

糖尿病大鼠视网膜血流变化的彩色多普勒分析

王梅¹, 蓝育青¹, 刘嫣芬¹, 文艳玲², 朱邦豪³, 李海刚⁴

(中山大学 1. 附属第二医院眼科; 2. 附属第二医院超声科; 3. 中山医学院药理教研室;
4. 附属第二医院病理科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】采用彩色多普勒超声检查对糖尿病大鼠视网膜中央动脉(CRA)血流进行测定,探讨糖尿病早期视网膜病变的血流动力学的变化规律。【方法】链脲佐菌素(STZ)腹腔注射诱导而成糖尿病大鼠模型共66只并随机分为4周、8周及12周3组。采用彩色多普勒超声检查测定大鼠右眼CRA的血流参数,包括峰值流速(PSV)、舒张期最低流速(EDV)、平均流速、阻力指数(RI)、搏动指数(PI)以及血管内径。检查结束后,立即摘除大鼠右眼,进行视网膜血管消化铺片的制作。【结果】光镜下,糖尿病大鼠的视网膜血管消化铺片在12周,始观察到视网膜的早期病变,表现为毛细血管周细胞的形态学变化。4周时,糖尿病大鼠CRA的各血流参数与对照组无显著性差异;8周时,糖尿病大鼠的CRA的PSV及EDV显著下降;12周时,糖尿病大鼠的CRA的流速均显著低于对照组,而RI、PI则显著增高。【结论】在糖尿病早期,视网膜出现血管病变之前,视网膜血流动力学已经出现异常改变,并进行性加重。视网膜血流减少与血液灌注不良是糖尿病视网膜病变的重要发病原因。

关键词:糖尿病视网膜病变;血流动力学;超声检查,多普勒,彩色

中图分类号:R774.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2003)04-0371-04

Retinal Blood Flow Changes in Diabetic Rats Measured with Color Doppler Imaging

WANG Mei¹, LAN Yu-qing¹, LIU Yan-fen¹, WEN Yan-ling², ZHU Bang-hao³, LI Hai-gang⁴

(1. Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital; 2. Department of Ultrasound, The Second Affiliated Hospital;
3. Department of Pharmacology, Zhongshan Medical College; 4. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital;
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the early change of the retinal blood flow in the diabetic rats by measuring the central retinal artery (CRA) with color Doppler imaging.【Methods】66 Streptozocin-induced diabetic rats were divided into three groups- 4th weeks, 8th weeks and 12th week. The circulatory parameters of CRA of the right eyes in the diabetic and control rats were measured using color Doppler imaging, including peak systolic velocity (PSV), end diastolic velocity (EDV), mean velocity, resistive index (RI), pulsitive index (PI) and diameter of the blood vessel. The right eyes of the diabetic rats were dissected immediately after measured by color Doppler imaging and used to make retinal digest preparations.【Results】Under the light microscopy, the morphological alterations of pericytes were observed in the retinal digest preparations in the diabetic rats of the 12th week group. In the 4th week group, the circulatory parameters in CRA of the diabetic rats did not show significant differences from the control. In the 8th week group, PSV and EDV in CRA decreased significantly in the diabetic rats. In the 12th week group, PSV, EDV and blood velocity in the diabetic rats was lower significantly than that in the control, on the contrary, RI and PI in the diabetic rats was higher significantly.【Conclusion】At the early stage of diabetes, the abnormal changes of retinal blood flow occur be-

收稿日期:2002-12-09

作者简介:王梅(1968-),女,山东荣成人,硕士,主治医师。

fore the pathological change of the retinal blood vessels by measuring the circulatory parameters in CRA with color Doppler imaging. The results from the study suggest that the consistently decreased blood flow and perfusion of the retina is the important cause of diabetic retinopathy.

Key words: diabetic retinopathy; hemodynamics; Ultrasonography, Doppler, color

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4): 371 ~ 374]

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DRP)为糖尿病的严重并发症之一,发病率高,目前已成为我国主要的致盲眼病。随着糖尿病的发生发展,DRP的最早病理改变为周细胞的形态学变化与数量减少,然后逐渐出现微血管瘤、血管闭塞等病变^[1]。而眼部血流动力学的改变则是DRP发生的重要原因^[2-4],但是由于缺少与和病程相应的视网膜病理组织学的对照研究,血流动力学改变的规律特别是早期糖尿病视网膜的血流变化规律一直存在不同的结论,如有研究^[2]认为链尿佐菌素(streptozocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠视网膜血流速度减慢,血流减少,另有研究^[4, 5]结果却显示视网膜血流增加。为此,本研究运用彩色多普勒超声检查对早期糖尿病大鼠视网膜中央动脉(central retinal artery, CRA)进行血流动态的检测,并参照视网膜血管的病理改变,观察糖尿病早期视网膜病变血流动力学的变化,了解DRP发病的病理生理过程,探讨DRP的发病机理,为糖尿病视网膜病变防治研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 糖尿病大鼠实验模型制作

