

# 非肥胖性糖尿病小鼠干眼模型的初步建立

崔红\*, 李春华\*, 李正日, 李承霖, 金海燕, 任宁, 汝新宇, 李英俊

引用: 崔红, 李春华, 李正日, 等. 非肥胖性糖尿病小鼠干眼模型的初步建立. 国际眼科杂志 2019; 19(8): 1293-1296

基金项目: 国家自然科学基金委员会资助项目 (No.81560167)  
作者单位: (133000) 中国吉林省延吉市, 延边大学附属医院眼科  
注: \* 崔红和李春华对本文贡献一致。  
作者简介: 崔红, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼表疾病; 李春华, 硕士, 主管护师, 护士长, 研究方向: 临床护理。  
通讯作者: 李英俊, 毕业于延边大学医学院, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障、眼表疾病. liyingjun@daum.net  
收稿日期: 2018-11-29 修回日期: 2019-07-16

## 摘要

**目的:** 初步建立非肥胖性糖尿病 (NOD) 小鼠蒸发过强型干眼模型, 通过研究小鼠眼表组织病理变化, 初步探讨其作为糖尿病性干眼模型的可行性。

**方法:** 选取 40 只雌性 NOD 小鼠, NOD 小鼠自发糖尿病为实验组, 同时选取未自发糖尿病的 NOD 小鼠作为正常对照组。实验组 NOD 小鼠置于 40% 以下湿度环境, 每天皮下注射 0.5mg/0.2mL 氢溴酸苄胺, 并置于可控干燥箱中, 每天通风 12h, 制作蒸发过强型干眼模型。在造模后的第 1、7、10、14d 采用酚红棉线实验测量泪液分泌量, PAS 染色检查结膜杯状细胞形态和数目; 在造模后的第 10d, 进行角膜组织苏木精染色检测角膜上皮变化情况。

**结果:** 实验组 NOD 小鼠泪液分泌量随造模时间而逐渐降低, 正常对照组未有明显变化。实验组的结膜杯状细胞体积变大, 在造模后的第 1d, 杯状细胞密度较正常对照组减少 ( $P=0.008$ ), 从造模后第 7d 开始, 随时间延长, 实验组杯状细胞数量逐渐减少, 且较同一时间点正常对照组显著减少 (均  $P<0.001$ )。此外, 观察两组第 10d 的角膜上皮情况, 实验组 NOD 小鼠角膜上皮层变薄, 部分角膜上皮细胞变性、基底细胞水肿。

**结论:** 初步建立了 NOD 小鼠干眼模型, 其眼表变化与临床上干眼症表现类似。

**关键词:** NOD 小鼠; 糖尿病; 干眼症; 蒸发过强型干眼模型; 结膜杯状细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.8.06

## Preliminary establishment of dry eye model in non-obese diabetic mice

Hong Cui\*, Chun-Hua Li\*, Zheng-Ri Li, Cheng-Lin Li, Hai-Yan Jin, Ning Ren, Xin-Yu Ru, Ying-Jun Li

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No.81560167)

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

\* Co-first authors: Hong Cui and Chun-Hua Li.

**Correspondence to:** Ying-Jun Li. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China. liyingjun@daum.net

Received: 2018-11-29 Accepted: 2019-07-16

## Abstract

• **AIM:** To determine the pathological changes in ocular surfaces dry eye excessive evaporation non-obese diabetic (NOD) mice model and to preliminarily explore the feasibility of diabetic dry eye model.

• **METHODS:** In this study, 40 females NOD mice were selected. The experimental group consisted of NOD mice that were diagnosed with diabetes while the normal control group consisted of those NOD mice without spontaneous diabetes. Hypodermic injection of Scopolamine hydrobromide (0.5mg/0.2mL) was administered under 40% humidity to the experimental group and placed in a controlled drying box for 12h a day. This was to achieve a dry eye model. Testing indicators on the 1, 7, 10 and 14d after modeling, phenol red thread test was used to measure tear secretion and the eye sections were stained with periodic acid-Schiff (PAS) to examine the morphology and number of conjunctival goblet cells. On the 10d after modeling, the changes in the corneal epithelium were visualized after staining with hematoxylin.

