



负载胰岛素水凝胶结膜下植入对 DR 大鼠 VEGF 和 Ang-2 表达的影响

孙方杰¹, 肖乃民², 王清华¹, 杨俊^{1,2*}

¹ 新乡市高新医药研究院, 新乡, 河南, 中国

² 斯丹德科技股份有限公司, 新乡, 河南, 中国

Received: February 22, 2016; Received revised: March 27, 2016; Accepted: May 5, 2016

摘要

目的: 研究负载胰岛素水凝胶结膜下植入对糖尿病视网膜病变 (DR) 大鼠 VEGF 和 Ang-2 表达的影响。**方法:** 用链脲佐菌素建立大鼠 DR 模型 60 只, 随机分为糖尿病组 (A 组)、血糖不严格控制组 (B 组) 和血糖严格控制组 (C 组), 另取同龄体重相近健康大鼠作为正常对照组 (D 组), A 组和 D 组不做处理, B 组大鼠造模后给予胰岛素不规律治疗, C 组大鼠造模后结膜下给予负载胰岛素的水凝胶。造模 30 d 后, 测定 4 组大鼠体重、FBG 水平及 VEGF 和 Ang-2 在大鼠视网膜组织中的表达情况。**结果:** 与造模前及 D 组比较, 造模后 30 d A、B 2 组体重明显减轻, FBG 水平明显升高 ($P < 0.01$), C、D 2 组造模前后体重和 FBG 水平均没有明显变化 ($P > 0.05$); 与 C 组比较, B 组造模后体重明显减轻, FBG 水平明显升高 ($P < 0.01$); VEGF 和 Ang-2 在 A、B、C 3 组大鼠视网膜组织均有高表达, A、B 2 组平均荧光强度相差不大; 与 D 组比较, A、B 2 组平均荧光强度均明显增强, C 组平均荧光强度虽有升高, 但明显低于 A、B 2 组; 大鼠血糖水平高低与视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 的表达呈正相关 ($r = 0.329$, $P = 0.127$)。**结论:** 采用负载胰岛素的水凝胶结膜下给药可以有效控制大鼠血糖水平, 大鼠视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 的表达随着血糖水平的升高而增加, 有效控制血糖, 可以延缓 DR 的发生和发展。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 胰岛素; 水凝胶; 结膜下植入; VEGF; Ang-2

Influence on expression of VEGF and Ang-2 for diabetic retinopathy in rat of subconjunctival implant hydrogel loaded insulin

Fang-Jie Sun¹, Nai-Min Xiao², Qing-Hua Wang¹, Jun Yang^{1,2*}

¹ Xinxiang Institute for New Medicine, Xinxiang, Henan, China

² Standard Scientific and Technological Co., Ltd., Xinxiang, Henan, China

ABSTRACT

*通讯作者: 杨俊, 新乡市高新医药研究院, 向阳路 416 号, 新乡, 河南, 453003, 中国。
电话: +86-373-7020588. 传真: +86-373-7020588. E-mail: bcd2009@126.com.

Objective: Study the influence on expression of VEGF and Ang-2 for diabetic retinopathy in rat of subconjunctival implant hydrogel loaded insulin. **Methods:** Total of 60 rats which were induced diabetic retinopathy model with streptozotocin were randomly divided into diabetic group (group A), blood sugar wasn't strictly controlled group (group B) and blood sugar was strictly controlled group (group C), take similar peers weight healthy rat as normal control group (group D), group A and group D were not treated, while group B were given insulin therapy irregular after modeling, and group C were subconjunctival implant hydrogel loaded insulin after modeling. Measured weight, level of FBG, and the expression of VEGF and Ang-2 in retinal tissue after modeling 30 d. **Results:** The weight of group A and B were significant loss, and the level of FBG were significantly increase after modeling 30 d compared with before modeling and group D ($P<0.01$), while the weight and level of FBG of group C and D before and after modeling were not significantly change ($P>0.05$); The weight of group B were significant loss, and the level of FBG were significantly increase after modeling compared with group C ($P<0.01$); VEGF and Ang-2 in retinal tissue of A, B, C 3 groups were high expression, the average fluorescence intensity in group A and B were not difference; The average fluorescence intensity in group A and B were significantly increased compared with group D, although the average fluorescence intensity in group C increased, but significantly lower than group A and B; The blood glucose levels in rats showed a positive correlation with the expression of VEGF and Ang-2 in retinal tissue ($r=0.329$, $P=0.127$). **Conclusions:** Subconjunctival implant hydrogel loaded insulin can effectively control blood sugar levels in rats, the expression of VEGF and Ang-2 in retinal tissue in rat increases with the blood sugar levels increasing, good control of blood sugar can go a long way toward slowing DR.

