

基于文献的糖尿病视网膜病变模型应用分析

胡卓瑜^{1,2}, 陈向东¹, 胡齐^{1,2}, 刘志敏¹

引用:胡卓瑜,陈向东,胡齐,等. 基于文献的糖尿病视网膜病变模型应用分析. 国际眼科杂志, 2024,24(12):1900-1907.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.82374525);湖南省眼科疾病(中医)临床医学研究中心(No.2023SK4038);湖南省教育厅科学研究一般项目(No.22C0184);湖南省中医药管理局科研重点项目(No.C2023013);湖南省中医药管理局一般项目(No.B2024048);湖南中医药大学研究生创新课题(No.2023CX09,2024CX025)

作者单位:¹(410007)中国湖南省长沙市,湖南中医药大学第一中医临床学院;²(410208)中国湖南省长沙市,湖南中医药大学
作者简介:胡卓瑜,女,在读博士研究生,主治医师,研究方向:中医防治眼底病。

通讯作者:陈向东,男,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中西医结合眼底病. 564259166@qq.com

收稿日期:2024-05-05 修回日期:2024-11-01

摘要

目的:分析糖尿病视网膜病变模型的造模特点及验证指标,分析现在动物实验造模的不足之处,为建立糖尿病视网膜病变模型规范化提供参考依据。

方法:通过知网、万方、维普、PubMed等数据库检索与糖尿病视网膜病变动物实验相关的文献,归纳实验动物种类、等级、性别、年龄、造模方法、造模周期、验证指标、其他指标,并进行总结与分析。

结果:纳入符合标准的275篇文献,糖尿病视网膜病变动物模型以SD大鼠、Wistar大鼠为主;实验动物性别以雄性为主,动物品种多为SPF级;使用的动物年龄大部分在6-8周龄;造模以建立1型糖尿病模型为基础者,主要以STZ作为诱导型模型;而2型糖尿病模型以采用高脂高糖饮食联合STZ为主。成模标准主要通过检测视网膜形态结构、视网膜血管情况、视网膜功能及视网膜细胞凋亡情况以验证;另外,通过检测视网膜组织中血管异常增生情况、氧化应激指标、炎症因子水平等方面,以及房水、玻璃体、血清中血管异常增生情况和炎症因子水平以评估模型。

结论:糖尿病视网膜病变动物模型虽已成为热点,但现有综述不全面,此次通过文献整理对动物模型的要素进行总结分析,总结其特点及局限性,为模型的建立提供方法学的参考,以期后续中医药的临床与基础研究打下稳固基础。

关键词:糖尿病视网膜病变;动物模型;模型评价

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.12.07

Bibliometrics analysis of the application of diabetic retinopathy model

Hu Zhuoyu^{1,2}, Chen Xiangdong¹, Hu Qi^{1,2}, Liu Zhimin¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 82374525); Hunan Provincial Clinical Medical Research Center of Ophthalmic Diseases (Traditional Chinese Medicine) (No. 2023SK4038); Hunan Provincial Department of Education Scientific Research General Project (No. 22C0184); Hunan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Scientific Research Key Project (No.C2023013); Hunan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Administration of Hunan Province (No.B2024048); Hunan University of Traditional Chinese Medicine (No.2023CX09, 2024CX025)

¹The First Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China; ²Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China

Correspondence to:Chen Xiangdong. The First Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. 564259166@qq.com

Received:2024-05-05 Accepted:2024-11-01

Abstract

• **AIM:** To analyze the modeling characteristics and validation indexes of diabetic retinopathy model, analyze the shortcomings of the present animal experimental modeling, and provide a reference basis for the establishment of the standardization of the diabetic retinopathy model.

• **METHODS:** Literatures related to animal experiments on diabetic retinopathy were searched through the databases of CNKI, Wanfang, VIP and PubMed, and the experimental animal species, grade, gender, age, modeling method, modeling period, validation indexes, and other indexes were summarized and analyzed.

• **RESULTS:** The 275 papers that met the criteria were included. The animal models of diabetic retinopathy were mainly SD rats and Wistar rats, the sex of the experimental animals was mainly male, and the animal breeds were mostly of the SPF class. The age of most of the animals used was in the range of 6-8 weeks old; the modeling was based on those who established the type 1 diabetes model, mainly using STZ as the induction model. While the type 2 diabetes model was based on the high-fat, high-sugar diet combined with STZ. The modeling criteria were verified by detecting retinal

morphology and structure, retinal vascularization, retinal function, and retinal cell apoptosis. In addition, the model was evaluated by detecting abnormal vascular proliferation, oxidative stress indicators, and inflammatory factor levels in retinal tissues, as well as abnormal vascular proliferation and inflammatory factor levels in aqueous humour, vitreous humor, and blood serum.

• **CONCLUSION:** Although the animal model of diabetic retinopathy has become a hotspot, the existing review is not comprehensive. Therefore, we summarized and analyzed the elements of the animal model through literature collation, including its characteristics and limitations, and providing methodological references for the establishment of the model, with a view to laying a solid foundation for the subsequent clinical and basic research of traditional Chinese medicine.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; animal model; model evaluation

Citation: Hu ZY, Chen XD, Hu Q, et al. Bibliometrics analysis of the application of diabetic retinopathy model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(12):1900-1907.