雄性成年Wistar大鼠(中山大学中山医学院实验动物中心提供,二级动物),6~8周龄,体质量200~250 g。注射药物前禁食12 h并称体质量,分为糖尿病组与对照组。将链尿佐菌素(Sigma公司产品)溶解于1 g/L的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH 4.6)中,配制成20 g/L的溶液,按体质量65 mg/kg的剂量一次性注射于糖尿病组大鼠腹腔中。对照组注射等量的枸橼酸钠缓冲液。注射72 h后取尾尖血,用One-touch II血糖仪(美国产)测血糖,血糖在16.7 mmol/L以上者、尿糖持续阳性者选定为糖尿病大鼠实验模型。大鼠自由饮水,鼠颗粒料喂养,每周检测尿糖、饮水、进食和体质量等情况,每月测量血糖一次。然后随机将对照组(N)与糖尿病组(D)分为4周($n_N = 10$, $n_D = 10$)、8周

($n_N = 10$, $n_D = 11$)、12周($n_N = 13$, $n_D = 12$)3组。

1.2 大鼠眼CRA血流参数的测量与指标

超声检查仪:百胜AU6型彩色多普勒超声诊断仪(美国产),10 MHz电子扫描探头。测量方法:戊巴比妥钠(按体质量30 mg/kg)腹腔注射将大鼠麻醉后,用彩色多普勒超声诊断仪检测大鼠CRA,即将探头置于眼睑上,测量频谱多普勒,在获取5个以上稳定心动周期时,进行各项血流参数的测量;上述操作重复3次,取各项指标平均值。根据多普勒超声血流参数指标测定峰值血流速度(peak systolic velocity, PSV)、舒张期末流速(end diastolic velocity, EDV)、平均血流速度(mean velocity, \bar{v})阻力指数(resistive index, RI)、搏动指数(pulsitive index, PI)以及血管内径(diameter, d)。

1.3 视网膜血管消化铺片的制作与观察

对照组与糖尿病组大鼠麻醉,并经彩色多普勒超声检测大鼠CRA后,立即摘除眼球并置于40 g/L多聚甲醛固定液中后固定36~72 h,参照张惠蓉^[6]介绍的方法制作大鼠视网膜血管消化铺片,PAS加苏木精染色,光镜下观察。

1.4 统计学分析

均采用大鼠右眼检测分析,数据存入SPSS软件包数据库中,采用两组独立样本的 t 检验统计及相关性分析。

2 结果

2.1 光镜下对照组及3组糖尿病大鼠的视网膜血管消化铺片的变化

对照组大鼠视网膜毛细血管周细胞核体积较小,染色深,毛细血管管腔通畅(图1)。4周及8周糖尿病大鼠视网膜血管消化铺片中未见明显变化。仅在12周糖尿病大鼠中观察到视网膜毛细血管周细胞出现形态学的改变,包括核肿胀,体积增大,染色变浅,未见明显微血管瘤改变(图2)。

2.2 糖尿病各期大鼠CRA的血流参数

4周时,糖尿病大鼠CRA的血流速度出现下降

的趋势。8周时,大鼠 CRA 的 PSV、EDV 显著减少 ($P < 0.05$)。至 12 周时,糖尿病大鼠各项血流速度参数均显著降低 ($P < 0.05$),并伴有 PI、RI 显著

增高 ($P < 0.05$)。各项血流参数与同期血糖无显著相关性 ($P > 0.05$, 见表 1 及图 3)。

表 1 不同时期糖尿病大鼠视网膜中央动脉血流参数

Table 1 Circulatory parameters of the CRA at different stages of diabetes ($\bar{x} \pm s$)

