论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0948-03

高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视小鼠模型的建立

张衡頔,刘 波,王 一 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心)

【摘要】 **目的** 探讨高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视小鼠模型的制备方法。**方法** 选取1周龄的BALB/cJ小鼠30只,通过查随机数字表分为3组,每组10只:正常对照组、诱发高血糖组、诱发高血糖联合形觉剥夺性近视/弱视组。右眼睑缝和建立形觉剥夺性近视/弱视,腹腔多次小剂量注射链脲菌素(STZ)诱发高血糖。**结果** 成功建立形觉剥夺性近视/弱视与高血糖小鼠模型;与对照组相比,诱发高血糖小鼠的血糖[高血糖组(20.66±3.51)mmol/L,高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视组(21.05±5.91)mmol/L]、体质量均显著改变[对照组(26.90±4.38) g,高血糖组(18.02±3.90)g,高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视组(15.87±5.61)g;$P<0.01$]。缝合眼睑小鼠右眼眼轴长度、屈光度[(3.348±0.018)mm,(9.05±1.42)D]与对照组[(3.310±0.041)mm,(11.80±2.24)D]相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 缝合眼睑联合STZ小剂量多次腹腔注射是一种可靠的制备高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视小鼠模型的方法。

【关键词】 形觉剥夺性近视;弱视;高血糖;动物模型;小鼠
【中图法分类号】 R-332;R774.1;R587.1 【文献标志码】 A

Establishment of mouse model of hyperglycemia associated with form-deprivation myopia/amblyopia

Zhang Hengdi, Liu Bo, Wang Yi (Center of Ophthalmonogy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To establish a new animal model of hyperglycemia associated with form-deprivation myopia/amblyopia in order to provide animal experiment data for researching the relationship between early stage diabetic retinopathy and refraction error. **Methods** A total of 30 one-week-old BALB/cJ mice were randomly divided into 3 groups ($n=10$ for each group), control group (group Ⅰ), hyperglycemia group [group Ⅱ, repeatedly injected of 50 mg/kg streptozotoein (STZ) intraperitoneally from 30 d after birth to induce hyperglycemia], and hyperglycemia and form-deprivation myopia/amblyopia group (group Ⅲ, with their right eyes were sutured at 10 d after birth, and then injected with 50 mg/kg STZ in 30 d after birth). Their blood glucose level were measured from 1 d after STZ injection, once a week. Their dioptres were examined, and body weight and ocular axial length were measured in 82 to 87 d. **Results** Group Ⅱ and group Ⅲ had much higher blood glucose (20.66±3.51 and 21.05±5.91 mmol/L) and significantly lower body weight (18.02±3.90 and 15.87±5.61 g) when compared with those of control group (8.77±4.38 mmol/L and 26.90±4.38 g respectively, $P<0.01$). Compared with group Ⅰ (11.80±2.24 D, 3.310±0.041 mm) and group Ⅱ (12.25±1.77 D and 3.315±0.031 mm), the diopter was significantly decreased and the ocular axial length was elongated obviously in the right eyes of group Ⅲ (3.348±0.018 mm, 9.05±1.42 D, $P<0.01$). **Conclusion** Hyperglycemia associated with form-deprivation myopia can be induced in BALB/cJ mice successfully through STZ injection and eye lid suturing when the mice are within 10-day-old.

【**Key words**】 form-deprivation myopia; amblyopia; hyperglycemia; animal model; mouse

Corresponding author: Wang Yi, E-mail: wangyieye@yahoo.com.cn

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)被认为是长期慢性高血糖所致微循环损伤,是导致失明的重要原因[1]。既往临床观察表明,近视的程度与DR的严重程度呈负相关[2],但其发生机制尚不清楚,而建立理想的动物模型是研究其机制的首要条件。小鼠作为广泛应用的医学实验动物,其基因背景纯,生长周期短,是易于获得和饲养的哺乳类动物,且其眼球巩膜壁上的生长因子受体与人类相同,可以较好地模拟人类形觉剥夺性近视眼轴生长的过程以及早期DR的形

【通信作者】 王 一,E-mail:wangyieye@yahoo.com.cn

成过程。但目前小鼠尚少见被应用到高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视研究中。本研究探讨高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视小鼠模型的制备方法，旨在为早期糖尿病视网膜病变与屈光不正的相关性研究提供动物实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