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病患者最常见的进行性眼部微血管并发症,也是中老年人出现中重度视力障碍的主要原因^[1]。随着时间推移,早期 DR 会进展为威胁视力的视网膜病变 (vision-threatening diabetic retinopathy, VTDR),若未得到合适治疗时,视网膜则出现不可逆的损伤,最终导致失明从而降低患者的生活质量^[2-3]。随着 DR 的患病率提高,研究其发病机制和研发具有保护作用的药物成为医学研究的热点。动物模型是研究 DR 具体机制与药物治疗的重要工具,建立良好的 DR 模型对于其诊断及临床防治具有一定的重要性。国内从 2000 年开始使用四氧嘧啶诱导 DR 模型^[4],然而存在造模内容不全面、模型验证时间未明确等局限性,造成 DR 模型难以规范化,因此,需要大量和全面的研究为模型建立提供依据。至今已有较为完善的造模方法,并有相关研究探讨了造模方法的分型及各型的优缺点,但未提及相关的造模要素^[5-6]。故本文对 DR 动物模型的国内动物实验进行统计,从动物种类、年龄、性别等各个维度进行数据化分析,探索 DR 动物模型研究的现状与不足,为 DR 动物模型的建立评估与新药开发提供参考。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 **检索策略** 计算机检索 CNKI、万方、维普、PubMed、Embase 数据库,搜集 DR 动物实验,检索时限为 1997-01-01/2022-12-31,关于记载 DR 模型最早的中文文献始于 1997 年。检索采取主题词和自由词相结合方式。中文检索词包括糖尿病视网膜病变、非增殖性糖尿病视网膜病变、动物模型、动物实验、动物试验、动物模式、动物研究、实验研究、机制研究。英文检索词包括 Diabetic Retinopathy、Diabetic Retinopathies、Retinopathies、Diabetic、Diabetes Mellitus Retinopathy、Diabetic Retinitis、Retinopathia Diabetica、Retinopathy in Diabetes、Retinopathy、Diabetic、

Animal Experimentation、Animal Research、Animal Experiment、Animal Experiments、Animal Model、Animal Models、Laboratory Animal Model、Laboratory Animal Models、Experimental Animal Model、Experimental Animal Models、Animal Physical Conditioning、Animal Studies、Animal Study、Animal Trial、Experiment、Animal、Physical Conditioning、Animal。检索策略可能出现某些数据库文献无法访问,若存在此情况时本研究会通过文献求助获取文献。

1.1.2 **文献筛选标准** 纳入标准:(1)已公开发表的以 DR 为疾病模型的动物实验研究,包括药物或药物成分的疗效及作用机制研究,疾病的发病机制研究,疾病动物模型的研究等;(2)文献语种限定为中文和英文。排除标准:(1)综述、系统评价和 Meta 分析、医家经验、个案报道、理论探讨、述评、临床研究及会议论文等;(2)重复发表的文献;(3)无法获取全文的文献;(4)DR 动物研究相关细胞实验或非 DR 疾病模型。

1.2 方法

1.2.1 **文献筛选** 由 2 名研究者按照标准筛选文献、提取资料并交叉核对。如有分歧,则通过讨论或与第三方协商解决。文献筛选时首先阅读文献标题,初步排除不相关文献后,进一步阅读摘要和全文,按照纳入标准以确定是否纳入。如有需要,通过邮件、电话联系原始研究作者获取未确定但对本文研究非常重要的信息。

1.2.2 **资料提取** 资料提取内容包括发表时间、文献来源、动物情况、造模方法、造模时间、检测指标。旨在为未来糖尿病动物模型造模提供更为严谨、明确、常规的造模方法。

详细阅读文献,对文献中涉及的发表时间、文献来源、动物情况、造模方法、造模时间、检测指标等逐一输入 Excel 建立数据库,进行归纳及量化分析,并采用 GraphPad Prism 8 进行文献筛选流程图绘制。

2 结果

2.1 **DR 动物模型文献筛选结果及主要研究内容** 通过检索 CNKI、万方、维普、PubMed、Embase 数据库共获得 6 813 篇文献,去除重复文献 3 234 篇,通过阅读题目和摘要剔除综述、临床报道、细胞实验、结题报告 1 093 篇,会议论文 50 篇,与 DR 动物模型无关的文献 2 161 篇,最终筛得 275 篇,进行模型研究的统计(若 1 篇文献中含有多个实验且各实验造模方法不同,则按照实验数量计),共得到 279 个动物实验。文献筛选具体流程及结果见图 1。在 279 个动物实验中,涉及 DR 发病机制 121 个,DR 动物模型构建方法 14 个,中药治疗 DR 86 个,西药治疗 DR 53 个,针灸治疗 DR 2 个,检查在 DR 的应用 3 个。

2.2 **DR 动物模型文献发表时间** 1997-2003 年期间,DR 相关动物实验发文上下浮动,年均发文量在 1 篇左右;2007-2013 年呈上升趋势,至少达到 8 篇;2014-2023 年呈明显增多趋势,在 2018 年与 2022 年呈现两个高峰,表明 DR 的实验研究受到更多业界人士的关注,见图 2。

2.3 **DR 动物模型文献来源** 纳入的 275 篇文献中,根据文献来源分为 4 类。其中,学位论文 129 篇,发文量最多,占比 46.9%,其次为 SCI,占比 27.6%,核心期刊(科技核心、中文核心、CSCD)53 篇,占比 19.3%,普刊 17 篇,占比 6.2%。

2.4 **DR 动物模型文献动物概况** 将 279 个实验动物的类型和品种进行统计,共有小鼠 9 种、大鼠 6 种、豚鼠 1 种和贵州小香猪 1 种,其中使用最多的是 SD 大鼠(160 次,57.3%),其次为 Wistar 大鼠(57 次,20.4%);实验动物性

