视网膜病变的患病率急剧升高, DR 已经成为世界上首要的致盲性疾病^[2]。视网膜血管损害是 DR 最早的标志性病理改变。这些病变最终导致缺血、缺氧、新生血管形成及牵拉性视网膜脱离, 严重危害视力^[3,4]。研究糖尿病血管损害的发病机制对疾病的治疗方法的开拓, 具有重要意义。对于糖尿病视网膜病变动物模型的建立及观察是疾病机制研究的根本问题。本研究应用 Micron III 摄像系统, 活体观察 2 型糖尿病小鼠视网膜血管改变, 评价其作为糖尿病视网膜病变研究的动物模型的合理性。

1 材料与方法

1.1 动物模型

9 个月龄的 Leprdb (db/db) 小鼠 5 只作为研究组, 并以 db/+ 小鼠作为非糖尿病对照组 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)。动物饲养于美国纽约州立大学布法罗分校的动物研究中心。所有动物实验步骤均严格遵照布法罗分校动物中心护理及应用委员会和视觉与眼科研究协会 (ARVO) 发表的眼科和视觉动物研究声明中的指引。标准颗粒饲料喂养, 不限食水, 室内通风良好, 室温 18~22°C。定期检测小鼠尾血血糖, Acute Check 罗氏血糖仪 (罗氏公司), 血糖值 >300 mg/dl 定位糖尿病小鼠。

1.2 眼底照相及荧光血管造影 (Fundus Fluorescein Angiography, FFA)

应用 Micron III 摄像系统 (Phoenix Research Laboratories, San Ramon, CA) 进行小鼠眼底观察及荧光血管造影。先用 1% 硫酸阿托品滴眼液 (爱尔康公司) 及 2.5% 的异丙肾上腺素 (phenylephrine hydrochloride, 博士伦公司) 散瞳。腹腔注射 1 ml/kg 10% 荧光素钠 (Akorn, Inc. Lake Forest, IL) 后, 立即开始眼底照相的采集, 连续采集 15 min。

1.3 视网膜铺片免疫荧光染色及激光扫描共聚焦显微镜观察

10% 水和氯醛 0.4 ml/kg 腹腔注射麻醉后, 取小鼠眼球置于 4% 多聚甲醛固定 45 min 后, 将小鼠视网膜完整剥出, 置于 10% 山羊血清 + 0.5% PBST (Triton 100:PBD) 室温 2 h, 处理组织通透性并封闭非特异抗原。以 Alexa Fluor 594-荧光标记的生物素 isolectin GS B4 (1:200, Invitrogen) 在 10% 山羊血清 + 0.5% PBST 着然视网膜血管 (4°C, 24 h)。予 0.5% PBST 溶液漂洗 3 h 后, 视网膜平铺于载玻片上, 荧光抗衰减封片剂并封片后在蔡司共聚焦显微镜下 (LSM 510 Meta, Carl Zeiss, 德国) 观察, 激光激发波长为 594 nm。应用 Z-stacks 功能重建中周部视网膜内层及外层血管, 范围为 450 μm × 450 μm, 应用 Adobe Photoshop CC 软件分析视网膜微血管密度 (n=5)。

1.4 统计分析

所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组之间的比较以非配对 *t* 检验, *P* < 0.05。

2 结果

2.1 动物模型

2 型糖尿病小鼠所测得体重及血糖均高于同龄对照组 (见

表 1)。

表 1 实验动物体重及血糖 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重 (g)	血糖 (mg/dl)
db/+	5	41.4 ± 7.47	179.8 ± 27.15
db/db	5	63.2 ± 3.90	463 ± 44.29

2.2 视网膜 FFA 表现

视网膜血管退行性变, 包括血管内皮细胞凋亡、周细胞丢失等, 是 2 型糖尿病视网膜病变的最早期的特征性表现^[4]。在本研究中, 我们应用 Micron III 眼底城乡系统及活体荧光血管造影技术对长期 2 型糖尿病小鼠视网膜血管功能进行评价。与非糖尿病 db/+ 小鼠对比 (图 1A, C), 糖尿病 db/db 小鼠表现动脉反光增强, 串珠样静脉扩展 (图 1B, D), 但未见明显微血管渗漏、微血管瘤或新生血管形成。