• **RESULTS:** For the NOD mice of the experimental group, the tear secretion was gradually decreased with timing, while there were no obvious changes in the normal control group. The volume of the conjunctival goblet cells of the experimental group became larger, and on the 1d after the molding, the experimental group had decreased density of the goblet cells when compared with the normal control group ( $P=0.008$ ). From the 7d after the molding, as the time was prolonged, the density of the goblet cells was gradually decreased and the differences between the two group at same time point were significant (all  $P<0.001$ ). Besides, it was required to observe the corneal epithelium of the two groups on the 10d. The result shows that the corneal epithelium became thinned, some epithelial cells were denatured, and stromal cells became edema.

• **CONCLUSION:** Dry eye model of NOD mice was preliminary established, and the changes of ocular surface were similar to those of dry eye in the clinic.

• **KEYWORDS:** NOD mice; diabetes; dry eye; excessive evaporation dry eye model; conjunctival goblet cell

**Citation:** Cui H, Li CH, Li ZR, *et al.* Preliminary establishment of dry eye model in non-obese diabetic mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(8):1293-1296

## 0 引言

糖尿病是一种复杂的慢性全身性疾病,是20~74岁人群中最为常见的主要致盲原因之一,已成为发展中国家和发达国家日益严重的公共社会问题<sup>[1-2]</sup>。糖尿病可引起多种眼部并发症,如糖尿病性视网膜病变、糖尿病性角膜病变、代谢性白内障等,其中糖尿病引起的干眼症问题占15%~33%,近几年成为研究热点<sup>[3]</sup>。干眼症发病机制复杂,选择合适的动物模型是实验研究的关键。非肥胖性糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠类似人类1型糖尿病发病特征<sup>[4-5]</sup>,因其可自发糖尿病,常作为自身免疫性糖尿病小鼠模型,用来研究糖尿病相关并发症,如糖尿病肾病等。而国内未见将其作为糖尿病性干眼模型报道,本研究初步探讨NOD小鼠作为糖尿病性干眼模型的可行性,并就其眼表变化情况进行初步讨论,为以后糖尿病性干眼的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取40只清洁级雌性NOD/LtJ小鼠,均购自美国Jackson实验室。鼠龄12wk,体质量20~25g,无特定病原体,恒温22℃、湿度55%环境下正常进食饲养。该实验严格遵循动物实验中实验动物保护和伦理学要求。

### 1.2 方法

**1.2.1 NOD小鼠糖尿病模型的建立** 鼠龄12wk开始每周检测尿糖2次,发现尿糖强阳性后用血糖仪测血糖,连续2次血糖 $\geq 16.7$ mmol/L诊断为糖尿病。NOD小鼠被诊断为糖尿病作为实验组,同时选用未自发糖尿病的同龄NOD小鼠作为正常对照组。

**1.2.2 NOD小鼠糖尿病性干眼模型的建立** 将实验组NOD小鼠置于40%以下湿度环境,每天皮下注射0.5mg/0.2mL氢溴酸萘胺,并置于可控干燥箱中,每天通风12h,制作蒸发过强型干眼模型。

**1.2.3 实验分组** NOD小鼠随机分为2组:(1)正常对照组:20只未自发糖尿病的NOD小鼠。(2)实验组:干眼1d组:5只糖尿病性干眼模型复制成功后第1d组;干眼7d组:5只糖尿病性干眼模型复制成功后第7d组;干眼10d组:5只糖尿病性干眼模型复制成功后第10d组;干眼14d组:5只糖尿病性干眼模型复制成功后第14d组。

**1.2.4 泪液分泌测定** 采用酚红棉线试验测量两组小鼠泪液的分泌量,不同时间点各选用5只小鼠,分别选取右眼进行测定。在裂隙灯下,用眼科显微镊夹酚红棉线,置于小鼠下结膜囊中外1/3,60s后取出,显微镜采用游标卡尺观察棉线湿润长度,读数精确到0.2mm,泪液分泌 $< 5.0$ mm为低分泌。每组检查后记录数据。

