

• 研究论文 •

糖尿病大鼠视网膜血流动力学与视网膜血管形态学关系的研究

胡金芳^{1,2}, 刘兆凤², 刘 静^{1,2}, 申秀萍¹

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193

摘要:目的 应用彩色多普勒超声(CDI)技术和视网膜血管消化铺片技术及组织病理学检查, 监控糖尿病视网膜病变(DR)发生发展的过程, 研究糖尿病大鼠视网膜血流动力学与视网膜血管形态学的关系。方法 给大鼠 ip 链脲佐菌素诱导成糖尿病模型, 分别在造模 2、4、6 个月时, 采用 CDI 检查测定大鼠视网膜中央动脉(CRA)的血流动力学, 应用视网膜血管消化铺片计算内皮细胞/周细胞比值, 同时做组织病理学检查。结果 在糖尿病病程 2 个月时, 糖尿病大鼠 CRA 血流流速显著下降, 而视网膜血管消化铺片未见异常, 在病程 4 个月和 6 个月时, 视网膜血管消化铺片出现内皮细胞增生, 周细胞减少, 镜下视网膜内新生血管形成、出血或渗出等病理改变, 而此时血流流速减慢严重。结论 糖尿病早期, 视网膜血流动力学已经出现异常改变, 并进行性加重, 提示视网膜血流减少、血液灌注不良是 DR 的重要发病原因。在糖尿病早期、DR 发病之前即进行相应的治疗以改善视网膜的血供, 可能延缓或逆转 DR 的发生与发展。

关键词: 糖尿病; 糖尿病视网膜病变(DR); 血流动力学; 内皮细胞; 周细胞; 彩色多普勒超声(CDI)

中图分类号: R587.2 R774.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)03-0167-04

Relationship between hemodynamic changes of retina and morphology of retinal vessel in diabetic rats

HU Jin-fang^{1,2}, LIU Zhao-feng², LIU Jing^{1,2}, SHEN Xiu-ping¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To monitor the development process in diabetic retinopathy (DR) by color Doppler imaging (CDI), retinal vessel digest preparations, and histopathology, and to investigate the relationship between the hemodynamic changes of retina and retinal vessel morphology in diabetic rats. **Methods** Diabetic rats were induced by ip administration of Streptozotocin. The hemodynamic changes of central retina artery (CRA) of the right eyes of rats in the model group and control group were detected with CDI in diabetic duration of 2, 4, and 6 months, respectively. The right eyes of rats were dissected to make retinal vessel digest preparations to calculate endotheliocyte/perithelial cell ratio, the left eyes of rats were dissected for histopathology tests. **Results** There was significant difference of CRA hemodynamics between diabetic and normal rats in diabetic duration of two months. In contrast, the loss of pericapillary cells and hyperplasia endothelial as the only early changes of DR were demonstrated in 4 and 6 months diabetic rats in retinal digest preparations. Under the light microscope, the neovascularization, haemorrhage, and effusion in retina interior were observed at this time. **Conclusion** The results show that the retinal hemodynamics could display abnormal changes and become more serious with the progress of the disease, and suggest that the reduction of retinal blood flow and blood dabbling be important causes of DR in the early stage of diabetes. In the early stage of diabetes, corresponding treatment should be taken before the onset of DR to improve blood supply of the retina, which may postpone or reverse the incidence and development of DR.

Key words: diabetes; diabetic retinopathy (DR); hemodynamics; endotheliocyte; perithelial cell; color Doppler imaging (CDI)

近年来我国人口的糖尿病患病率在逐年增加, 糖尿病性视网膜病变(DR)是糖尿病最常见、最严重且治疗最棘手的眼部并发症, 是致盲的最常见原

因之一, 病程越长致盲机率越高^[1-2]。目前国内缺乏完善的评价 DR 的体系, 彩色多普勒超声(CDI)具有敏感、无创伤、可重复、实时检测血管等优点,

收稿日期: 2011-02-23

作者简介: 胡金芳(1980—), 女, 助理研究员, 主要从事药理、毒理学研究。Tel: (022) 23006905 E-mail: hujf@tjipr.com