别以雄性为主(232个,83.2%),雌雄各半(15个,5.4%),未注明(17个,6.1%),雌性(8个,2.9%)和雌雄不限(7个,2.5%);文献中明确的动物品种多为SPF级(105个,37.6%);使用的动物年龄大部分在6-8周龄(105个,37.6%)和9-12周龄(21个,7.5%)。

2.5 DR模型造模方法 将DR造模方法按照诱导模型、转基因模型、自发突变模型进行分类,频次共计288次(含一篇文章有2种及以上造模方法)。在造模方法选择中,有9篇文章采用2种及以上的方法造模。在诱导模型多采用STZ制备糖尿病模型。而2型糖尿病模型以采用高脂高糖饮食联合STZ为主(30次,10.4%),高脂饲料联合

STZ次之(29次,10.1%)。在自发型模型中,db/db小鼠(13次,4.5%)与GK大鼠(8次,2.8%)的使用频次较高。在转基因模型中,以KK-Ay小鼠为主(2次,0.7%),见表1。

2.6 DR模型造模时间 由于DR动物模型种类、造模方法的不同,从而导致出现微血管瘤、渗出、视网膜水肿等指征出现的时间不相同,共计动物实验279个。成模时间最长时间可达8mo(贵州小香猪,高脂高蔗糖饲料+1% ibrolipim),最短不少4wk。除了造模时间不明外,其中占比较大的是9-12wk(79个),其次是4-5wk(50个),次之的是6-8wk(40个),见表2。

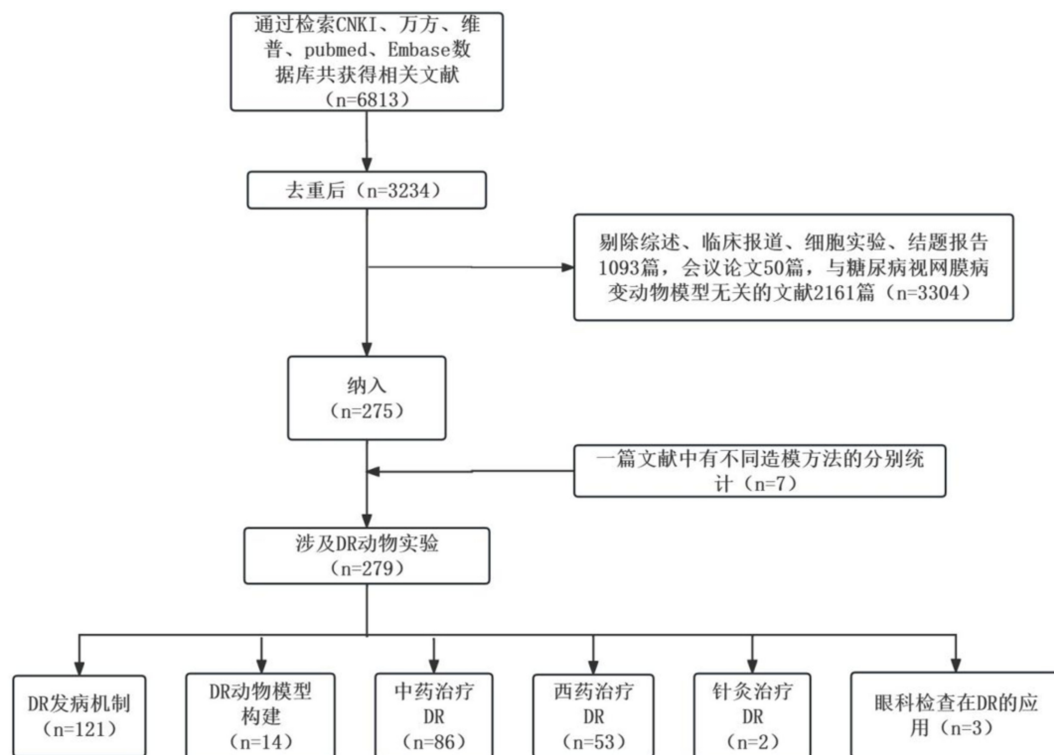


图1 文献筛选流程及结果。

表1 糖尿病视网膜膜病变模型造模方法

模型类型	造模方法	频数(次)	百分比(%)	糖尿病类型
诱导模型	STZ	188	65.3	1型糖尿病
	STZ+高糖高脂饲料+玻璃体腔注入 VEGF	1	0.3	2型糖尿病
	STZ+高糖高脂饲料	30	10.4	2型糖尿病
	STZ+高脂饲料	29	10.1	2型糖尿病
	STZ+玻璃体腔注入 VEGF	3	1.0	1型糖尿病
	四氧嘧啶+50%葡萄糖灌胃	1	0.3	1型糖尿病
	腹腔注射四氧嘧啶	5	1.7	1型糖尿病
	灌胃脂肪乳+腹腔注射四氧嘧啶	1	0.3	2型糖尿病
	高脂高蔗糖饲料+1% ibrolipim	1	0.3	2型糖尿病
	转基因模型	KK-Ay 小鼠	2	0.7
自发模型				
自发型模型	db/db 小鼠	13	4.5	2型糖尿病
	GK 大鼠	8	2.8	2型糖尿病
	OLETF 大鼠	1	0.3	2型糖尿病
	C57BL/Ks J-db/db 小鼠	3	1.0	2型糖尿病
	NOD 小鼠	1	0.3	1型糖尿病
	ZDF 大鼠	1	0.3	2型糖尿病