Keywords: Diabetic retinopathy; Insulin; Hydrogel; Subconjunctival implant; VEGF; Ang-2

1 前言

糖尿病视网膜病变 (DR) 是糖尿病最常见的微血管并发症之一, 是致盲的首位原因, 严重影响患者生活质量。调查显示糖尿病患者中糖尿病视网膜病变的发生率为 34.3%^[1], 血糖控制不佳、病程迁延难愈是导致大血管、微血管病变的两大独立风险因子, 而视网膜微血管是重要的靶器官, 因此, 严格控制血糖是预防 DR 最有效的手段。胰岛素是临床应用最广泛的降血糖药物, 有研究报道胰岛素可使视网膜血管内皮细胞生长因子 (VEGF)、低氧诱导因子-1 (HIF-1) 和成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2) 等因子的表达上调, 加重糖尿病患者血-视网膜屏障破坏, 促进 DR 的发生发展^[2,3]。VEGF 和血管生成素-2 (Ang-2) 在 DR 新生血管的生长机制中发挥重要作用。本研究通过建立大鼠 DR 模型, 结膜下植入负载胰岛素水凝胶, 观察对视网膜 VEGF、Ang-2 表达的影响, 探讨胰岛素在 DR 发生发展中的作用。

2 材料与方法

2.1 DR模型的制作

选择8周龄SD大鼠60只, 雌雄各半, 体质量180~220 g, 所有大鼠均由河南省动物实验中心提供, 单笼、标准饲料喂养。用链脲佐菌素 (STZ, Sigma公司生产) 诱发糖尿病, 具体诱导方法: 造模前, 所有大鼠进食, 水自由饮用过夜, 用0.001 mmol/L柠檬酸盐缓冲溶液 (pH 4.5) 将STZ配成10 mg/mL的STZ溶液, 0.22 μ m微孔滤膜过滤, 置冰水浴中备用。对所有大鼠按照60 mg/kg的剂量用1 mL注射器于左下腹腔内注射STZ溶

液, 整个过程保证无菌操作并于10 min内完成, 30 min后恢复正常进食, 72 h断尾, 采取大鼠尾血, 用血糖仪和配套血糖试纸测定血糖及尿糖, 凡同时满足血糖 ≥ 16.7 mmol/L、尿糖呈阳性、多饮、多尿、体重下降的大鼠均为DR模型建立成功, 列入实验对象, 60例全部造模成功, 造模成功率100%。

2.2 实验方法

所有SD大鼠随机均分为糖尿病组 (A组)、血糖不严格控制组 (B组) 和血糖严格控制组 (C组), 另取同龄体重相近健康大鼠作为正常对照组 (D组), A组和D组不做处理, B组大鼠腹腔注射STZ3周后, 给予胰岛素治疗, 但是胰岛素给药时间、剂量及给药间隔不定, 血糖处于波动状态, 连续30 d。C组大鼠腹腔注射STZ3周后, 结膜下给予负载胰岛素的水凝胶 (新乡市高新医药研究院自主研发, 规格: 胰岛素10 U/mg) 治疗, 按照体质量以胰岛素24~36 U/kg一次性植入。检测血糖, 空腹血糖 (FBG) 控制在6 mmol/L~9 mmol/L。

2.3 观察指标

造模30 d后, 测定4组大鼠体重及FBG水平; 采用免疫荧光法检测大鼠视网膜组织中VEGF和Ang-2表达情况: 按照4 ml/kg体质量腹腔注射10%水合氯醛, 麻醉后, 迅速摘除大鼠眼球, 随即放入预冷备用的4%多聚甲醛固定液中, 30 min后除去眼前节组织, 固定24 h, 制作石蜡切片。所有试剂和试剂盒均在有效期内使用, 实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