是评价眼部血流的重要方法,而眼部血流动力学的改变是 DR 发生的重要原因,但该方法一般只用于临床诊断中,实验室诊断 DR 的金指标是视网膜血管消化铺片技术和组织病理学检查。视网膜血管消化铺片和组织病理学检查出异常改变时,已经是 DR 的中、晚期阶段,此时介入治疗很难逆转,本课题组把临床诊断和实验室指标有机地结合起来,旨在通过 CDI 检查和视网膜血管消化铺片发现 DR 发生发展的过程,研究糖尿病大鼠视网膜血流动力学与视网膜血管形态学的关系。

1 材料

1.1 试剂

链脲佐菌素(批号 B69776, Merck 公司),保存于 -20°C 。

1.2 动物

SD 大鼠(SPF 级),雄性,体质量 $180\sim 200\text{ g}$,北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证:SCXK(京)2002-0003。饲养在有中央空调的观察室(津实设施准第 012 号,符合屏障级标准)中,大鼠饲料由天津市华荣实验动物科技有限公司提供,饮纯净水。

1.3 仪器

Sequoia512 型彩色多普勒超声仪(西门子公司产品);LEICA DM LB2 普通光学显微镜(德国莱卡)。

2 方法

2.1 糖尿病大鼠模型

雄性 SD 大鼠 80 只,观察室饲养 3 d,将大鼠随机分为模型组 50 只和对照组 30 只,造模前禁食 24 h 并称质量,ip 链脲佐菌素(STZ) 60 mg/kg (临用时溶于 0.1 mmol/L 、 $\text{pH } 4.5$ 柠檬酸缓冲液中,保持冰浴)。对照组大鼠 ip 等剂量的柠檬酸缓冲液。注射 1 个月后尾静脉取血一滴(禁食 4 h),京都血糖仪测血糖,挑选血糖值稳定在 16.8 mmol/L 以上的大鼠 30 只作为糖尿病大鼠模型。

2.2 实验方法

分别在糖尿病病程 2、4、6 个月对模型组和对照组大鼠进行彩色多普勒检测大鼠右眼中央动脉视网膜血流动力学变化^[3-4],采用 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠。测定每只大鼠右眼视网膜中央动脉(CRA)的血流动力学:包括收缩期峰值流速(Max)、舒张末期流速(Min)、平均流速(MV)、搏动指数(PI)及阻力指数(RI);并摘取右眼球固

定在 4%多聚甲醛溶液中,进行视网膜消化铺片^[5-7],显微镜下计数内皮细胞数(E)和视网膜血管内周细胞数(P),并计算二者比值;摘取左眼球固定于 12%福尔马林液中,做 HE 染色,进行组织病理学检查。

2.3 数据处理

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计学处理采用 SPSS11.5 统计软件,组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 糖尿病大鼠一般状况、体质量及血糖的变化

在试验期间,造模组大鼠由于高血糖,在造模 6 周后眼晶状体开始出现混浊,动物状态明显不佳,消瘦、毛松,体质量下降明显,且多食、多饮、多尿,出现明显的“三多一少”症状。实验期间,模型组大鼠的体质量降低(表 1)、血糖增高(表 2)与对照组比较均有显著性差异。

表 1 糖尿病大鼠体质量的变化 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	体质量/g		
	2 个月	4 个月	6 个月
对照	480.0 ± 45.1	535.3 ± 50.7	577.1 ± 45.6
模型	$219.1\pm 47.3^{***}$	$216.3\pm 33.2^{***}$	$212.0\pm 42.1^{***}$

与对照组比较 $^{***}P<0.001$,下同

$^{***}P<0.001$ vs control group, same as below

表 2 糖尿病大鼠血糖的变化 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	血糖/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	2 个月	4 个月	6 个月
对照	4.6 ± 0.4	4.9 ± 0.3	4.7 ± 0.4
模型	$28.3\pm 4.5^{***}$	$28.3\pm 4.4^{***}$	$29.2\pm 2.5^{***}$

3.2 糖尿病大鼠 CRA 血流动力学的变化

在糖尿病病程 2、4、6 个月,用 CDI 检测大鼠 CRA 的血流动力学,结果显示(表 3)模型组大鼠 CRA 血流流速明显降低,Max、Min、MV 均非常显著低于同期正常对照组,反映视网膜血流灌注和供血严重不足。且随着病程的延长,视网膜血流灌注和供血不足加重。

3.3 糖尿病大鼠眼球视网膜消化铺片 E/P 的变化

结果(表 4)显示,与正常对照组比较,2 个月时视网膜血管消化铺片未见异常变化,4 个月和 6 个月模型组内皮细胞增生明显,周细胞数目明显减少, E/P 比值显著增大。光镜下,对照组视网膜血