**1.2.5 结膜印迹细胞学检查** 不同时间点每组各选取5只小鼠,用颈椎脱臼法处死。用硝酸纤维膜印取每只小鼠的右眼结膜,将其贴于载玻片上并固定,进行过碘酸雪夫(periodic acid-Schiff, PAS)染色,使用透明液(10%乙醇:冰醋酸=7:3体积比)对纤维膜进行透明,载片镜检观察结膜上皮细胞和杯状细胞改变情况,计数穹窿结膜杯状细胞数目。镜检、计数由同一专业人员进行,采用单盲法。

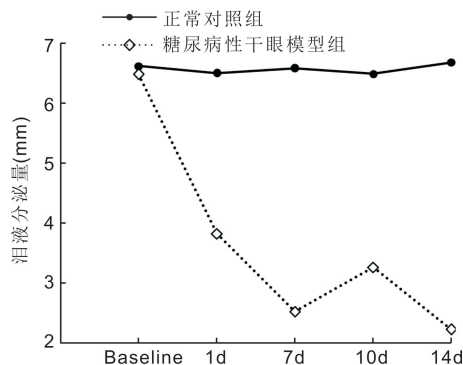


图1 小鼠糖尿病性干眼模型组和正常对照组的在不同时间点泪液分泌量 Baseline: NOD小鼠形成糖尿病性干眼模型前的泪液分泌量值。

**1.2.6 角膜组织病理学检查** 颈椎脱臼法处死小鼠,每组各选取5只小鼠,取右眼角膜并经中央切开,投入4%多聚甲醛固定。常规石蜡包埋切片,采用苏木精染色检查,观察角膜上皮变化情况。

**统计学分析:** 使用SPSS21.0统计学软件进行数据分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间不同时间指标差异比较采用重复测量数据的方差分析,各组的时间差异比较采用LSD-*t*检验,各时间点的组间差异比较采用独立样本*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠泪液分泌结果** 正常对照组与实验组在第1、7、10、14d时的泪液分泌量情况见表1和图1。对两个实验因素“分组”“时间”以及分组和时间的交互作用进行分析,差异有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 9233.79, F_{\text{时间}} = 626.42, F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 628.16$ ,均 $P < 0.001$ )。在造模后的第1、7、10、14d,泪液分泌量较正常对照组均减少,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),且从造模后第1d开始,随造模时间延长,实验组的泪液分泌量随时间而逐渐减少,于14d时泪液分泌量达到最低,而正常对照组在不同时间点的泪液分泌量未有明显变化。

**2.2 各组小鼠结膜印迹细胞学检查结果** 正常对照组的NOD小鼠结膜细胞小而圆,数量多,连接紧密,杯状细胞核圆,胞质易辨认,上皮细胞与杯状细胞比约1:1以上。建立糖尿病性干眼模型第1d,结膜细胞变大,细胞间距较正常对照组增大,核浆比减小,杯状细胞数量明显减少,上皮细胞与杯状细胞比约2:1以上。第7d,杯状细胞数量极少,核质比率=1/5。第10d,结膜细胞鳞状化生占结膜细胞1/2。第14d结膜细胞呈重度鳞状化生(图2)。

**2.3 各组小鼠结膜杯状细胞密度比较** 对两个实验因素“分组”“时间”以及分组和时间的交互作用进行分析,差异有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 408.15, F_{\text{时间}} = 38.57, F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 14.62$ ,均 $P < 0.001$ ,表2)。在造模后的第1、7、10、14d,杯状细胞密度较正常对照组均减少,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ );从造模后第1d开始,随造模时间延长,实验组杯状细胞数量逐渐减少;而正常对照组在不同时间点的杯状细胞数量未有明显变化。