2.4 数据处理

负载胰岛素水凝胶结膜下植入对 DR 大鼠 VEGF 和 Ang-2 表达的影响

每只大鼠取3张视网膜切片，每张切片取3个视野，计算单位面积VEGF和Ang-2的荧光强度，取平均值并绘图，计量资料以均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用独立t检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 4组大鼠体重及血糖变化情况

表 1 4 组大鼠体重及血糖变化情况

组别	体重(g)			FBG(mmol/L)		
	造模前	造模后 1 d	造模后 30 d	造模前	造模后 1 d	造模后 30 d
A(n=20)	201.22±4.78	201.04±4.33	143.25±5.67***	6.23±0.86	6.18±0.75	22.85±3.21***
B(n=20)	198.67±4.62	198.2±34.28	149.49±10.98***▼	6.22±0.64	6.13±0.52	15.67±4.89***▼
C(n=20)	199.78±5.02	199.42±4.86	198.77±5.43	6.41±0.81	6.28±0.75	6.81±0.99
D(n=20)	201.18±5.34	201.15±5.06	201.26±3.75	6.19±0.65	6.18±0.57	6.25±0.76

注：与造模前比较，** $P < 0.01$ ；与 D 组比较，*** $P < 0.01$ ；与 C 组比较，▼ $P < 0.01$ 。

3.2 4组大鼠视网膜VEGF和Ang-2的表达情况

VEGF 和 Ang-2 在 A、B、C 3 组大鼠视网膜组织均有高表达，A、B 2 组平均荧光强度相差不大，与 D 组比较，A、B 2 组平均荧光强度均明显增强，C 组平均荧光强度虽有升高，但明显低于 A、B 2 组。大鼠血糖水平高低与视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 的表达呈正相关（ $r = 0.329$ ， $P = 0.127$ ）。

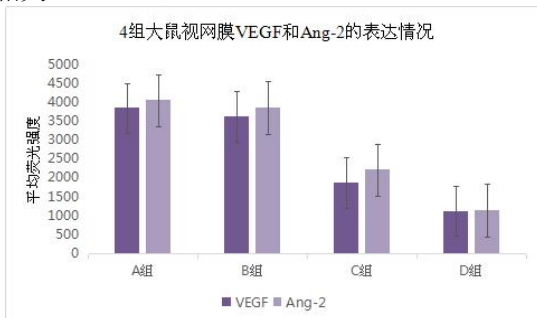


图 1 4 组大鼠视网膜 VEGF 和 Ang-2 的表达情况

4 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病患者眼部常见且严重的并发症，可以造成视力不可逆性损害，治疗有一定难度。胰岛素是一种视网膜神经元的存活因子，长期大剂量胰岛素全身给药治疗，虽可降低DR风险，但是容易引发严重低血糖反应^[4,5]，另外胰岛素半衰期短，需要反复注射，且需要注意改变注射部位，给病人的治疗带来一定痛苦，降低了病人的顺应性，且容易造成漏服的现象，而影响临床治疗结果。

与造模前比较，造模后 1 d A、B、C 3 组体重及 FBG 水平均没有明显变化（ $P > 0.05$ ），造模后 30 d A、B 2 组体重明显减轻，FBG 水平明显升高，差异均具有显著统计学意义（ $P < 0.01$ ），C、D 2 组造模前后体重和 FBG 水平均没有明显变化（ $P > 0.05$ ）；与 D 组比较，A、B 2 组造模后体重明显减轻，FBG 水平明显升高，差异均具有显著统计学意义（ $P < 0.01$ ）；与 C 组比较，B 组造模后体重明显减轻，FBG 水平明显升高，差异均具有显著统计学意义（ $P < 0.01$ ）。

STZ 诱发大鼠 DR 模型是目前公认的一种经典造模模型，通过诱导胰腺产生大量氧自由基，造成β细胞损伤，进而导致胰岛素下降和血糖升高，形成胰岛素依赖型糖尿病模型，成模率高^[6]。本研究采用该方法对 60 只大鼠建立 DR 模型，成模 60 只，成模率 100%。本研究中采用负载胰岛素的水凝胶结膜下给药控制大鼠血糖水平，结果显示血糖控制水平较好，FBG 水平平稳，分析原因可能是水凝胶作为胰岛素载体，将胰岛素负载在其中，利用载体材料的缓释原理，得以有效控制胰岛素缓慢释放，平稳胰岛素血药浓度，从而达到较好的血糖控制效果^[7]。另外胰岛素持续释放可以避免重复注射胰岛素而对周围组织造成损伤，且水凝胶可以在体内完全降解因而无需手术切除^[8]，也是其应用的优势。