	4 th week		8 th week		12 th week	
	Control (<i>n</i> = 10)	Diabetes (<i>n</i> = 10)	Control (<i>n</i> = 10)	Diabetes (<i>n</i> = 11)	Control (<i>n</i> = 13)	Diabetes (<i>n</i> = 12)
PI	0.74 ± 0.10	0.72 ± 0.11	0.64 ± 0.14	0.75 ± 0.18	0.63 ± 0.12	0.88 ± 0.25 ¹⁾
RI	0.48 ± 0.14	0.47 ± 0.15	0.42 ± 0.07	0.50 ± 0.09	0.42 ± 0.07	0.52 ± 0.12 ¹⁾
<i>v</i> (PSV)/(mm · s ⁻¹)	7.61 ± 1.31	6.90 ± 0.96	16.37 ± 2.50	10.97 ± 1.30 ¹⁾	18.00 ± 2.46	10.89 ± 1.28 ¹⁾
<i>v</i> (EDV)/(mm · s ⁻¹)	4.28 ± 1.67	3.72 ± 1.57	9.58 ± 1.73	4.78 ± 0.72 ¹⁾	9.54 ± 1.43	4.74 ± 0.54 ¹⁾
\bar{v} /(mm · s ⁻¹)	2.80 ± 0.93	2.47 ± 0.38	11.72 ± 2.18	7.84 ± 0.99	13.99 ± 2.06	7.03 ± 0.85 ¹⁾
<i>d</i> /mm	0.70 ± 0.10	0.58 ± 0.07 ¹⁾	0.85 ± 0.12	0.71 ± 0.06	0.67 ± 0.06	0.64 ± 0.09
<i>c</i> (Blood glucose)/ mmol/L		22.3 ± 2.7		23.5 ± 2.2		23.8 ± 2.8

1) Compared with control group, $P < 0.05$

3 讨论

应用彩色多普勒测量周围血管血流频谱是研究血流动力学的重要方法^[7-9]。与以往血流动力学研究方法相比,彩色多普勒具有敏感、无创伤、可重复性、实时检测血管等优点。它不仅可以直接检测血管内血流速度,还可综合搏动指数(PI)、阻力指数(RI)等指标来反映被测血管的管壁弹性和远端血管阻力等综合因素的情况。因此,可以更全面地了解血管的血流灌注状态。此外,彩色多普勒也可进行血管的内径、走行等血流形态学的显示。

3.1 彩色多普勒超声检查与大鼠视网膜血管消化铺片变化的对照研究

本研究中视网膜血管消化铺片结果显示糖尿病大鼠在 12 周时视网膜才出现周细胞的形态学改变,为视网膜病变的早期。此前,CRA 的血流动力学指数已出现变化,表现为血流速度(PSV、EDV)降低,RI、PI 增高。与国外糖尿病大鼠研究^[10]报道相似。但与彩色多普勒超声检查的临床研究^[8]结果不尽相同,临床上显示无 DRP 的糖尿病患者 CRA 的 EDV 较正常对照组显著下降,但 PSV 及 RI 无显著变化,其间差异的原因可能与临床中糖尿病患者的病程长短、血糖的高低变异较大以及降血糖药物的应用等多种因素有关。

本研究的结果显示在糖尿病早期,CRA 仅有血流速度的减慢,随着病程的进展,CRA 进一步出现 RI 与 PI 的异常增高,由此可见 CRA 的血流参数异常变化的程度,与视网膜的病理变化过程相对应,呈现进行性的加重,表明通过彩色多普勒超声检查并综合分析 CRA 的血流变化能够了解糖尿病视网膜病变的程度,可以敏感检测糖尿病早期不同阶段视网膜血流动力学的变化。

3.2 彩色多普勒超声检查血流参数指标的变化在 DRP 发病机理中的研究

彩色多普勒超声检查血流参数指标中,PSV 反映血管充盈度和血流供应强度,PI 反映血管壁的弹性,而 EDV 及 RI 则反映被测血管远端组织血流灌注状态。EDV 下降与 RI 升高,提示远端组织血供严重不足。本研究的结果显示在开始出现视网膜血管病变之初,糖尿病大鼠 CRA 的血流频谱已表现为低流速、高阻力,即 PSV 下降与 PI 升高,这表明 CRA 内的血流减少;另二个指标 EDV 下降及 RI 的异常增加,则提示 CRA 所供应的视网膜血循环系统已经存在血液灌注不良。此外,本研究首次对 CRA 的内径进行测量,结果发现在糖尿病早期 4 周时,CRA 内径较正常对照组显著变小,其后虽然血管内径未有显著差异,但糖尿病组始终小于正常对照组,结合 CRA 血流速度降低,进一步提示在 DRP 早期,视网膜的血流量减少。而视网膜血流灌注不