**2.4 各组小鼠角膜苏木精染色结果** 正常对照组和糖尿病性干眼模型第10d组角膜病理切片见图3。正常对照

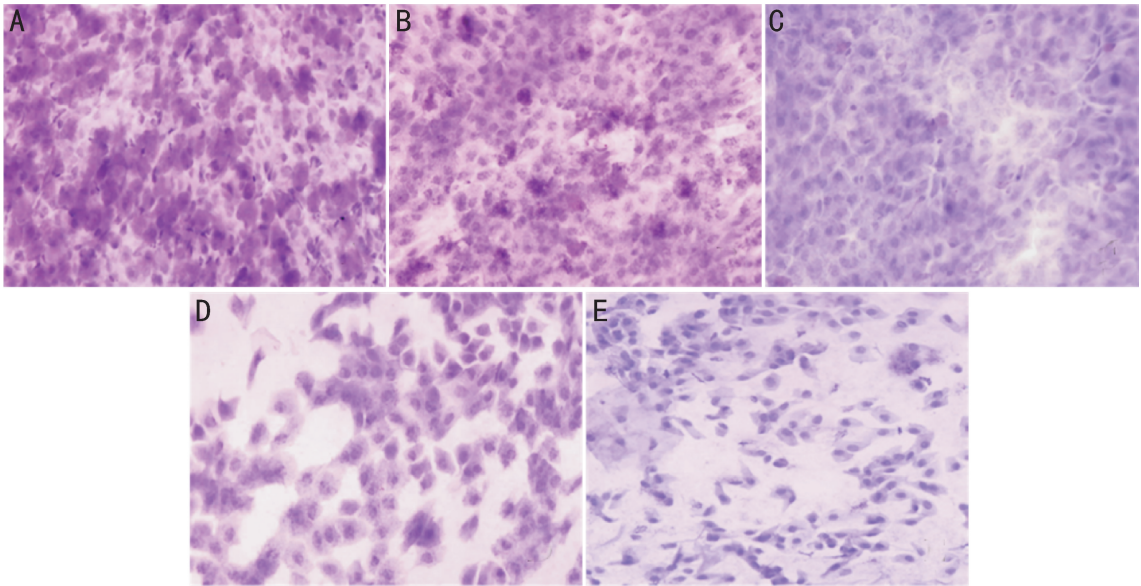


图2 各组小鼠结膜印迹细胞学检查(过碘酸-希夫染色×200) A:正常对照组;B:干眼1d组;C:干眼7d组;D:干眼10d组;E:干眼14d组。

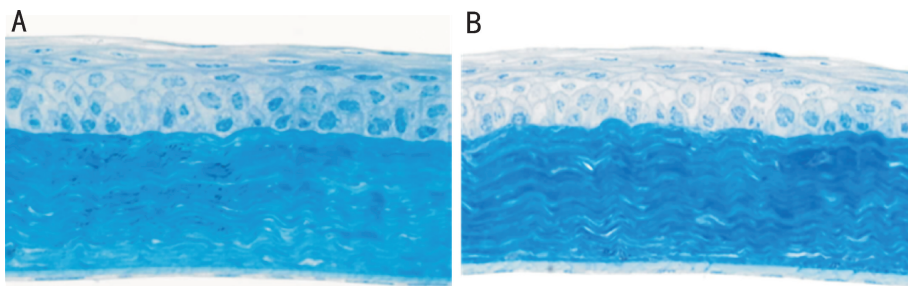


图3 各组小鼠角膜病理切片(苏木精染色×200) A:正常对照组;B:干眼10d组。

表1 两组小鼠在不同时间点的泪液分泌量比较

分组	基础值	第1d	第7d	第10d	第14d
正常对照组	6.62±0.07	6.50±0.09	6.58±0.10	6.49±0.05	6.68±0.10
实验组	6.48±0.21	3.82±0.07 <sup>a</sup>	2.52±0.08 <sup>a</sup>	3.26±0.15 <sup>a</sup>	2.22±0.05 <sup>a</sup>
<i>t</i>	1.397	51.481	74.751	46.476	90.106
<i>P</i>	0.200	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

( $\bar{x} \pm s$ , mm)