有研究报道胰岛素正规治疗，血糖平稳控制后，增生性视网膜病变的累计发病率为 21%，其中致盲的患者比例不到 1%，而胰岛素不规律用药患者，血糖水平波动较大，增生性视网膜病变的累计发生率为 50%^[9]。本研究对比了两种不同胰岛素给药方式对 DR 大鼠血糖水平的控制程度和大鼠视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 表达，研究结果显示与造模前比较，造模后 30 d 大鼠体重明显下降，FBG 水平明显升高，采用不同方法控制 DR 大鼠血糖后，血糖控制不严格大鼠体重仍然下降明显，FBG 水平依然较高，均显著高于正常大鼠，血糖控制严格大鼠体重和 FBG 水平均恢复至正常状态，与正常大鼠无差异。免疫荧光检测结果显示：造模成功大鼠视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 均呈高表达状态，血糖控制不严格大鼠视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 仍呈高表达状态，与未经治疗的糖尿

负载胰岛素水凝胶结膜下植入对 DR 大鼠 VEGF 和 Ang-2 表达的影响

病大鼠表达相似, 血糖控制严格大鼠视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 表达程度高于仍正常大鼠, 但明显低于血糖控制不严格大鼠。该结果说明血糖水平高低与大鼠视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 的表达呈正相关, 大鼠视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 的表达随着血糖水平的升高而增加, 也说明有效控制血糖水平可以减少 DR 的发生率, 减缓 DR 的发生和发展, 与 Kakizawa H 等^[10]的报道一致。

综上所述, 采用负载胰岛素的水凝胶结膜下给药可以有效控制大鼠血糖水平, 大鼠视网膜组织中 VEGF 和 Ang-2 在糖尿病大鼠视网膜组织中呈高表达, 可以作为 DR 的检测指标, 但是其在临床的应用价值有待更深一步的研究。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会慢性并发症调查组. 1991-2000 年全国住院糖尿病患者慢性并发症及相关大血管病变回顾性分析[J]. 中华医学科学院学报, 2002, 24(5): 447-451.
- [2] Poulaki V, Qin W, Joussen AM, et al. Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier break down via hypoxia-inducible factor-1 alpha and VEGF[J]. J Clin Invest, 2002, 109(6): 805-815.
- [3] Layton C J, Becker S, Osborne N N. The effect of insulin and glucose levels on retinal glial cell activation and pigment epithelium-derived fibroblast growth factor-2[J]. Mol Vis, 2006, 12(1): 43-54.
- [4] Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus[J]. N Engl J Med, 1993, 329: 977-986.
- [5] Reiter CE, Sandirasegarane L, Wolpert EB, et al. Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo[J]. Am J Physiol-Endocrinol & Metabol, 2003, 285(E7): 63-74.
- [6] 李明新. 早期大鼠实验性糖尿病视网膜病变模型的建立及观察[J]. 徐州医学院学报, 2005, 25(5): 436-440.
- [7] 孙方杰, 马瑞青, 崔庆, 等. 对合成的热敏感和可生物降解水凝胶的性能研究[J]. Journal of Pharmaceutical Medicine, 2015, 3(2): 50-54.
- [8] 孙方杰, 段振晓, 马瑞青, 等. 水凝胶作为胰岛素载体缓释药物的研究进展[J]. Journal of Pharmaceutical Medicine, 2015, 3(2): 62-65.
- [9] Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Research Group, Nathan DM, Zinman B, Cleary PA, et al. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005)[J]. Arch Intern Med, 2009, 169(14): 1307-1316.
- [10] Kakizawa H, Itoh M, Itoh Y, et al. The relationship between glycemic control and plasma vascular endothelial growth factor and endothelin-1 concentration in diabetic patients[J]. Metabolism, 2004, 53(5): 550-555.