2.7 DR 模型造模检测指标

2.7.1 造模成功验证指标 将 279 个动物实验中的全部造模成功指标分别从视网膜血管情况、视网膜细胞凋亡、视网膜形态结构及功能进行分类统计。在一篇文献中只要动物实验采用了视网膜血管情况相关检测方法,均记为一次,频次共出现 362 次。视网膜血管情况主要是通过视网膜血管铺片过碘酸-雪夫染色(PAS 染色)(47 次,13.0%),伊文思蓝渗漏实验(28 次,7.7%)及眼底荧光素血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)(24 次,6.6%)等主要方法检测。检测视网膜细胞凋亡主要通过原位末端凋亡法(Tunel)检测(28 次,7.7%)。眼底视网膜形态结构主要通过苏木精伊红染色法(HE 染色)(145 次,40.1%)、透射电镜(40 次,11.0%)、光学相干断层扫描技术(optical coherence tomography, OCT)(10 次,2.8%)等方法检测。检测视网膜功能主要通过焦视网膜电图(mfERG)(15 次,4.1%)实现。可见所检索文献的动物实验主要通过检测视网膜形态结构(58.8%)、视网膜血管情况(29.3%)、视网膜功能(4.1%)及视网膜细胞凋亡情况(7.7%)以验证 DR 模型是否成功,见表 3。

2.7.2 其他指标检测 将 279 个动物实验中的全部检测指标进行分类统计,若同一样本被用于检测不同的指标,如视网膜组织既做病理学观察又做免疫组化,统一归为一类;若同一样本被用于检测多个同类型指标,如血清同时

检测白细胞介素-6(IL-6)和重组与合成蛋白(Nfr2),则把这些指标分成炎症因子指标与氧化应激指标。主要的检测指标分为 5 类,共计 408 次,依次为视网膜组织(362 次,88.7%)、血清(38 次,9.3%)、玻璃体(3 次,0.7%)、外周血(3 次,0.7%)、房水(2 次,0.5%),见表 4。

3 讨论

DR 是糖尿病患者最常见的进行性眼部微血管并发症,是世界范围内不可逆视力损害和失明的主要原因。目前,眼部微血管病变和神经退行性病变并行,内皮细胞功能障碍破坏微血管是 DR 的主要因素,包括白细胞黏附、基底膜增厚和周细胞丢失、血-视网膜屏障受损,炎症与视网膜神经变性在 DR 的早期更为突出,遗传免疫也参与其中^[7-11]。分型不同、发病机制复杂与遗传因素是 DR 研究的难点。DR 模型以微血管破坏与血-视网膜屏障受损为特点,与 DR 的病理特点相同。而动物实验是进行 DR 研究及药物研发的有力工具,因此,深入研究动物实验与寻找与临床症状相似的动物模型是临床诊疗的基石。

据本文统计,DR 动物模型主要采用雄性 SD 大鼠、Wistar 大鼠及 C57BL/6J 小鼠。虽然有大量的物种被用于制作 DR 模型,但体型适中、繁殖快的大鼠是最常被应用的,可以进行最有效的研究^[12]。目前,国内 DR 模型常用的大鼠品系是 SD 大鼠或者 Wistar 大鼠。由于 DR 实验周期长,对动物的生存能力要求高,故多选择 SD 大鼠为研究对象^[13]。雌性动物对 STZ 不敏感,在制备糖尿病动物模型的常采用雄性啮齿类动物^[14]。同时,临床数据显示,男性糖尿病患者患 DR 的风险更高,可能与吸烟、喝酒等

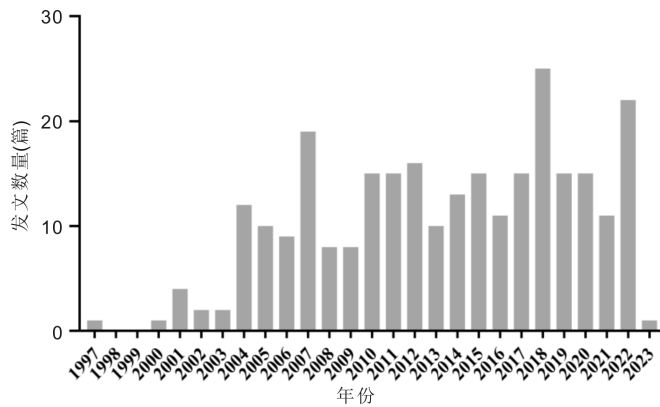


图 2 DR 动物模型发文量时间分布。

表 2 DR 模型造模时间

造模时间	动物实验(个)
未明	69
4-5 wk	50
6-8 wk	40
9-12 wk	79
14-16 wk	17
18-20 wk	13
24 wk-8 mo	11

表 3 造模成功检测技术

造模成功指标分类	检测技术	发文量(篇)	占比(%)	总占比(%)
视网膜血管情况	视网膜血管铺片过碘酸-雪夫染色	47	13.0	29.3
	伊文思蓝渗漏实验	28	7.7	
	FFA	24	6.6	
	罗丹明(RHIC)渗漏检测	2	0.6	
	异硫氰酸荧光素葡萄糖聚糖(FITC-dextran)荧光造影铺片	5	1.4	
眼底视网膜形态结构	HE 染色法	145	40.1	58.8
	透射电镜	40	11.0	
	OCT	10	2.8	
	眼底镜检查	8	2.2	
	眼底照相	8	2.2	
	视网膜光镜形态学观察	2	0.6	
视网膜功能	mfERG	15	4.1	4.1
视网膜细胞凋亡	Tunel 检测	28	7.7	7.7