出生 1 周的 BALB/cJ 乳鼠（第三军医大学实验动物中心提供）30 只，雌雄不限，体质量 10.4～14.2 g，乳鼠由母鼠喂养。成年小鼠人工饲养在安静、通风、恒温（25 ℃）、自然昼夜的环境中。链脲佐菌素（streptozocin，STZ）（美国 Alexis 公司），以无菌枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液配制成 pH＝4.5，浓度 2% 的溶液。

1.2 方法

1.2.1 分组及动物模型的制作 查随机数字表将乳鼠分为 3 组，每组 10 只，Ⅰ组为正常对照组，腹腔注射等量 PBS 缓冲液；Ⅱ组为高血糖组，生后 30 d 按 50 mg/kg 经左下腹小剂量多次注射 STZ 诱发高血糖；Ⅲ组为高度近视组合并高血糖组，于生后 10 d 缝合右眼睑，生后 30 d 按同样剂量和方法注射 STZ 诱发高血糖。3 组小鼠于暗室内带状光检影验光，测双眼屈光度（在工作距离 50 mm 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）。以屈光度改变在 －3.00 D 以上为形觉剥夺性近视/弱视小鼠。在糖尿病造模后第 1 天，取尾血测定血糖，此后每 7 天测尾血血糖 1 次。所有小鼠在生后 72～77 d 时，20% 乌拉坦深度麻醉，50 ml 生理盐水经左心室灌注冲洗后，摘取双眼球，修剪球周组织，暴露视神经入球处，在显微镜（日本，Olympus）下，放大 4 倍照相，在相片上做角巩膜交点的连线，平行于该连线，做视神经入球处的连线，从角巩膜交点连线中点做一垂线，与视神经入球处连线、角膜顶点的切线相交，通过显微镜自带 Image Pro Plus 软件标尺测量该垂线长度[3]（图 1）。

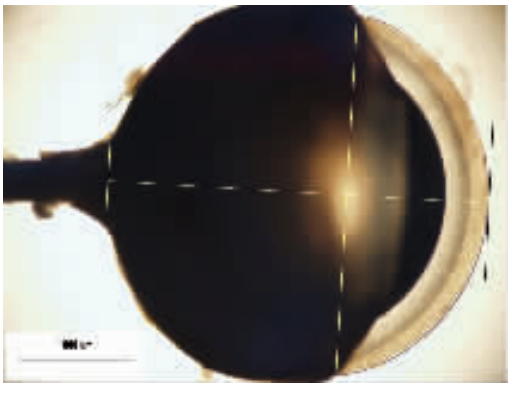


图 1 小鼠眼轴测量 （×4）

1.2.2 成模标准 高血糖成模标准：以空腹血糖＞11.1 mmol/L 为高血糖小鼠。形觉剥夺性近视/弱视成模标准：以屈光度改变在 －3.00 D 以上为形觉剥夺性近视/弱视小鼠。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，3 个组小鼠血糖、体质量、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单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况

对照组小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Ⅲ组腹腔注射 STZ 的小鼠于造模后第 5～10 天，血糖达成模标准，成模后第 2 周即出现多饮、多食、多尿等糖尿病症状，体质量减轻，此后每周测量尾血血糖均＞11.1 mmol/L，实验过程中无死亡。

2.2 小鼠血糖、体质量、屈光度及眼轴长度的变化

腹腔内注射 STZ 的Ⅱ、Ⅲ组血糖值明显高于正常对照组，差异均有统计学意义（$P<0.01$），而体质量低于正常对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。Ⅲ组屈光度高于Ⅰ、Ⅱ组，差异有统计学意义（$P<0.01$），且眼轴长也高于Ⅰ、Ⅱ组，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。见表 1。

