

高脂联合高糖饲养小鼠糖尿病性角膜病变模型的建立

博文¹, 孙光华², 孙凤侠², 崔文³

作者单位:¹(250022)中国山东省济南市, 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院;²(277100)中国山东省枣庄市妇幼保健院眼科;³(272013)中国山东省济宁市, 济宁医学院
作者简介:博文, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向:角膜病、白内障、青光眼。

通讯作者:崔文, 毕业于泰山医学院, 医学博士, 教授, 山东省病理学与病理生理学重点学科副主任, 病理学教研室副主任, 研究方向:病理学. cuiwenmd@163.com

收稿日期:2014-12-21 修回日期:2015-03-23

Model of diabetic keratopathy with high-fat and high-glucose feeding mice

Wen Bo¹, Guang-Hua Sun², Feng-Xia Sun², Wen Cui³

¹School of Medicine and Life Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, University of Jinan, Jinan 250022, Shandong Province, China; ²Department of Ophthalmology, Maternal and Child Health Care of Zaozhuang, Zaozhuang 277100, Shandong Province, China; ³Jining Medical University, Jining 272013, Shandong Province, China

Correspondence to: Wen Cui. Jining Medical University, Jining 272013, Shandong Province, China. cuiwenmd@163.com

Received:2014-12-21 Accepted:2015-03-23

Abstract

• AIM: To discuss the establishment of immediate diabetic keratopathy animal model of C57BL/6 mouse induced by a high-fat and high-glucose diet.

• METHODS: Diabetes mellitus was induced by a high-fat and high-glucose diet in C57BL/6 mouse. 1% rose bengal was stained on the cornea to examine the integrality of the corneal epithelium at 2 ~ 12mo after completion of the model. Corneal epithelial wound healing was observed using a *vivo* epithelial debridement model which was dyed by sodium fluorescein. Corneal morphology histology was examined by pathological methods.

• RESULTS: The high-fat and high-glucose diet C57BL/6 mouse in 2mo had showed general symptoms of diabetes: polydipsia, polyphagia, polyuria, weight loss etc. The model had a steady-state high glucose ($\geq 18\text{mmol/L}$), also the weight was lower compared with normal control mouse. 1% rose bengal corneal staining had dot coloring at 2mo after completion of the model, the stained area and extent were gradually increased with the extension of the duration of diabetes, almost all the cornea was stained at 12mo after completion of the

model. With the passage of time into a mold, the cornea epithelial healing time become longer: 2mo was about 40h; 3mo was about 120h; 4, 6, 12mo was about 144h; the coloboma were gradually increased at 12mo after completion of the model, then the area was reduced gradually until complete healing, the time was 96 ~ 120h, showed repeating phenomenon.

• CONCLUSION: The mouse were induced by high-fat and high-glucose diet can be used as animal models of diabetic keratopathy: the damage of epithelium for corneal and delay healing on epithelium and other symptoms.

• KEYWORDS: high fat; high glucose; diabetic keratopathy; animals models

Citation: Bo W, Sun GH, Sun FX, et al. Model of diabetic keratopathy with high-fat and high-glucose feeding mice. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(4):596-600

摘要

目的:研究利用高脂联合高糖饲养 C57BL/6 小鼠建立糖尿病小鼠角膜病变模型。

方法:建立利用高脂联合高糖饲养 C57BL/6 小鼠的糖尿病模型,在成模 2 ~ 12mo 分别行 1% 虎红染色检查角膜上皮完整性;角膜上皮刮除后,荧光素钠染色观察比较角膜上皮的愈合速度;病理检测角膜的组织形态和结构的变化。

结果:高脂联合高糖饲养 C57BL/6 小鼠 2mo 左右逐渐表现出糖尿病多饮、多食、多尿、体质量下降等典型症状,其血糖稳定维持在较高水平($\geq 18\text{mmol/L}$),体质量较正常小鼠明显偏低。虎红染色发现,成模 2mo 的小鼠角膜即已出现点状着色,且随着病程的延长,染色面积和程度逐渐加重,到成模 12mo 几乎呈全角膜着色。在上皮愈合速度方面,刮除角膜上皮后,成模 2mo 的小鼠角膜上皮在 40h 即完全愈合(与正常小鼠相似),成模 3mo 小鼠上皮愈合时间为 120h,成模 4,6,12mo 上皮完全愈合的时间为 144h 左右,其中成模 12mo 的小鼠在 96 ~ 120h 上皮缺损的范围再次扩大,后逐渐缩小愈合,呈现反复现象。