表4 其他检测指标

样本	检测指标	频数(次)	百分比(%)
视网膜组织	血管异常增生:血管内皮生长因子(VEGF)、色素上皮衍生因子(PEDF)、血管生成素(Ang)、早期生长应答蛋白1(Egr-1)表达量、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)、血管生成素样蛋白4(ANGPTL4)、内皮细胞TEK酪氨酸激酶(Tie2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、组织激肽释放酶(TKLE)、内皮素1(ET-1)、血管性血友病因子(vWF)、血管紧张素II受体2(AGTR2)、轴突导向因子-1(Netrin-1)、富含半胱氨酸蛋白61(CYR61)、血小板反应蛋白-1(TSP-1)、基质细胞衍生因子-1α(SDF-1α)、趋化性细胞因子受体-4(CXCR-4)	117	88.7
	氧化应激指标:血红素氧合酶1(HO-1)、重组与合成蛋白(Nrf2)、谷胱甘肽-S-转移酶Pi(GST-Pi)、抗氧化反应原件(ARE)、醌氧化还原酶-1(NQO-1)、线粒体分裂蛋白(Drp1)、NADPH氧化酶2(Nox2)、NADPH氧化酶4(Nox4)、低氧诱导因子-1α(HIF-1α)、超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧(ROS)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、乳过氧化物酶(LPO)、一氧化氮(NO)、线粒体乙醛脱氢酶(ALDH2)、3-硝基酪氨酸(3-NT)、4-羟基壬烯醛(4-HNE)、一氧化氮合酶(NOS)、8-羟脱氧鸟苷(8-OHdG)、过氧化还原酶6(PRDx6)、解耦联蛋白(UCPs)、线粒体超氧化物歧化酶(MnSOD)、过氧化物酶体增生物激活受体α(PPAR-α)、过氧化物酶体增生物激活受体γ(PPARγ)	45	
	炎症及相关趋化因子:肿瘤坏死因子(TNF-α)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、趋化因子配体5(CCL5)、核因子κB(NF-κB)、高敏C反应蛋白(hs-CRP)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、环氧合酶-2(COX-2)、IL-6、IL-1β、IL-18、高迁移率族蛋白B1(HMGB1)、赖氨酸特异性脱甲基酶(LSD1)、核因子κB抑制蛋白α(IKB-α)、Vav2癌基因(VAV2)、胞浆磷脂酶A2(CPLA-2)、巨噬细胞游走抑制因子(MIF)、TOLL样受体4(TLR4)	76	
	凋亡相关蛋白:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶12(Caspase-12)、内质网应激相关蛋白(CHOP)、胱天蛋白酶3(caspase-3)、胱天蛋白酶1(caspase-1)、凋亡相关因子重组蛋白(FAS)、凋亡相关因子配体(FasL)、胱天蛋白酶8(Caspase8)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、BCL2关联X蛋白(Bax)、凋亡调节蛋白(Survivin)	28	
	自噬相关蛋白:自噬效应蛋白(Beclin-1)、自噬相关蛋白(LC3)、PTEN诱导假定激酶1(PINK1)、泛素连接酶(Parkin)、微管相关蛋白轻链3II(LC3II)、泛素结合蛋白P62(SQSTM1/P62)、转位因子蛋白(TSPO)的表达	3	
	癌症相关因子:细胞周期素依赖蛋白激酶5(Cdk5)、去甲基化酶AlkB同源蛋白(5ALKBH5)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、热休克蛋白(HSP90)、ZESTE同源物增强子2(Ezh2)、热休克蛋白27(HSP-27)	24	
	神经营养因子及受体:碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、视网膜神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、酪氨酸激酶受体B(TrkB)	12	
	连接蛋白:闭合蛋白(Occludin)、封闭蛋白5(Claudin-5)、紧密连接蛋白(ZO-1)、缝隙连接蛋白43(Cx43)	12	
	MAPK信号通路:p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)、磷酸化氨基末端蛋白激酶(p-JNK)、c-Jun氨基端激酶(JNK)、细胞外信号调节激酶(ERK)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶1/2(p-ERK1/2)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、白介素1受体关联激酶1(IRAK1)、泛素连接酶(TrAF6)、蛋白激酶C(PKC)	13	
	TOLL样受体信号通路:TOLL样受体4(TLR4)髓样分化因子(MyD88)表达水平	1	
	PI3k/Akt信号通路:胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)的表达	3	
	Rho/ROCK细胞信号通路:蛋白激酶(ROCK)和磷酸化肌球蛋白轻链(P-MLC)蛋白表达量	1	
	JAK/STAT通路:蛋白酪氨酸激酶(JAK2)、信号转导和转录激活因子5(STAT5)、信号转导和转录活化因子3(STAT3)、糖蛋白130(gp130)	5	
	TGF-β/Smad信号转导通路:转化生长因子β(TGF-β)、Smad同源物2(Smad2)	2	
	Notch1/Hes-1信号通路:跨膜受体蛋白(Notch-1)、SPLIT多毛增强子1(Hes-1)、生长相关蛋白-43(GAP-43)	2	
	神经细胞及神经递质相关因子:神经突蛋白1(NRN1)、神经突触核蛋白-γ(SNCG)、Thy1细胞表面抗原(Thy1)、谷氨酸(Glu)、谷氨酸/天冬氨酸转运蛋白(GLAST)、谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸脱羧酶(GAD)抗体、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)	10	