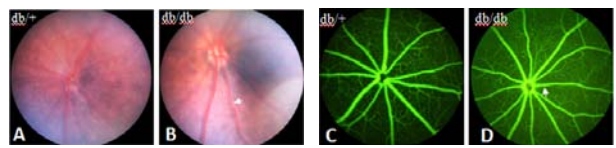


图 1 (2 型糖尿病小鼠活体视网膜荧光造影表现)

2.3 视网膜深层毛细血管网密度

为进一步评价视网膜毛细血管的密度, 我们应用 isolectin B4 着染视网膜血管结构, 经共聚焦显微镜逐层扫描并重构后 (图 2A), 分析计算深层的视网膜毛细血管网密度。结果显示, 糖尿病 db/db 小鼠视网膜毛细血管密度明显较对照组下降 (图 2B)。

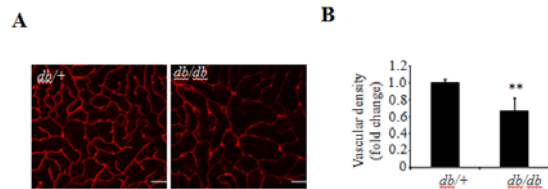


图 2 (视网膜内层毛细血管密度改变)

3 讨论

以往对糖尿病视网膜血管渗漏及血管结构的观察方法, 主要借助于视网膜切片技术测量视网膜厚度; 应用伊文思蓝或荧光标记的大分子葡聚糖心脏-视网膜循环后, 取出视网膜在荧光显微镜下观察荧光的渗漏, 或萃取荧光染料进行定量。但是这两者均存在很大的弊端。石蜡切片的制作过程需要脱水, 会造成组织的皱缩、挤压、变形, 影响正常的视网膜厚度和形态的观察。Jiao 等^[5]的实验中发现, 石蜡切片技术测量的视网膜厚度比 OCT 测量值要薄, 尤其是在血管丰富、细胞质丰富及含水量多的组织, 两种方法测量的误差会更大。而冰冻切片的制作过程, 需要急速的降温, 组织可能会混有小冰晶, 冰冻切片也要经过脱水固定步骤, 对视网膜的实际厚度也会产生影响。而取出离体的视网膜对荧光染料的分析, 均在动物深度麻醉或死亡后, 整个操作过程存在诸多的干扰因素, 如眼球的压迫、液体灌注对视网膜血管的损伤、灌注压力的个体或组间差异、甚至在铺片制作过程中器械对视网膜血管的损伤。应用 FFA 技

术观察糖尿病动物模型的视网膜功能，达到评价小鼠早期 DR 的目的。

本组小鼠的 FFA 检查发现，2 型糖尿病小鼠在 36 周时未出现眼底血管的荧光渗漏，但是 Xu 等^[6]的研究表明，糖尿病大鼠造模后第 2 周，应用伊文思蓝的方法，可发现血—视网膜屏障的破坏。血—视网膜屏障破坏后视网膜血管的渗漏取决于染料相对分子质量的大小及其亲水或亲脂性^[7]。相对分子质量小且不易与脂蛋白结合的物质不容易漏出视网膜血管，而相对分子质量大且亲脂性的物质则容易出现渗漏。荧光素钠的相对分子质量为 376.27，与血浆蛋白的结合率为 80.0%，而伊文思蓝的相对分子质量为 960.80，在血液中与血浆清蛋白有很高的亲和力。这两种染料的理化性质可能是引起两种技术检测视网膜血管渗漏结果出现差异的原因之一。此外，伊文思蓝需要用 pH3.5 的溶液进行溶解，在组织中可引起细胞的变形，进而导致血-视网膜屏障的破坏。Nagy 等^[8]的研究发现，大鼠大脑灌注酸性溶液后可引起血—脑屏障的迅速破坏。Berkowitz^[9]用无创性动态对比增强 MRI (dynamic contrast-enhanced MRI, DCE-MRI) 技术检查发现，糖尿病大鼠在 8 个月时才出现血—视网膜屏障的破坏。因此在观察血-视网膜屏障功能时，要尽可能选择那些不引起人为破坏的方法。本研究应用中 FFA 技术观察早期糖尿病大鼠血-视网膜屏障的功能，更接近疾病的真实病理状态和人的临床检查结果，与离体视网膜检查技术相比具有独特的优势。近期研究显示，在糖尿病动物模型中，在发生 FFA 可探测的荧光素渗漏之前，OCT 可探测视网膜厚度增加，提示这一视网膜的水肿可能来源水视网膜细胞内的水肿，如神经细胞及胶质细胞^[10]。临床工作中，我们也发现，有的病人在眼底荧光造影上未发现明确的渗漏，OCT 检查却发现了黄斑水肿。这说明渗出并不是 DME 发生的另一种机制。已有研究发现：在 DME 发生中，神经胶质细胞的细胞性水肿可能出现在血管渗漏之前^[11]。