结论:高脂联合高糖饲养诱导的糖尿病小鼠角膜,表现出角膜上皮损害,角膜上皮损伤后延迟愈合等症状,说明其可以作为研究糖尿病角膜病变的动物模型。

关键词:高脂;高糖;糖尿病角膜病变;动物模型

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.4.07

引用:博文,孙光华,孙凤侠,等.高脂联合高糖饲养小鼠糖尿病性角膜病变模型的建立.国际眼科杂志 2015;15(4):596-600

0 引言

据不完全统计资料表明,目前全世界范围内的糖尿病患者约有 2.5 亿,由于糖尿病引起的并发症可以累及全身各个系统和器官,糖尿病眼病是其一个主要并发症,其发病率更是高达 50%^[1]。糖尿病性角膜病变(diabetic keratopathy)最早于 1981 年 Schultz 教授等^[2]提出,其主要临床表现为:浅层点状角膜炎,反复性角膜上皮剥脱糜烂,持续性的上皮缺损^[3,4],上皮再生愈合速度延迟,无菌性角膜浅层溃疡^[5],角膜大泡形成,泪液分泌减少,角膜知觉减退^[6,7]等。近 10a 来,由于玻璃体切割手术和白内障超声乳化手术的开展,术后糖尿病性角膜病变的并发症被越来越多的临床医生重视,但是对其发生的病理机制尚不明确,如能建立一个有效的糖尿病性角膜病变动物模型,并在此模型基础上进行相关的后续研究具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6 小鼠 100 只,雄性,2~4 周龄,体质量 15~20g,购买自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验小鼠于枣庄市妇幼保健院中心实验室动物房饲养,明暗周期 12h(6:00am~6:00pm),饲养间温度保持在 25℃左右,湿度在 50%左右,小鼠均可以自由的饮水和饮食,且均符合视觉与眼科学研究会(ARVO, resolution on the use of animals in Research)制定的科研动物使用规范。

1.1.2 主要试剂及仪器 1%的虎红(枣庄市妇幼保健院中心实验室自配);荧光素钠眼科检测试纸(天津晶明新技术开发有限公司);裂隙灯显微镜(附带照相系统;日本 TOPCON 公司);眼前节 OCT(美国 OPTOVUE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病动物模型的制备 按 AIN-76^{TM[8]}和 Luo 等^[9]配方制成高脂联合高糖和普通饲料,见表 1。把实验小鼠随机分为两组,每组各 50 只:A 组普通饲料为对照组,B 组高脂联合高糖饲料为实验组。

1.2.2 C57BL/6 小鼠体质量和血糖的观察 每 2wk 分别称量小鼠的体质量和采取尾静脉切开取血快速测量小鼠的血糖值(葡萄糖氧化酶法),并记录,比较两组小鼠的体质量和血糖变化情况。

1.2.3 1%虎红染色角膜上皮损害检测 对高脂联合高糖饲料实验组诱导成糖尿病模型的 C57BL/6 小鼠和普通饲料对照组的 C57BL/6 小鼠,取成模 2,3,4,6,12mo 的小鼠,用玻璃棒蘸取 1%虎红点到小鼠的角膜上,并在带有照相系统的裂隙灯显微镜下观察虎红的着色情况以及比较两组的着色情况差异,并照相保存。

1.2.4 角膜上皮刮除愈合速度检测 对高脂联合高糖饲料实验组诱导成糖尿病模型的 C57BL/6 小鼠和普通饲料对照组的 C57BL/6 小鼠,在其成模 2,3,4,6,12mo 的时候各取 10 只小鼠;给予盐酸氯胺酮和氯丙嗪混合麻醉剂腹腔注射,待小鼠麻醉后在角膜上点一滴盐酸丙美卡因滴眼液,用显微平镊轻轻夹持眼球,2mm 环钻轻压角膜使其出现压痕;角膜去上皮刀沿着压痕刮除小鼠整个角膜上皮;将刮除上皮的小鼠角膜用荧光素钠检测试纸染色,裂隙灯显微镜钴蓝光观察上皮缺损范围,并照相保存;将上述小鼠各取一只采取颈椎脱臼法处死,钝性分离眼球入甲醛固定液固定 24~48h,同时取其胰腺和肾脏用甲