续表 4 其他检测指标

样本	检测指标	频数(次)	百分比(%)
房水	代谢调节蛋白:晚期糖基化终末产物(AGEs)、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)	8	
	炎症因子:IL-6	1	0.5
玻璃体	血管异常增生:血管内皮生长因子(VEGF)、色素上皮衍生因子(PEDF)、结缔组织生长因子(CTGF)	1	
	血管异常增生:血管内皮生长因子(VEGF)	1	0.7
血清	炎症因子:IL-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF- α)、基质细胞衍生因子-1(SDF-1)	2	
	血管异常增生:血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素 2(Ang-2)	3	9.3
	炎症因子:C 反应蛋白(CRP)、IL-6、IL-1、IL-2、肿瘤坏死因子(TNF- α)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、基质细胞衍生因子-1(SDF-1)	9	
	氧化应激:低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮(NO)、过氧化氢酶(CAT)、乳过氧化物酶(LPO)、一氧化氮(NO)	19	
	血小板参数:血小板黏附率和血小板聚集率、血液血小板分布宽(PDW)、血小板平均体积(MPV)、血小板计数(PLT)和血小板压积(PCT)	4	
外周血	血液流变学(血细胞压积、全血黏度低切、全血黏度高切、血浆黏度、红细胞聚集指数)	2	
	胰岛素样生长因子-1(IGF-1)	1	
	血管异常增生:血管内皮生长因子(VEGF)	2	0.7
	炎症因子:IL-6、肿瘤坏死因子(TNF- α)、一氧化氮(NO)、基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)	1	

危险因素相关^[15-16]。动物的等级、周龄也对动物模型产生一定影响。在纳入研究的文献当中,约一半的文献未注明动物的年龄、等级,部分文献对动物年龄、等级进行严格限制,以纳入 6-8 周龄及 SPF 级别动物为主。动物随着生长发育期的推进出现不同的生理功能,故发育成熟的健康动物是研究实验的首选^[17]。

从本研究结果及文献研究显示,使用高糖高脂饲料联合 STZ 注射(单次注射高剂量或多次注射低剂量)诱导慢性高血糖的啮齿动物模型是研究 2 型糖尿病视网膜并发症的最广泛接受的动物模型^[18-19]。其中,STZ 是诱发糖尿病最常用的药物,主要通过破坏胰岛 β 细胞导致高血糖^[20-21],具有成模率高、操作方便的特点。而 STZ 诱导的糖尿病大鼠,2-4 wk 内出现血-视网膜屏障的损伤^[22],6 wk 左右神经胶质细胞的凋亡增加,同时伴视网膜神经节细胞排列紊乱、细胞数目减少及视网膜变薄^[23],12 wk 时视网膜神经节细胞层可见空泡样变性及部分血管扩张,节细胞减少更为明显。16 wk 后,高糖高脂饲料诱导视网膜组织出现促炎状态,新生血管因子诱导剂水平显著升高,并通过诱导视网膜内皮细胞增殖调节血管生成并增强血管通透性^[24]。STZ 联合高糖高脂饲料形成的 2 型糖尿病模型的血糖能维持在较高水平,可以引起 DR^[25-26]。与遗传模型相比,该模型具有经济高效的特点,与临床上 2 型糖尿病糖脂代谢紊乱、胰岛 β 细胞功能受损、糖耐量异常的特征高度相似。统计显示,DR 模型成模时间主要集中在 9-12 wk,该时间段已经出现视网膜层间水肿,视神经节细胞的明显减少。若造模时间过长,大鼠会出现白内障,导致 FFA、OCT 的操作不便及采图质量的降低。视网膜是眼部感受光刺激的重要部分,因此验证 DR 模型需要

借助眼科相关指标及检测技术。然而不同的文献报道的饲料喂养时间和 STZ 注射剂量之间差异较大,其注射剂量有的高达 60 mg/kg。即使在相同的注射剂量下,成模率和死亡率也明显不同,今后的研究要注重饲料喂养时间和 STZ 注射剂量的比较,深入研究与筛选最佳的造模时间与用药剂量^[27]。

不同的指标检测也各有其特点:

(1)DR 的主要表现为血-视网膜屏障遭到破坏,发生新生血管的病理学变化,因此视网膜血管功能是验证 DR 模型的重要指标^[28]。其中,伊文思蓝渗漏实验能定量观察血-视网膜屏障的破坏程度,对动物的样本量损耗较大。FFA 能动态反映视网膜毛细血管的实时循环情况,对 DR 进行精准诊断和分期^[29-30],由于可以活体操作因此在操作过程中应保持动物处于麻醉状态。PAS 染色能检测视网膜闭塞无细胞毛细血管数量,但这项技术的消化时间不宜掌握,展片难度大,很难制备出理想的视网膜血管铺片^[31]。FFA 是 DR 诊断的金标准,可用于研究微动脉瘤渗漏引起的糖尿病黄斑水肿^[32]。

(2)在视网膜形态结构方面,OCT 可以无创地观察和测量生物组织或标本的纵向内部结构,直观地显示视网膜的层间结构变化,对被操作者的屈光间质清晰度和依从性要求高^[33]。对于周边视网膜裂孔引起的早期局限性视网膜脱离,频域光学相干断层扫描常难以检出。HE 染色能评价视网膜病理组织形态改变情况^[34],缺点是不能提供特定蛋白质或分子的信息。透射电镜能观察大鼠视网膜的超微结构,突显毛细血管的损伤程度^[35]。