注:基础值:NOD小鼠形成糖尿病干眼模型前的泪液分泌量值;<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 同一时间点对照组。

表2 各组小鼠结膜杯状细胞密度比较

分组	第1d	第7d	第10d	第14d
正常对照组	220.47±11.48	204.57±15.99	197.48±15.73	204.37±10.81
实验组	182.84±21.10 <sup>a</sup>	123.98±4.46 <sup>a</sup>	92.41±5.20 <sup>a</sup>	105.01±5.61 <sup>a</sup>
<i>t</i>	3.504	10.854	14.179	18.241
<i>P</i>	0.008	<0.001	<0.001	<0.001

( $\bar{x} \pm s$ , 个/cm<sup>2</sup>)

注:<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 同一时间点对照组。

组角膜病理切片可见5层角膜上皮细胞,形态清晰、排列紧密。实验组角膜上皮层变薄,部分上皮细胞变性,部分基底细胞水肿。

### 3 讨论

糖尿病引起的并发症可累及全身各个系统及器官,其中糖尿病相关性眼病是其中一个主要并发症<sup>[6]</sup>,包括糖尿病性视网膜病变、糖尿病性角膜病变、代谢性白内障等。近年来,糖尿病并发的干眼症问题因其对眼表的损害可造成视力下降而引起广泛关注<sup>[7]</sup>。动物模型实验是进行糖

尿病性干眼研究必不可少的环节,选择合适的动物模型是实验研究的关键。目前,国内1型糖尿病及相关并发症的研究大多采用左脉链霉素(streptozocin, STZ)诱导的糖尿病动物模型,但该模型并没有完全模拟出1型糖尿病发病的免疫机制,且常有自愈倾向,不利于长期观察。而NOD小鼠是一种广泛使用的研究1型糖尿病的动物模型<sup>[8]</sup>,其自发性糖尿病发病率较高,且雌性小鼠更易患病。

干眼症发病机制复杂,主要包括泪膜不稳定、泪液渗透压升高、眼表炎症和损害以及神经感觉异常<sup>[9]</sup>,根据病

因不同可分为泪液分泌不足型干眼和蒸发过强型干眼。NOD小鼠因其器官特异性自身免疫的特性可使泪腺发生自身免疫性病变<sup>[10]</sup>,使得NOD小鼠成为研究干眼症的合适模型。然而,NOD小鼠是否适合建立糖尿病性干眼模型,在国内未曾报道。本实验选取雌性NOD/Lj品系小鼠(均购自美国Jackson实验室),将实验组小鼠置于40%以下湿度环境,每天皮下注射0.5mg/0.2mL氢溴酸萘胺,并置于可控干燥箱中,每天通风12h,制作蒸发过强型干眼模型,这也符合临床干眼症发病的病理生理过程。

本研究中,通过对两组NOD小鼠进行泪液分泌量测定、结膜印迹细胞学形态检查、结膜杯状细胞密度测定和角膜病理切片染色,比较两组小鼠的眼表情况,以初步探讨NOD小鼠作为糖尿病性干眼模型的可行性。本实验采用酚红棉线测量泪液分泌量,结果显示实验组NOD小鼠的泪液分泌量在不同时间点较正常对照组减少,并且从建立糖尿病性干眼模型的第1~14d,实验组泪液分泌量逐渐减少并达到最低值,由此可知实验组小鼠泪液分泌量随造模时间逐渐减少。有研究表明,泪膜稳定性可受角结膜细胞成分、结膜炎症状态与增生情况所影响<sup>[11]</sup>,并且结膜杯状细胞具有维持眼表稳定性等作用,当结膜杯状细胞密度降低时,引起眼表黏蛋白分泌减少,泪膜稳定性与功能性也就变差<sup>[12]</sup>,是反映眼表健康的重要指标。本实验采用PAS染色方法对两组小鼠结膜杯状细胞进行检查与计数,结果发现正常对照组小鼠结膜细胞小而圆,数量多,连接紧密,杯状细胞核圆,胞质易辨认,实验组结膜杯状细胞数量不断减少、体积变大,结膜细胞不断向鳞状上皮化生。在不同时间点,实验组小鼠结膜杯状细胞数量较正常对照组均减少。我们还发现,从造模第1d开始,实验组杯状细胞密度随着造模时间而逐渐降低,而正常对照组在不同时间点上未有明显变化。可见NOD小鼠建立蒸发过强型干眼模型,可表现为眼表泪液分泌量减少,结膜杯状细胞数目减少,结膜细胞变大且鳞状上皮化,而杯状细胞密度随着造模时间逐渐减低的原因可能与干眼的严重程度有关。