表 1 饲料配方

成分	普通饲料	高脂饲料
玉米油	4.5	35.5
酪蛋白	23	20
玉米淀粉	31.9	34.4
蔗糖	30.3	0
纤维素	5.3	5
混合维生素	1.2	1.2
混合无机盐	3.7	3.8
能量(kJ/100g)	1594.4	2247.2

醛固定液固定;其余照完相的小鼠角膜氧氟沙星眼膏涂眼;照相的时间为 24h 的间隔,直至角膜上皮全部愈合,取眼球的时间为 0,1,2,3,5,7d(直至角膜愈合的时间),每次照完相均给予氧氟沙星眼膏涂眼。

1.2.5 组织病理学检测 将上述标本放入自动脱水机行梯度酒精脱水并石蜡包埋,自角膜缘开始连续切片,组织切片厚度为 4 μ m,取组织切片于烤箱中烤片 50min;将切片置于 65℃烤箱脱蜡液 I,II 中脱蜡各 15min,室温下脱蜡液 III 脱蜡 15min,无水乙醇,95%乙醇,75%乙醇各 30s,自来水浸洗数秒,苏木素染液中 10min,自来水浸润洗涤数秒两次,1%伊红染液中 5min,自来水浸洗数秒一次,75%乙醇,95%乙醇和无水乙醇各脱水 5s,空气干燥,中性树脂胶封固,光学显微镜下观察照相。

1.2.6 前节 OCT 角膜厚度的检测 取高脂联合高糖饲料实验组小鼠和对照组小鼠,在成模 2,3,4,6,12mo 时各取 5 只,暴露小鼠眼球,取角膜中央位置照相,用前节 OCT 系统自带分析软件自角膜上皮至角膜内皮测量中央角膜厚度,比较两组小鼠角膜厚度的区别。

统计学分析:采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析。实验测量指标的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,高脂联合高糖饲料实验组小鼠和正常对照组小鼠中央角膜厚度之间的差异比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验成模率以及一般项目的观察 高脂联合高糖饲养至 8wk 其血糖大于 16.7mmol/L 的造模成功率为 78%,在实验的过程中实验组有 12 只死亡,正常对照组仅死亡 1 只。成模的 C57BL/6 小鼠逐渐表现为多饮,多食,多尿,毛发的光泽度下降,颜色偏黄,消瘦,活动度降低,反应迟钝,抓持时排便反应明显以及抵抗力减弱,尤其随着成模时间的推移上述的表现越来越明显,饲养间出现糖尿病酮症酸中毒特有的烂苹果气味,且在 6mo 后尾静脉取血测血糖的伤口出现溃烂。

2.2 小鼠体质量 高脂联合高糖诱导成糖尿病模型的 C57BL/6 小鼠在 2mo 时较饲养前的体质量普遍增长,自 2mo 后其体质量则普遍下降,其体质量下降的趋势一直持续到 12mo;然而普通饲料对照组的 C57BL/6 小鼠与同时期的实验组 C57BL/6 小鼠相比其体质量表现为增长趋势一直持续到 4mo,在 4~12mo 体质量表现为明显的下降趋势,但是下降趋势较实验组不明显,详见图 1。

2.3 小鼠血糖 高脂联合高糖诱导成糖尿病模型的 C57BL/6 小鼠采用尾静脉采血快速测血糖,2mo 时的平均血糖水平 21 ± 1.1 mmol/L,至 4mo 以后的血糖水平一