啮齿类动物的糖尿病模型是否可诱导视网膜新生血管的发生，在业界内一直存在争议。由于啮齿类动物的寿命较短，既往的研究大多数仅对发病后 8~12 周的动物进行观察，仅有少数对 24 周病程的动物进行离体观察。方法大多为视网膜切片或消化铺片结合免疫荧光等，但这些方法均存在局限性，例如一些抗体可作为人类视网膜新生血管标记，但不能作为小鼠或大鼠的新生血管抗体。在本研究中，我们在病程长达 9 个月（36 周）的 2 型糖尿病小鼠进行活体 FFA 及离体视网膜铺片染色，均为见到新生血管结构出现，再次证实糖尿病啮齿类动物模型并非研究增殖性糖尿病视网膜 (PDR) 合理的动物模型。但是，我们同时发现虽然没有新生血管，这些长病程的糖尿病小鼠视网膜毛细血管密度明显降低。这与以往在消化铺片观察到的糖尿病啮齿类视网膜周细胞及血管内皮细胞计数减少，等细胞凋亡及血管退行性变的现象符合。因而，我们认为 2 型糖尿病小鼠模型是研究糖尿病所诱导血管细胞（周细胞及内皮细胞）凋亡机制的动物模型。

参考文献:

[1]Fong D.S,Aiello L,Gardner TW,et al. Retinopathy in diabetes[J].Diabetes care,2004,27(1):S84-7.

[2]Mohamed Q,Gillies MC,Wong T Y.Management of diabetic retinopathy:a systematic review[M].JAMA:the journal of the American Medical Association,2007:298,902-16.

[3]Antonetti D A,Lieth E,Barber A J,et al.Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy[J].Seminars in ophthalmology,1999,(14): 240-8.

[4]Gardner TW,Antonetti DA, Barber AJ,et al.New insights into the pathophysiology of diabetic retinopathy: potential cell-specific therapeutic targets[J].Diabetes technology & therapeutics,2000,(2):601-8.

[5]Jiao J, Mo B, Wei H,et al.Comparative study of laser-induced choroidal neovascularization in rats by paraffin sections, frozen sections and high-resolution optical coherence tomography, Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology[J].Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie,2013,251, 301-7.

[6]Xu Q, Qaum T,Adamis AP.Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue[J].Investigative ophthalmology & visual science,2001,(42):789-94.

[7]Lozano DC,Twa MD.Quantitative evaluation of factors influencing the repeatability of SD-OCT thickness measurements in the rat[J].Investigative ophthalmology & visual science,2012,(53):8378-85.

[8]Nagy Z, Szabo M,Huttner,I.Blood-brain barrier impairment by low pH buffer perfusion via the internal carotid artery in rat[J].Acta neuropathologica,1985,(68):160-3.

[9]Berkowitz BA,Roberts R,Luan H,et al.Dynamic contrast-enhanced MRI measurements of passive permeability through blood retinal barrier in diabetic rats[J].Investigative ophthalmology & visual science,2004,(45):2391-8.

[10]孙伟,林,李涛,田蓉,等. (2014) STZ 诱导的糖尿病大鼠早期视网膜血管渗漏的 FFA 检查及视网膜厚度的 OCT 观察[J].中华实验眼科,32, 318-23.

[11]Lobo CL,Bernardes RC,Cunha-Vaz JG.Alterations of the blood-retinal barrier and retinal thickness in preclinical retinopathy in subjects with type 2 diabetes[J].Archives of ophthalmology,2000,(118):1364-9.

基金项目:

广东省科技计划项目，编号 20110316。

作者简介:

马红婕 (1978-), 女, 广东佛山人, 主治医师, 博士研究生, 玻璃体视网膜疾病。

唐仕波* (1961-), 男, 通讯作者, 广西合浦人, 教授, 博士研究生, 玻璃体视网膜疾病。

编辑: 赵聪 编号: EB-15062409F (修回: 2015-07-15)