有研究发现<sup>[13]</sup>,干眼症患者角膜上皮厚度是变薄的,同时当泪液分泌不足或者眼表蒸发过强时可导致泪膜厚度降低。本实验采用苏木精染色观察角膜病理组织切片,结果显示实验组小鼠角膜上皮层变薄,部分上皮细胞变性,部分基底细胞水肿,这些发现与临床上干眼症表现是一致的<sup>[14]</sup>。由此我们可推测,NOD小鼠眼表损害不断加重使其角膜上皮完整性被不断破坏,而临床上角膜上皮点状着色可能与其有关。

综上所述,本实验初步建立了NOD小鼠干眼模型,该模型可操作性强、重复性好,采用泪液分泌量测定、结膜组织PAS染色、角膜上皮苏木精染色等方法显示,其眼表变化与临床上干眼症表现类似。但本研究仍有不足之处,所选取小鼠样本少,且本实验模型仅是初步建立,其可行性与科学性还需有大量实验去验证。

#### 参考文献

- 1 Srinivasan S, Santhi P, Dhamodaran G. An analysis of prevalence of dry eye syndrome in type 2 diabetes mellitus patients. *J Evid Based Med Healthc* 2017;4(11):636-641
- 2 Chaudhury A, Duvoor C, Kraleti NS, et al. Clinical review of antidiabetic drugs implications for type 2 diabetes mellitus management. *Front Endocrinol* 2017;8:6
- 3 Gao Y, Zhang Y, Ru Y, et al. Ocular surface changes in type II diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol* 2015;8(2):358-364
- 4 Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, et al. Oral probiotic administration induces interleukin - 10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 2005;48(8):1565-1575
- 5 郭啸华,刘志红,王建平,等. 大黄酸对NOD小鼠糖尿病肾病的治疗作用观察. *肾脏病与透析肾移植杂志* 2002;11(1):11-16
- 6 王睿,马挺,龙潭. 糖尿病病程对合并糖尿病的白内障患者眼表的影响. *国际眼科杂志* 2018;18(12):2228-2230
- 7 Reshma S. Prevalence of dry eye disease in type 2 diabetic patients and its association with retinopathy. *Int J Pharm Sci Res* 2017;8(10):4298-4304
- 8 Junko N, Jason LG, Stuart ET, et al. Islet recovery and reversal of murine type I diabetes in the absence of any infused spleen cell contribution. *Science* 2006;311(5768):1775-1778
- 9 Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II definition and classification report. *Ocul Surf* 2017;15(3):276-283
- 10 Schrader S, Mircheff A, Geerling G. Animal models of dry eye. *Surgery for the Dry Eye. Dev Ophthalmol* 2008;41:298-312
- 11 沈乎醒,高卫萍. 2型糖尿病发生干眼的相关因素分析. *国际眼科杂志* 2018;18(1):126-129
- 12 Moore JE, Vasey GT, Dartt DA, et al. Effect of tear hyperosmolarity and signs of clinical ocular surface pathology upon conjunctival goblet cell function in the human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6174-6180
- 13 Erdelyi B, Kraak R, Zhivov A, et al. In vivo confocal laser scanning microscopy of the cornea in dry eye disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(1):39-44
- 14 Fabiani C, Barabino S, Rashid S, et al. Corneal epithelial proliferation and thickness in a mouse model of dry eye disease. *Exp Eye Res* 2009;89(2):166-171