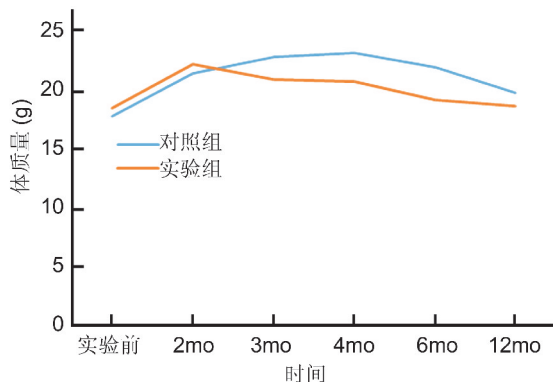


图1 高脂高糖实验组和对照组小鼠在不同时间体重曲线图。

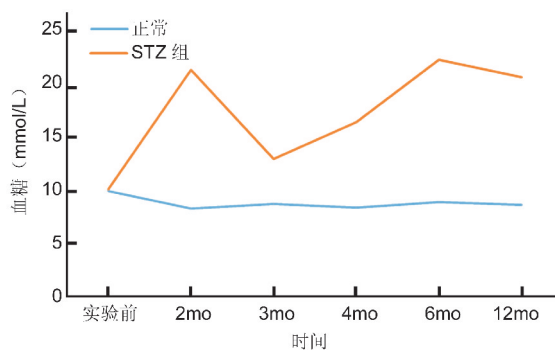


图2 高脂高糖实验组和对照组小鼠在不同时间血糖曲线图。

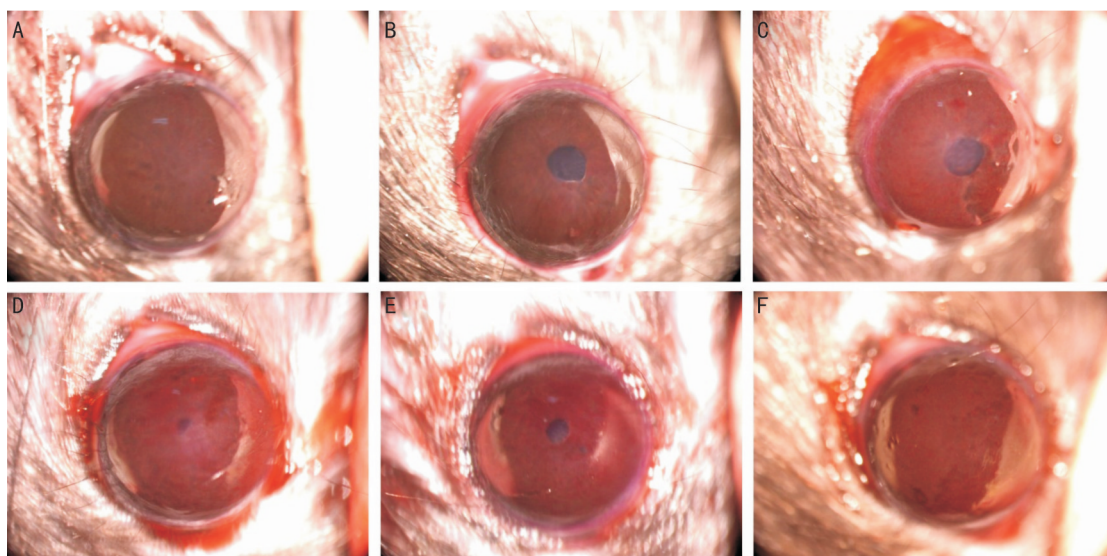


图3 高脂高糖实验组小鼠角膜不同时间点虎红染色 A:正常角膜几乎无虎红染色;B:高脂高糖2mo示轻微角膜着色;C:高脂高糖3mo示部分角膜虎红着色;D:高脂高糖4mo显示其着色较3mo明显较重;E:高脂高糖6mo示大部分角膜着色;F:高脂高糖12mo示几乎全角膜虎红染色。

直维持在 $16 \pm 1.4 \text{ mmol/L}$ 以上的稳定水平,但是在成模3mo时血糖的平均水平仅在 $13.1 \pm 0.9 \text{ mmol/L}$,并且其血糖的波动水平较大;6~12mo的小鼠保持较高的血糖值,平均在 $20 \pm 2.1 \text{ mmol/L}$,并且血糖的波动水平趋于稳定。同时较多的小鼠在测血糖时其血糖值在血糖仪上经常出现“HI”的爆表现象,尤其表现在6mo以后的血糖监测。正常对照组的C57BL/6小鼠其血糖值与同时期的实验组小鼠相比血糖值最高值为 $12.4 \pm 0.7 \text{ mmol/L}$,并且血糖平均水平在 $8.5 \pm 0.6 \text{ mmol/L}$,且血糖从实验前到12mo期间波动水平很小,详见图2。

2.4 1%虎红染色 采用1%虎红对两组小鼠角膜进行染色,高脂联合高糖小鼠在2mo时其角膜仅有轻微的虎红着色,而在3mo的时候角膜着色较2mo时范围明显扩大且着色比较重,在4mo时虎红的着色深度和范围较之前出现一个非常明显的变化,到12mo时虎红染色几乎布满整个角膜。正常对照组C57BL/6小鼠角膜虎红染色从实验前到8mo都仅表现为轻微的着色,到第10mo时才表现为弥漫性点状相对较重的着色,详见图3。