表3 糖尿病大鼠 CRA 血流动力学的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Hemodynamic changes of CRA in diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	病程/月	CRA 血流动力学				
		Max/(mm·s ⁻¹)	Min/(mm·s ⁻¹)	MV/(mm·s ⁻¹)	PI	RI
对照	2	25.9±4.5	15.2±4.3	18.6±4.0	0.61±0.26	0.41±0.14
	4	23.6±2.9	14.9±2.2	17.6±2.0	0.50±0.19	0.36±0.10
	6	21.2±3.6	15.2±4.0	17.0±3.0	0.36±0.20	0.28±0.15
模型	2	10.5±1.7***	5.8±2.2***	8.2±1.6***	0.60±0.25	0.45±0.18
	4	8.2±1.0***	4.8±0.7***	6.2±0.6***	0.54±0.19	0.40±0.11
	6	9.8±1.9***	5.4±1.7***	7.6±1.2***	0.58±0.27	0.45±0.18

与对照组比较*** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ test vs control group

表4 糖尿病大鼠视网膜铺片 E/P 的变化 ($n = 10$)

Table 4 Changes of endotheliocyte/perithelial cell ratio of digest preparation in diabetic rats ($n = 10$)

组别	病程/月	E	P	E/P
对照	2	317.20±14.1	182.80±14.1	1.74±0.20
	4	324.40±8.4	175.60±8.4	1.85±0.13
	6	307.20±15.1	192.80±15.1	1.61±0.20
模型	2	338.80±11.7	161.20±11.7	2.10±0.26
	4	427.10±6.3***	72.90±6.3***	5.91±0.62***
	6	434.50±7.9***	65.50±7.9***	6.74±1.00***

与对照组比较*** $P < 0.001$

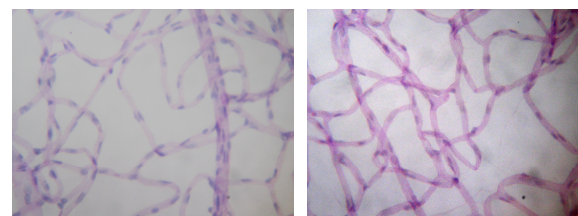
*** $P < 0.001$ vs control group

管由视乳头向周边呈放射状分布, 动静脉之间的毛细血管网分布均匀规则, 周细胞呈圆形或三角形染色深, 内皮细胞核大多呈椭圆形或不规则形, 颜色较浅; 模型组局部出现视网膜毛细血管网排列紊乱, 内皮细胞增生, 周细胞减少, 毛细血管管径粗细不均 (图1)。

3.4 眼球组织病理学检查

晶状体检查: 模型组眼球内均存在不同程度的晶状体纤维变性 (图2), 视网膜检查: 正常对照组视网膜组织学形态基本正常 (图3-A), 模型组视

网膜表面和玻璃体内有液化皮质和小圆形细胞, 并见新生血管形成 (图3-B), 视网膜内小血管瘀血 (图3-C), 且可见新生血管 (图3-D)。

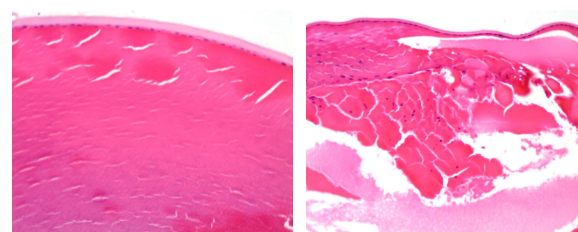


对照组

模型组 (6个月)

图1 视网膜血管消化铺片

Fig. 1 Retina microvessels of digest preparation in rats

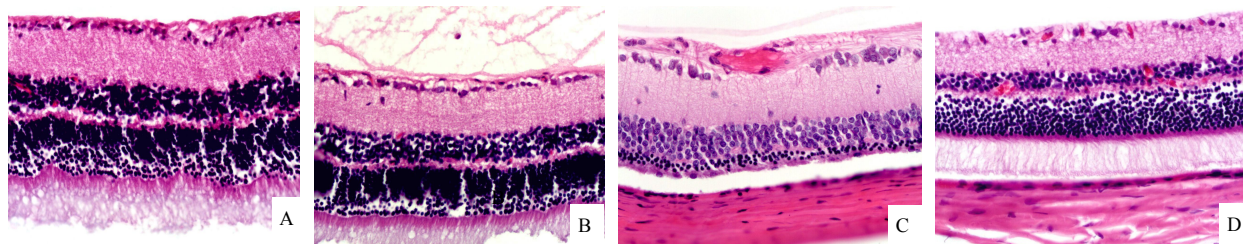


对照组

模型组 (6个月)