(3)视网膜电图是临床上唯一能客观反映视网膜功能的无创检查,但存在敏感性不足的缺点^[36]。有研究发

现,在血管病变前,神经病变以及损伤已经存在,表现为轴突不可逆萎缩、神经胶质细胞活化等^[37-38]。

(4)视网膜细胞凋亡是DR发生组织病理学改变的先导事件,Tunel法可以检测神经节细胞凋亡的情况,但其检测的假阳性率达20%^[39]。

在研究过程中发现以下问题:

(1)在实验研究中,许多文献中未报道以何种糖尿病为基础进行DR造模。本研究整理文献中发现,大部分研究以造模1型糖尿病模型为主,可能与2型糖尿病造模步骤繁琐、造模周期长有关。因此,研究者需秉承严谨的科研态度明确并阐述模型的选择,以便于往后实验研究靶点及通路的选择。

(2)纳入研究中,对于造模成功验证指标检测的时间节点不一致,对于糖尿病模型已造模成功的实验动物而言,出现眼底微血管瘤、渗出、视网膜出血的时间未明确提出。对于未明确DR成模时间的研究中直接用药治疗是否会出现结果偏倚,此处的问题在往后实验中值得考虑。因此,研究者在进行动物造模时应明确提出出现DR眼底改变的节点,以便于明确给药与进行指标检测的时间。

(3)中草药与西药可从多靶点调控治疗DR,如氧化应激、炎症反应、细胞程序性死亡、抑制新生血管等^[40-43]。现阶段已明确了中药复方联合抗新生血管内皮生长因子药物可有效提高黄斑水肿患者矫正视力、降低黄斑中心凹厚度及糖化血红蛋白含量,以改善血液高凝状态的作用^[40]。故诊疗过程中,贯彻中医辨证论治的方法,运用中成药、自拟加减方等多种手段标本兼顾,发挥生物活性成分、多靶点、多通路协同的特点,最终达到治疗疾病的目的。

总的来说,目前国内外对DR动物模型发病机制、造模周期仍需进一步研究,因此,寻找符合DR临床特点及发病过程的动物模型是今后亟需完成的任务。本文通过对DR模型进行统计分析与讨论,旨在为DR模型的建立提供方法学的参考,以其为后续中医药的临床与基础研究打下稳固基础。

参考文献

[1] Tu WJ, Xue Y, Nie D. The prevalence and treatment of diabetes in China from 2013 to 2018. *JAMA*, 2022,327(17):1706.
[2] 刘明珠,管怀进. 糖尿病前期和糖尿病视网膜病变临床前期的视网膜改变. *眼科学报*, 2023,38(6):454-460,489.
[3] 张花治,金智生,刘晖,等. 红芪多糖对糖尿病早期大鼠视网膜Müller细胞的影响. *中国临床药理学杂志*, 2023,39(19):2803-2807.
[4] 蔡春梅,刘丹,王雅贤. 针刺对糖尿病视网膜病变免疫调节机理的研究. *牡丹江医学院学报*, 2000,21(1):6-8.
[5] 葛君玺,谢逸轩,康乐,等. 基于中西医临床病证特点的糖尿病视网膜病变动物模型分析. *中药药理与临床*, 2022,38(6):1-11.
[6] 王娇娇,李苗,史平玲,等. 糖尿病视网膜病变动物模型研究进展. *中国实验动物学报*, 2021,29(5):681-688.
[7] Hammes HP. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia*, 2018,61(1):29-38.
[8] Aschauer J, Pollreis A, Karst S, et al. Longitudinal analysis of microvascular perfusion and neurodegenerative changes in early type 2 diabetic retinal disease. *Br J Ophthalmol*, 2022,106(4):528-533.
[9] Nian S, Lo ACY, Mi YJ, et al. Neurovascular unit in diabetic retinopathy: pathophysiological roles and potential therapeutical targets. *Eye Vis*, 2021,8(1):15.