2.5 角膜上皮刮除愈合速度 高脂联合高糖组2mo的小鼠刮除上皮后上皮愈合时间为40h左右,继续观察没有发现角膜上皮的二次剥脱现象,同时期对照组角膜上皮在48h完全愈合;实验组3mo的小鼠刮除上皮后其上皮的愈

合时间在120h;实验组4,6mo上皮完全愈合时间为144h;实验组12mo上皮愈合时间也为144h,但在96~120h之间上皮缺损的范围再次扩大,在120~144h上皮缺损范围再次变小直至愈合,继续观察未发现上皮有剥脱的现象;然而对于与同时期对照小鼠各时期角膜上皮愈合时间一般在48h左右,无角膜上皮再次剥脱的现象;两组未刮除角膜上皮小鼠在裂隙灯下观察角膜上皮都未发现自然剥脱的现象,详见图4,5。

2.6 组织病理学检查 对照小鼠和实验组2mo的小鼠未刮除角膜上皮的角膜各层结构排列整齐,结构清楚,角膜上皮有5~6层细胞组成,上皮细胞的细胞质饱满着色均匀,细胞核呈圆形,基质层排列紧密,上皮从基底细胞、棘细胞到变平上皮细胞层次非常清楚;实验组3mo的HE染色表现为角膜少量炎性细胞的浸润,上皮细胞排列规整,基质层排列紧密;实验组3,4,6,12mo的角膜上皮细胞排列疏松,细胞肿胀,出现水肿变性,细胞间隙增宽,细胞量较正常的减少,角膜全层的水肿,部分炎性细胞的浸润,基质层水肿,同时基质层粘多糖增多,胶原纤维增多增粗,排列不规则疏松化。实验组2~12mo的小鼠在刮除角膜上皮后24,48,72h及愈合时的角膜表现为角膜基质层的疏松水肿,大量的炎性细胞的浸润,新生长的上皮细胞不规则,排列混乱,细胞间隙较大,详见图6,7。