良将影响视网膜的氧化、营养,促使新生血管形成,这可能是 DRP 不断进展、微血管瘤发生的重要原因。

3.3 彩色多普勒超声检查血流参数指标的变化与血糖的相关性研究

本研究中糖尿病大鼠 CRA 各项血流参数的变化与血糖无明显相关性,提示上述血流的变化可能与高血糖引起的继发改变如血管活性因子的释放等因素有关,有待进一步研究。

综上所述,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,结果表明在糖尿病早期,视网膜出现血管病变之前,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 DRP 的重要发病原因。在糖尿病早期、DRP 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 DRP 的发生与发展。而针对早期视网膜血流的变化特点、寻找其病变原因、并进行相应的治疗则是本课题下一步研究的方向。

(本文图 1~3 见封 2. Fig. 1~3 shown in inside front cover)

参考文献:

- [1] Attawia M A, Nayak R C. Circulating antipericyte autoantibodies in diabetic retinopathy[J]. *Retina*, 1999, 19(5): 390.
- [2] Higashi S, Clermont A, Dhir V, *et al.* Reversibility of

retinal flow abnormalities is disease-duration dependant in diabetic rats[J]. *Diabetes*, 1998, 47(4): 653.

- [3] Schmetterer L, Wolzt M. Ocular blood flow and associated functional deviations in diabetic retinopathy[J]. *Diabetologia*, 1999, 42(4): 387.
- [4] Kohner E M, Patel V, Rassam S M B. Perspectives in diabetes: role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 1995, 44(6): 603.
- [5] Tilton R G, Chang K, Pugliese G, *et al.* Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors[J]. *Diabetes*, 1989, 38(10): 1258.
- [6] 张惠蓉. 眼微循环及相关疾病 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 19.
- [7] Asrani S, Zou S, D' Anna S, *et al.* Noninvasive visualization of blood flow in the choriocapillaris of the rat[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(8): 312.
- [8] Dimitrova G, Kato S, Tamaki Y, *et al.* Choroidal circulation in diabetic patient[J]. *Eye*, 2001, 15(pt 5): 602.
- [9] Mackinnon J R, Mckillop G, O' Brien C, *et al.* Color doppler imaging of the ocular circulation in diabetic retinopathy[J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2000, 78(4): 386.
- [10] Deng D, Evans T, Mukherjee K, *et al.* Diabetes-induced vascular dysfunction in the retina: role of endothelin[J]. *Diabetologia*, 1999, 42(10): 1228.

(编辑 刘清海)

(上接第 354 页 from page 354)

- parative analysis of fluoride content of enameloid in sea-water and fresh-water shark[J]. *Arch Oral Biol*, 1980, 25(2): 145.
- [6] Frank R M. Structural events in the caries process in enamel, cementum and dentin[J]. *J Dent Res*, 1990, 69(Spec): 559.
- [7] Holmen L, Thylstrup A, Gaard B, *et al.* A scanning electron microscopic study of progressive stages of enamel caries *in vivo*[J]. *Caries Res*, 1985, 19(4): 355.
- [8] Jongebloed W J, Molenaar I. Morphology and size distribution of sound and acid-treated enamel crystallites[J]. *Calcif Tissue Res*, 1975, 19(2): 109.
- [9] Wen S L. Human enamel structure studied by high resolution electron microscopy[J]. *Electron Microsc Rev*, 1989, 2(1): 1.

(编辑 刘清海)