表 1 3 组小鼠血糖、体质量、右眼屈光度及眼轴长度情况比较（$n=10$，$\bar{x} \pm s$）

组别	血糖（mmol/L）	体质量（g）	屈光度（D）	眼轴长度（mm）
Ⅰ组	8.77 ±4.38	26.90 ±4.38	11.8 ±2.24	3.310 ±0.041
Ⅱ组	20.66 ±3.51[a]	18.02 ±3.90[a]	12.25 ±1.77	3.315 ±0.031
Ⅲ组	21.05 ±5.91[a]	15.87 ±5.61[a]	9.05 ±1.42[ab]	3.348 ±0.018[ab]

a：$P<0.01$，与Ⅰ组比较；b：$P<0.01$，与Ⅱ组比较

3 讨论

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，但其发病机制尚不完全清楚。临床观察发现，近视的程度与 DR 的严重程度呈负相关[2]，但发病机制尚不清楚。DR 是由长期高血糖的慢性损伤发展而来，因此，建立理想的高血糖合并高度近视动物模型，是进行 DR 相关研究的重要基础。

自 1977 年 Wiesel 等发现缝合眼睑可造成猴形觉剥夺性近视/弱视后，研究者在多种实验动物上复制了该模型，包括雏鸡（*Schwartz*，1986 年），灵长类（*Tiggers*，1990 年），树鼩（*Sherman*，1977 年），猫（*Thorn*，1979 年）。近年来用于建立形觉剥夺性近视/弱视模型的有小鼠（*Faulkner*，2007 年），豚鼠（*Howlett*，2006 年）。哺乳类动物因其眼球结构及眼生物化学特性与人类相似，在研究中受到重视，其中小鼠因其基因背景纯，且巩膜壁上具有人类所有的 5 种 M 型生长受体，较之豚鼠，小鼠造成形觉剥夺性近视/弱视所需时间更短[4-9]，因此，小鼠是一种良好的形觉剥夺性近视/弱视动物模型，能够较好的模拟人类病理性近视的形成过程。DR 实验动物模型主要分为自发性遗传性动物模型、诱发性动物模型和转基因动物模型。遗传性动物模型的发病受环境或基因突变影响，与胰岛素缺乏有关，发病严重程度不易控制，可提供研究的数量有限，不利于在实验研究中广泛使用。诱发性动物模型用药后发病迅速，是目前最常用的方法。DR 常用

的实验动物有猴、猫、狗、猪、鼠等，因为其视网膜有精细复杂的血管网，可用于糖尿病视网膜病变实验研究。研究发现在糖尿病大鼠发病1个月内发生视网膜组织代谢异常，而其最早的组织病理损害（周细胞丧失）在6个月内出现（胡玉章等，1993年）。Engerman等[10]对糖尿病猫进行5年观察后，发现血糖控制不良则视网膜损害呈进行性，而控制良好者视网膜损害则停止，猴、狗等动物发生早期DR改变的时间则更长。而小鼠发生早期DR组织病理损害在造成高血糖后1个月[11]，因此，小鼠作为高血糖动物模型具有成模时间短、病变发生快的优点。但多数的动物模型仅表现为非增值性糖尿病视网膜病变，增殖性视网膜病变极为少见，在小鼠持续高血糖对视网膜造成的损害仅表现为周细胞丢失、毛细血管基底膜增厚，与人类糖尿病视网膜病变病程发展有一定差异，对增殖性糖尿病视网膜病变的研究价值尚有待长期实验观察证明。