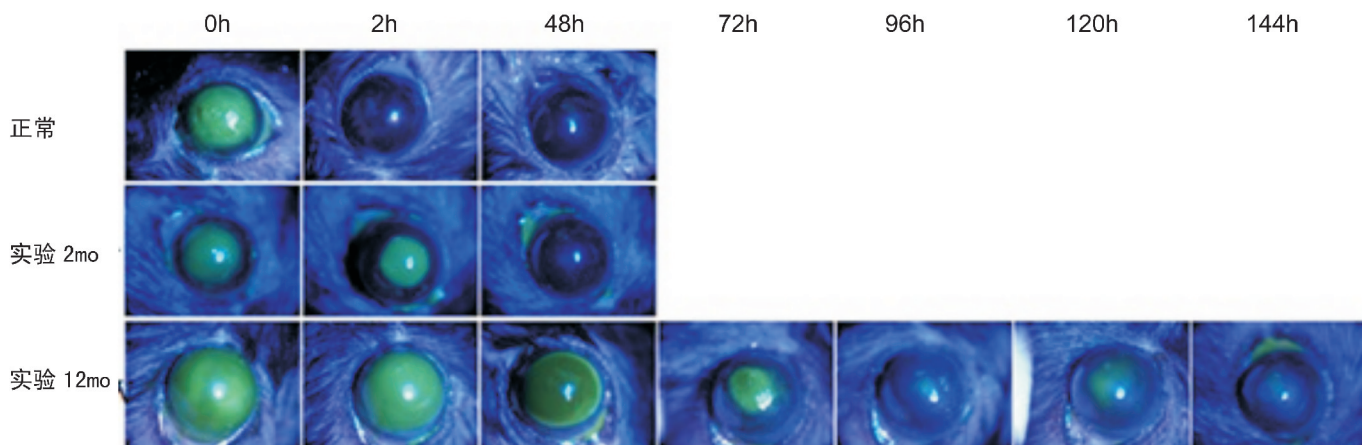


图4 高脂高糖实验组和对照组小鼠角膜上皮愈合对比。

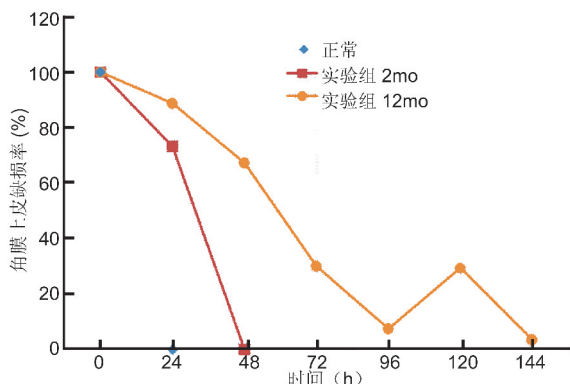


图5 高脂高糖实验组和对照组小鼠角膜上皮愈合时间曲线。

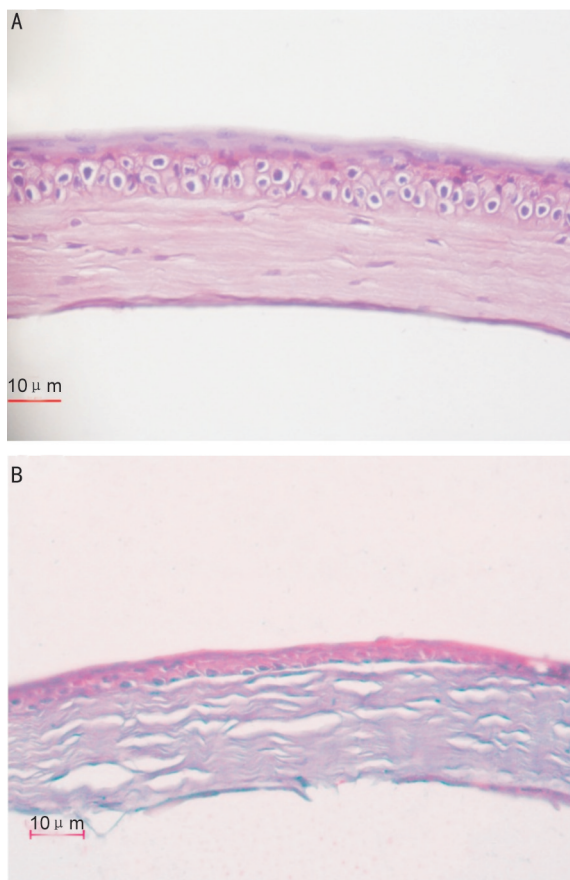


图6 高脂高糖实验组和对照组小鼠角膜 HE 切片 A: 正常角膜组织; B: 实验组 12mo 角膜可见上皮细胞层数减少, 炎细胞浸润, 细胞水肿变性, 基质层水肿, 排列疏松化。

2.7 前节 OCT 检查中央角膜厚度 高脂高糖实验组 2mo 的平均中央角膜厚度为 $111.5 \pm 10.4 \mu\text{m}$, 3mo 的厚度为 $106.8 \pm 12.7 \mu\text{m}$, 4mo 的厚度为 $108.6 \pm 8.9 \mu\text{m}$, 6mo 的厚度为 $113.4 \pm 10.3 \mu\text{m}$, 12mo 的厚度为 $94.6 \pm 11.1 \mu\text{m}$; 对照组的平均中央角膜厚度分别为 103.5 ± 8.4 , 96.3 ± 8.2 , 94.6 ± 11.1 , 98.1 ± 5.9 , $102.3 \pm 9.9 \mu\text{m}$, 两组平均中央角膜厚度比较差异没有统计学意义。

3 讨论

目前国内外对糖尿病动物模型的建立多采用链脲佐菌素 (Streptozocin, STZ) 诱导, 对于 STZ 大剂量 ($\geq 50\text{mg/kg}$) 诱导主要表现类似人类的 1 型糖尿病, 而采用 STZ 小剂量 ($25 \sim 50\text{mg/kg}$) 注射联合高糖高脂饮食诱导为 2 型糖尿病。国外有采用先天基因缺陷鼠如: db/db 小鼠、ob/ob 小鼠、Akita 小鼠以及 KK-Ay 小鼠等作为糖尿病动物模型进行研究, 在我国由于这些小鼠来源相当的困难且价格十分的昂贵同时由于其自身的遗传因素在其发病的过程中起到主导作用, 与临床表现存在一定的差异, 不利于实验研究。我们参照美国糖尿病并发症动物模型协会 (animal models of diabetes complications consortium, AMDCC; <http://www.amdcc.org>) 的方法并加以改良, 制作了本实验的 C57BL/6 小鼠糖尿病动物模型, 该模型具有以下特点: (1) 具有糖尿病的一般体征; (2) 高血糖; (3) 角膜的改变: 泪液缺乏, 角膜上皮缺损愈合速度慢, 角膜上皮细胞水肿变性, 排列疏松, 角膜上皮角质化等改变。