[10] Wan WC, Long Y, Jin XM, et al. Protective role of microRNA-200a in diabetic retinopathy through downregulation of PDLIM1. *J Inflamm Res*, 2021,14:2411-2424.
[11] 万文萃,龙洋. 糖尿病视网膜病变的流行病学、病因学与发病机制研究现状. *眼科新进展*, 2022,42(9):673-679.
[12] Pitale PM, Gorbatyuk MS. Diabetic retinopathy: from animal models to cellular signaling. *Int J Mol Sci*, 2022,23(3):1487.
[13] 朱晓燕,刘勤,白惠玲,等. 2型糖尿病视网膜病变大鼠模型建立. *实验动物科学*, 2022,39(1):28-33.
[14] 杨燕,陈正涛,肖华胜,等. 糖尿病大血管病变小鼠模型研究进展. *中国实验动物学报*, 2023,31(9):1194-1205.
[15] 赵颖,刘大川. 糖尿病视网膜病变进展的影响因素. *国际眼科杂志*, 2024,24(6):943-949.
[16] Song PG, Yu JY, Chan KY, et al. Prevalence, risk factors and burden of diabetic retinopathy in China: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*, 2018,8(1):010803.
[17] 韩旭华,韩霞,张乃征. 中医科研中实验动物的作用和选择原则. *山西中医学院学报*, 2003,4(2):57-58.
[18] Barrière DA, Noll C, Roussy G, et al. Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. *Sci Rep*, 2018,8(1):424.
[19] Cheng Y, Yu XC, Zhang J, et al. Pancreatic kallikrein protects against diabetic retinopathy in KK Cg - A^J/J and high-fat diet/streptozotocin-induced mouse models of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2019,62(6):1074-1086.
[20] Ammon HPT. Boswellic extracts and 11-keto-β-boswellic acids prevent type 1 and type 2 diabetes mellitus by suppressing the expression of proinflammatory cytokines. *Phytomedicine*, 2019,63:153002.
[21] Samaha MM, Said E, Salem HA. Modulatory role of imatinib mesylate on pancreatic β-cells' secretory functions in an STZ rat model of diabetes mellitus. *Chem Biol Interact*, 2020,328:109197.
[22] Zhang J, Wu Y, Jin Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008,49(2):732-742.
[23] Olivares AM, Althoff K, Chen GF, et al. Animal models of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*, 2017,17(10):93.
[24] Dátilo MN, Sant' Ana MR, Formigari GP, et al. Omega-3 from flaxseed oil protects obese mice against diabetic retinopathy through GPR120 receptor. *Sci Rep*, 2018,8(1):14318.
[25] Poucher SM, Cheetham S, Francis J, et al. Effects of saxagliptin and sitagliptin on glycaemic control and pancreatic β-cell mass in a streptozotocin-induced mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 2012,14(10):918-926.
[26] Gao LH, Niu YF, Liu WP, et al. The antilipolytic action of bis(α-furancarboxylato)oxovanadium(IV) in adipocytes. *Clin Chim Acta*, 2008,388(1-2):89-94.
[27] 王保伟,李颖,刘晓红,等. 高脂饲料喂养时间及链脲佐菌素剂量对实验型2型糖尿病大鼠造模的影响. *卫生研究*, 2011,40(1):99-102,106.
[28] 于乃馨,李国琼,李标,等. 基于网络药理学和分子对接探讨黄芪甲苷治疗糖尿病视网膜病变的作用机制. *中国实验方剂学杂志*, 2022,28(13):209-216.
[29] 陈博文,杨莎,甄耀伦,等. 眼底荧光素钠造影联合眼底光学相干断层扫描技术在糖尿病性视网膜病变中的应用. *中国现代医药杂志*, 2022,24(8):33-36.
[30] 曾少杰,谢怀林,张昀昀. OCTA评估黄斑中心凹无血管区参数对早期糖尿病视网膜病变的诊断价值. *国际眼科杂志*, 2024,24(9):1471-1475.
[31] 何洁,韩静,郝改梅,等. 糖尿病大鼠视网膜血管消化铺片技术的改进及技巧探讨. *中国中医眼科杂志*, 2015,25(1):1-5.

- [32] Al-khersan H, Russell JF, Lazzarini TA, et al. Comparison between graders in detection of diabetic neovascularization with swept source optical coherence tomography angiography and fluorescein angiography. *Am J Ophthalmol*, 2021,224:292-300.
- [33] 吴丹萍, 王雪, 廖宇洁, 等. 早期糖尿病视网膜病变患者黄斑神经节细胞层厚度及视盘参数的变化. *国际眼科杂志*, 2023,23(7):1168-1172.
- [34] Hu YX, Xu Q, Li HX, et al. Dapagliflozin reduces apoptosis of diabetic retina and human retinal microvascular endothelial cells through ERK1/2/cPLA2/AA/ROS pathway independent of hypoglycemic. *Front Pharmacol*, 2022,13:827896.
- [35] 白惠玲, 朱晓燕, 刘勤, 等. 二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠视网膜的保护及其对血清胱抑素 C 的调节作用. *国际眼科杂志*, 2023,23(1):23-31.
- [36] Ba - Ali S, Larsen M, Andersen HU, et al. Full - field and multifocal electroretinogram in non - diabetic controls and diabetics with and without retinopathy. *Acta Ophthalmol*, 2022,100(8):e1719-e1728.
- [37] McAnany JJ, Persidina OS, Park JC. Clinical electroretinography in diabetic retinopathy: a review. *Surv Ophthalmol*, 2022, 67 (3): 712-722.
- [38] Lim HB, Shin YI, Lee MW, et al. Association of myopia with peripapillary retinal nerve fiber layer thickness in diabetic patients without diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61 (10): 30.
- [39] 俞睿, 祝美珍, 刘倩菁, 等. 清脑益元汤对脑缺血损伤大鼠缺血侧皮质区神经细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bel-2、Bax 表达的影响. *中国老年学杂志*, 2021,41(4):825-830.
- [40] 丁珂, 张殷建, 牟林, 等. 和营健脾方联合阿柏西普治疗重度糖尿病性黄斑水肿患者的临床疗效观察. *中华中医药杂志*, 2023,38(8):3976-3980.
- [41] 刘芮诚, 孔玲, 孙野, 等. 黄芪干预糖尿病视网膜病变的有效成分及其作用机制研究进展. *中国药房*, 2023,34(11):1404-1408.
- [42] 刘素珍, 杨浩东, 张花治, 等. 信号通路与糖尿病视网膜病变的关系及中医药干预研究进展. *中国实验方剂学杂志*, 2023,29(22):265-275.
- [43] 马仙康, 杨丽霞, 崔阳阳, 等. 中医药调控内质网应激防治糖尿病视网膜病变研究进展. *中国中医药图书情报杂志*, 2024,48(1):261-264.