本实验中，单纯高血糖小鼠右眼球屈光度与正常对照组无统计学差异。但在临床观察中，高血糖和糖尿病患者眼屈光度往往有一定改变，其原因是由于血糖升高，晶状体内葡萄糖增多，渗透压增加，吸收水分体积增大，晶状体凸度增加，屈光力增强而产生一过性近视；但由于小鼠眼球小，验光误差较大，因此轻度的屈光改变可能无法验出；此外，小鼠眼晶体呈球形，占据眼球内容物的绝大部分，因此其晶状体凸度的增加可能对原本已是球形的晶体屈光改变不大。本实验中单侧眼睑缝合仅获得-3.00 D以上的形觉剥夺性近视/弱视，未达到人类高度近视的诊断标准（-6.00 D），这可能与高血糖对屈光度的影响有关。已有临床观察认为，短期高血糖可导致远视性屈光不正，其远视性屈光不正发生早于角膜曲率、晶状体厚度改变[12-13]。Giusti[14]认为，高血糖可能通过影响山梨醇代谢途径改变视网膜厚度，并导致眼轴长度的变化，在人类，平均视网膜纤维层厚度与高度近视屈光度呈正相关[15]，每50微米视网膜厚度改变对应0.2 D屈光度变化。这一数值变化在小鼠可能更加显著，因其眼轴短，因此视网膜增厚可能导致的眼轴变化对屈光度的影响更大。另一方面，小鼠眼屈光度在性成熟后仍然呈增长趋势。Barathi等[3]发现BALB/cJ小鼠眼球屈光度在生后28 d为+10 D，42 d为+13 D，60 d可达+16 D。因此，小鼠本身的屈光度远视化改变也会抵消一部分实验所造成的近视。本实验中，Ⅲ组小鼠成功建立了稳定的高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视模型，其中高血糖在注射STZ后7～14 d达到成模标准，此后每周测血糖均>11.1 mmol/L。形觉剥夺性近视/弱视在缝合眼睑62～67 d，即生后72～77 d能观察到-3.00 D以上的近视化改变，较之对照组和高血糖组眼轴明显增长，符合人类轴性近视的改变。我们在后续实验中也发现高血糖小鼠视网膜微血管出现周细胞及内皮细胞凋亡、毛细血管基底膜增厚等早期DR改变，说明小鼠是一种快捷、稳定的、易于获得和造成的高血糖合并形觉剥夺性近视/弱视模型，短时间内能观察到早期DR病变，为研究早期DR改变与屈光不正的关系提供了良好的实验动物基础。

参考文献：

[1] Namperumalsamy P, Kim R, Vignesh T P, *et al*. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy: a population-based assessment from Theni District, south India[J]. Postgrad Med J, 2009, 85(1010): 643-648.

[2] Lim L S, Lamoureux E, Saw S M, *et al*. Are myopic eyes less likely to have diabetic retinopathy? [J]. Ophthalmology, 2010, 117(3): 524-530.

[3] Barathi V A, Boopathi V G, Yap E P, *et al*. Two models of experimental myopia in the mouse[J]. Vision Res, 2008, 48(7): 904-916.

[4] Tkatchenko T V, Shen Y, Tkatchenko A V. Mouse experimental myopia has features of primate myopia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(3): 1297-1303.

[5] Faulkner A E, Kim M K, Iuvone P M, *et al*. Head-mounted goggles for murine form deprivation myopia[J]. J Neurosci Methods, 2007, 161(1): 96-100.

[6] Tejedor J, de-la-Villa P. Refractive changes induced by form deprivation in the mouse eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1): 32-36.

[7] Zhou X, Shen M, Xie J, *et al*. The development of the refractive status and ocular growth in C57BL/6 mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(12): 5208-5214.

[8] Schaeffel F, Burkhardt E, Howland H C, *et al*. Measurement of refractive state and deprivation myopia in two strains of mice[J]. Optom Vis Sci, 2004, 81(2): 99-110.

[9] 周翔天，瞿佳. 近视研究中动物模型的选择[J]. 中华眼科杂志，2005，41(6)：486-487.

[10] Engerman R L, Kern T S. Progress of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control[J]. Diabetes, 1987, 36(7): 808-812.

[11] vom-Hagen F, Feng Y, Hillenbrand A, *et al*. Early loss of arteriolar smooth muscle cells: more than just a pericyte loss in diabetic retinopathy[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2005, 113(10): 573-576.

[12] Wiemer N G, Eekhoff E M, Simsek S, *et al*. The effect of acute hyperglycemia on retinal thickness and ocular refraction in healthy subjects[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008, 246(5): 703-708.

[13] Tai M C, Lin S Y, Chen J T, *et al*. Sweet hyperopia: refractive changes in acute hyperglycemia[J]. Eur J Ophthalmol, 2006, 16(5): 663-666.

[14] Giusti C. Transient hyperopic refractive changes in newly diagnosed juvenile diabetes[J]. Swiss Med Wkly, 2003, 133(13/14): 200-205.

[15] 刘莛，贺翔鸽. 近视眼视网膜神经纤维层厚度与屈光因素关系的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(1)：81-83.

（收稿：2011-01-27 修回：2011-03-03）

（编辑 龙 亮）