有研究表明^[10], STZ 腹腔注射诱导糖尿病小鼠模型其血糖值的变化与 STZ 注射的剂量存在依赖的关系, STZ 的剂量 $\leq 35\text{mg/kg}$ 时, STZ 仅对胰岛 β 细胞有很轻微的损伤作用, 血糖值没有明显的变化, 只有胰腺损伤超过 40% 时才会表现出高血糖症状; STZ 剂量 $\geq 45\text{mg/kg}$ 时, 空腹血糖水平从注射后 1 ~ 16wk 有逐渐升高的趋势。但是同样剂量的 STZ 腹腔注射, C57BL/6 小鼠表现出不同程度的高血糖症状, 这可能与不同个体抗 STZ 损伤的能力有关, 这也说明遗传背景在糖尿病动物模型的制备过程中起着重要作用, 因此在造模的动物选择上尽量选择遗传背景一致的小鼠, 以达到获得较高且相似的造模成功率。本实验采用高脂联合高糖饲料饲养来诱导糖尿病成模率为 78%, 明显高于 AMDCC 报道 50% 的成模率, 但是小于 Greg 等报道的 90% 的成模率, 且在实验的过程中能维持一个稳定的高血糖水平^[11]。

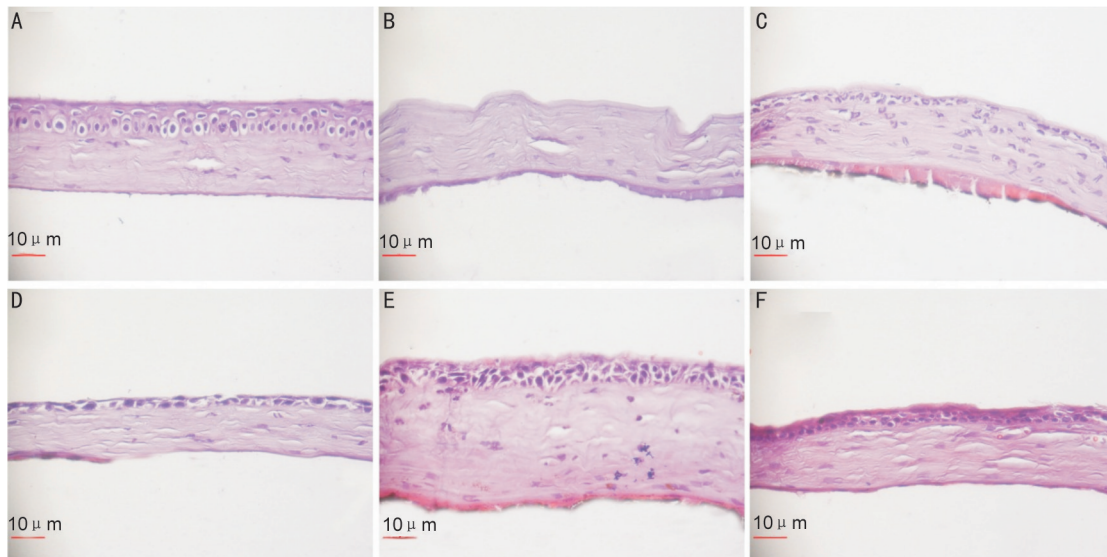


图7 高脂高糖实验组小鼠角膜 HE 切片 A:未刮除角膜上皮;B:刮除上皮后 24h;C:刮除上皮后 48h;D:刮除上皮后 72h;E:刮除上皮后 96h;F:刮除上皮后 120h。