图2 大鼠晶状体图片

Fig. 2 Graphs of crystalline lens in rats



对照组

模型组 (液化皮质和小圆形细胞)

模型组 (视网膜内小血管瘀血)

模型组 (新生血管)

图3 大鼠视网膜组织图片

Fig. 3 Graphs of retinal tissue in rats

4 讨论

本研究通过采用彩色多普勒超声检查对糖尿病大鼠 CRA 的血流参数进行测定与分析,并以糖尿病大鼠视网膜血管消化铺片结果作为参照,在糖尿病病程 2 个月时,视网膜血流动力学已经出现异常改变,并呈进行性加重,而视网膜血管消化铺片未见异常变化,4 个月和 6 个月时视网膜血管消化铺片出现内皮细胞增生,周细胞减少,而此时血流流速减慢严重,提示视网膜血流减少、血液灌注不良是 DR 的早期发病原因。在糖尿病早期、DR 发病之前即进行相应的治疗以改善视网膜的血供,可以延缓或逆转 DR 的发生与发展。

DR 是糖尿病微循环障碍引起的眼部并发症,动态检测其血流状态以评价 DR 程度,较传统的检查方法更直接、准确。高血糖是导致糖尿病微血管病变的主要原因^[8],而视网膜病变的进展与微血管血流动力学改变及视网膜缺血缺氧密切相关。CRA 是营养视网膜的终末血管又是维持视觉的重要组织,它的血流动力学改变直接影响视网膜的微循环状态,因此 CRA 的血流检测可以反映 DR 的情况。通过观察糖尿病大鼠 CRA 的血流变化,糖尿病大鼠的血流流变学呈低流速、低灌注和高阻力的病理改变,解释了糖尿病状态下微循环障碍和新生血管的现象。

由于早期 DR 诊断困难,眼部血流动力学改变是 DR 发生的重要原因之一,本研究采用糖尿病大鼠模型为研究对象,可严格控制糖尿病病程,对不

同病程的糖尿病大鼠进行 CRA 血流动力学检查,并行视网膜血管消化铺片,可准确反映 DR 发生发展不同阶段视网膜血流供应的变化,与文献报道^[9]仅单纯依靠血流动力学检查或视网膜血管消化铺片更适合于评价药物。

参考文献

- [1] 陈奇. 中药药效研究思路与方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [2] 孙丽, 孙睦. 中医药治疗糖尿病微血管病变的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(6): 712-714.
- [3] 文艳玲, 王梅, 罗葆明, 等. 早期糖尿病视网膜血流动力学改变的实验研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2004, 20(1): 1-4.
- [4] 陈瑛, 张康兰, 刘兰芬. 糖尿病大鼠视网膜血流动力学的彩色多普勒超声研究 [J]. 实用医学杂志, 2005, 22(6): 522-525.
- [5] 叶小峰, 张勇进, 田洁. 葛根芩连加味汤对糖尿病大鼠视网膜病变的防治作用 [J]. 中国中医眼科杂志, 2006, 16(1): 34-37.
- [6] 潘琳, 周水平, 郭艳茹. 糖尿病大鼠视网膜病变细胞凋亡的观察 [J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(4): 273-276.
- [7] 蔡晓频, 李光伟. 糖尿病视网膜病变发生机制及防治研究进展 [J]. 继续医学教育, 2005, 19(11): 16-18.
- [8] 相莉, 吴谊青, 刘新玲. 络泰治疗糖尿病视网膜病变 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 319.
- [9] 兰海鹰, 穆塔里甫·吾布里斯木, 陈雪艺, 等. 糖尿病患者球后血管血流动力学变化分析 [J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(1): 80-82.

中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的医药专业媒体

根据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知, 中草药杂志社编辑出版的《**中草药**》、Chinese Herbal Medicines (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com E-mail: zcy@tiprpress.com