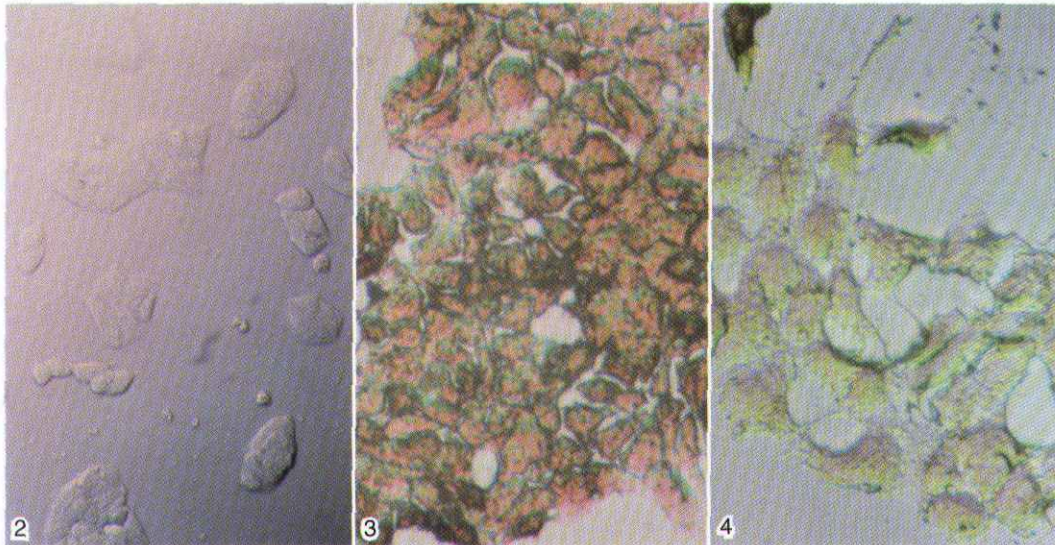


图 2 无饲养层生长的 ES-BALB/c 细胞 ×200
 图 3 ES-BALB/c 细胞的 PKC_α 免疫组化图象 ×200
 图 4 ES-BALB/c 细胞的 PKC_γ 免疫组化图象 ×200
 Fig. 2 ES-BALB/c cells grew without feeder layer
 Fig. 3 ES-BALB/c cells in PKC_α staining (positive)
 Fig. 4 ES-BALB/c cells in PKC_γ staining (negative)

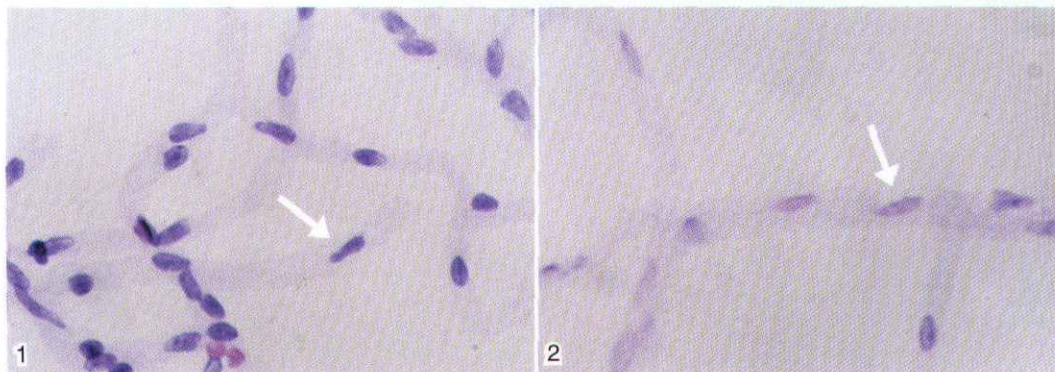


图 1 光镜下 12 周对照组大鼠的视网膜血管消化铺片
 图 2 光镜下 12 周糖尿病大鼠的视网膜血管消化铺片
 Fig. 1 The retinal digest preparation under the light microscope in the control rat at the 12th week (arrow: punctate, ×400)
 Fig. 2 The retinal digest preparation under the light microscope in the diabetic rat at the 12th week (arrow: punctate, ×400)

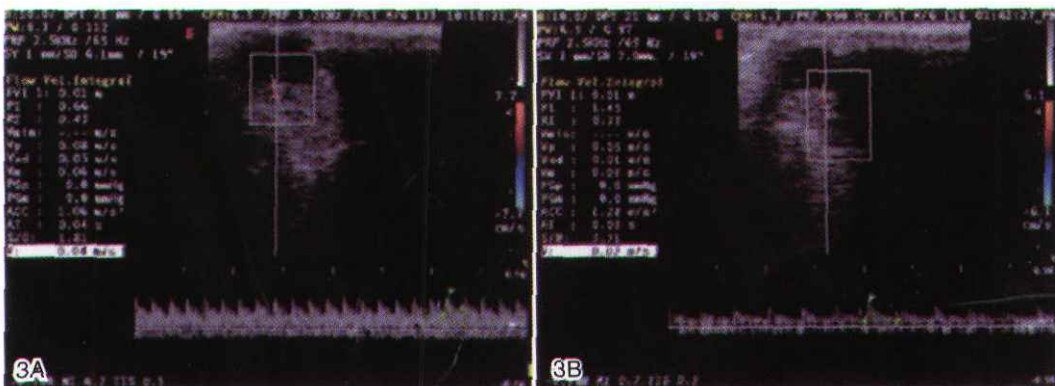


图 3 12 周大鼠视网膜中央动脉的彩色多普勒超声检查血流参数
 Fig. 3 The circulatory parameters of CRA at 12th week measured by color Doppler imaging
 A Control group, B Diabetic group