影响糖尿病患者角膜上皮损伤延迟愈合的因素有很多,主要集中于角膜上皮基底膜的改变^[12,13]。角膜上皮基底膜的改变主要表现为基底膜的变厚、变性^[14],以及蛋白成分的非酶糖基化作用的加强^[15]和糖基化终产物(AGE)在基底膜上的沉积^[16],Chikama等^[12]用激光共聚焦显微镜检查2型糖尿病患者角膜发现基底膜的反光较非糖尿病患者基底膜反光明显增高。目前对糖尿病患者角膜上皮损伤延迟愈合的分子机制认为表皮生长因子受体(EGFR)信号传导通路起着关键的作用^[17-19],EGFR被配体激活后启动角膜上皮细胞内信号的传导,指导角膜上皮细胞的迁移、黏附、增殖、分化、凋亡。在使用西妥昔单抗(Cetuximab,一种特异性针对EGFR的抑制剂)治疗癌症的患者中有相当一部分的患者眼表出现异常包括:弥漫性的点状角膜缺损、角膜糜烂以及溃疡性角膜炎等^[20]。高血糖可减弱EGFR信号对角膜上皮损伤的应答以及同时抑制PI3-kinase/Akt(磷酸酰肌醇3位羟基激酶)通路的应答,造成糖尿病角膜上皮损伤的延迟愈合。角膜上皮细胞间的连接(尤其是紧密连接)是维持角膜上皮完整性的另一重要因素。研究发现,部分严重的糖尿病患者角膜上皮出现点状角膜缺损时由于上皮细胞的连接疏松造成^[21]。

本实验研究表明,高脂联合高糖饲料饲养来诱导的糖尿病小鼠角膜,表现出角膜上皮损伤,角膜上皮损伤后延迟愈合等症状,说明其可以作为研究糖尿病角膜病变的动物模型。

参考文献

- 1 McLaughlin PJ, Sassani JW, Klocek MS, et al. Diabetic keratopathy and treatment by modulation of the opioid growth factor (OGF)-OGF receptor (OGFr) axis with naltrexone; a review. *Brain Res Bull* 2010;81(2-3):236-247
- 2 Schultz RO, Van Horn DL, Peters MA, et al. Diabetic keratopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1981;79:180-199
- 3 Fukushi S, Merola LO, Tanaka M, et al. Reepithelialization of denuded corneas in diabetic rats. *Exp Eye Res* 1980;31:611-662
- 4 Foulks GN, Thoft RA, Perry HD, et al. Factors related to corneal epithelial complications after closed vitrectomy in diabetics. *Arch Ophthalmol* 1979;97:1076-1078
- 5 Hyndiuk RA, Kazarian E, Schultz RO, et al. Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 1977;95:2193-2196

- 6 Jeng S, Lee JS, Huang SC. Corneal decompensation after argon laser iridectomy—a delayed complication. *Ophthalmic Surg* 1991;22:565-566
- 7 Sánchez-Thorin JC. The cornea in diabetes mellitus. *Int Ophthalmol Clin* 1998;38(2):19-36
- 8 Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 1997;107(7):1340-1348
- 9 Luo J, Quan J, Tsai J, et al. Non-genetic mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998;47:663-668
- 10 Tanerode G, Rousseau-Mignerot S, Nadeau A. Long-term changes in the diabetic state induced by different doses of streptozotocin in rats. *Br J Exp Path* 1983;64(2):117-123
- 11 Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Curr Diabetes Rev* 2007;12:261-266
- 12 Chikama T, Wakuta M, Liu Y, et al. Deviated mechanism of wound healing in diabetic corneas. *Cornea* 2007;26(9 Suppl 1):S75-81
- 13 Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, et al. Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. *Arch Ophthalmol* 1992;110:537-540
- 14 Kabosova A, Kramerov AA, Aoki AM, et al. Human diabetic corneas preserve wound healing, basement membrane, integrin and MMP-10 differences from normal corneas in organ culture. *Exp Eye Res* 2003;77:211-217
- 15 McDermott AM, Xiao TL, Kern TS, et al. Non-enzymatic glycation in corneas from normal and diabetic donors and its effects on epithelial cell attachment *in vitro*. *Optometry* 2003;74:443-452
- 16 Kaji Y, Usui T, Oshika T, et al. Advanced glycation end products in diabetic corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:362-368
- 17 Yin J, Huang J, Chen C, et al. Corneal complications in streptozocin-induced type I diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6589-6596
- 18 Xu K, Yu FS. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3301-3308
- 19 Xu KP, Li Y, Ljubimov AV, et al. High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing. *Diabetes* 2009;58(5):1077-1085
- 20 Shome D, Trent J, Espandar L, et al. Ulcerative keratitis in gastrointestinal stromal tumor patients treated with perifosine. *Ophthalmology* 2008;115:483-487
- 21 Inoue K, Okugawa K, Amano S, et al. Blinking and superficial punctate keratopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye (Lond)* 2005;19:418-421