



负载胰岛素水凝胶结膜下植入在大鼠糖尿病视网膜病变中的应用

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 14, 2016; Received revised: March 18, 2016; Accepted: April 15, 2016

摘要

目的: 研究负载胰岛素的水凝胶在糖尿病视网膜病变中的应用。**方法:** 用链脲佐菌素建立大鼠糖尿病视网膜病变 (DR) 模型, (1) 结膜下植入含异硫氰酸荧光素标记的负载胰岛素的水凝胶, 24 h 后, 取视网膜, 观察胰岛素到达视网膜情况及给药后不同时间诱导视网膜胰岛素受体和蛋白激酶磷酸化情况; (2) 剩余 DR 模型大鼠均分为 2 组, 观察组结膜下植入负载胰岛素的水凝胶, 对照组不做处理, 隔天测定大鼠血糖水平并记录至 2 个月。**结果:** 结膜下注射极低剂量胰岛素能到达视网膜, 对糖尿病损坏的视网膜神经元有一定的生物活性; 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶后, 不仅诱导大鼠视网膜中胰岛素受体磷酸化, 也增加了蛋白激酶磷酸化; 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶 2 个月时, 观察组大鼠血糖水平保持在正常范围, 且显著低于对照组 ($P < 0.01$)。**结论:** 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶, 胰岛素缓慢释放长达 2 个月, 有效的避免血糖波动, 维持血糖水平至正常范围。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 胰岛素; 水凝胶; 结膜下植入

Application of subconjunctival implant hydrogel loaded insulin on diabetic retinopathy in rat

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

Objective: Study the application of subconjunctival implant hydrogel loaded insulin on diabetic retinopathy in rat. **Methods:** Induced diabetic retinopathy model with streptozotocin (STZ), (1) Subconjunctival implant hydrogel loaded insulin containing fluorescein isothiocyanate-labeled, taking the retina to observe the conditions on insulin reach retinal after 24 h, and the conditions on induced insulin receptor and protein kinase phosphorylation at different times after administration. (2) The remaining DR model rats were divided into two groups, subconjunctival implant hydrogel

*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.

loaded insulin in the observing group, the control group did nothing, then measured the blood glucose levels in rats at least every other day until two months. **Results:** The low doses of insulin which was injected by subconjunctival can reach the retina, and has some biological activity on retinal neurons damaged by diabetic. It's not only induced retinal insulin receptor phosphorylation, but also increases the protein kinase phosphorylation after subconjunctival implant hydrogel loaded insulin. The blood glucose levels in the observing group maintained in the normal range and was significantly lower than the control group ($P<0.01$) at two months subconjunctival implant hydrogel loaded insulin. **Conclusions:** The insulin was slowly release for up to two months after subconjunctival implant hydrogel loaded insulin, effectively avoid fluctuations in blood sugar, maintain blood glucose levels to the normal range.

Keywords: Diabetic retinopathy; Insulin; Hydrogel; Subconjunctival implant

1 前言

糖尿病视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)是常见的糖尿病所致的视网膜损害,是糖尿病性微血管病变中严重并发症之一,已成为致盲的首位原因。流行病学调查显示,若不采取合理预防和治疗,全世界DR患者人数将从2010年的1亿3千万增至2030年的1亿9千万^[1]。有研究证实大剂量高频率胰岛素强化治疗,可降低DR风险^[2]。本文主要是在前人研究开发的一种可作为载体负载胰岛素的水凝胶基础上,建立DR模型,结膜下给药,治疗DR大鼠,效果较好,现报道如下。

2 材料与方 法

2.1 DR模型的建立

选择SD大鼠36只,雌雄各半,体质量180~210 g,所有大鼠均由河南省动物实验中心提供,单笼安置,标准饲料喂养。用Sigma公司生产的链脲佐菌素(STZ)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,经0.22 μm 微孔滤膜过滤,置于冰水浴中备用。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,整个过程均为无菌操作并于10 min内完成,30 min后恢复正常进食,72 h后断尾,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,共36只。

2.2 实验方法

实验1:随机选取10只DR模型大鼠左眼结膜下植入含75 mg异硫氰酸荧光素(FITC)标记的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),按照体质量以胰岛素24~36 U/kg植入,右眼作为对照。24 h后处死动物,取视网膜,备用。

实验2:另外26只DR模型大鼠均分为2组,观察组($n=13$)结膜下植入负载胰岛素的水凝胶,按照体质量以胰岛素24~36 U/kg植入,对照组($n=13$)不做处

理。植入12 h后恢复正常进食,隔天测定大鼠血糖水平并记录至2个月,并同时记录大鼠体质量。

2.3 观察指标

实验1中,测定结膜下植入负载胰岛素的水凝胶后胰岛素到达视网膜情况,给药后1/4 h、1/2 h、1 h、2 h、3 h、4 h和6 h诱导视网膜胰岛素受体和蛋白激酶磷酸化情况;实验2中,隔天测定大鼠血糖水平并记录,每次测定结果取18只大鼠血糖水平平均值。

2.4 图像分析及数据处理

实验1中,每只大鼠取3张视网膜切片,检测指标取平均值并绘图;实验2中,计量资料以均值 \pm 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 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶后药物到达视网膜情况

读取视网膜裂解物荧光,剩余溶解产物用于蛋白质定量。以每 μg 视网膜蛋白质计算视网膜FITC标记胰岛素量,左眼视网膜FITC标记胰岛素量比右眼高33倍(图1),说明结膜下注射极低剂量胰岛素能到达视网膜,对糖尿病损坏的视网膜神经元有一定的生物活性。

3.2 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶后,诱导视网膜胰岛素受体和蛋白激酶磷酸化情况

结膜下植入负载胰岛素的水凝胶后,不仅诱导大鼠视网膜中胰岛素受体磷酸化(图2),也增加了蛋白激酶磷酸化(图3),特别是在视网膜神经节细胞和内侧面核层(图4),但是没有引起P44/42磷酸化(数据未显示)。

3.3 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶2个月时,2组大鼠血糖水平

结膜下植入负载胰岛素的水凝胶2个月时,观察组大鼠血糖水平保持在正常范围,且显著低于对照组,差异有显著统计学意义($P<0.01$),说明一次性结膜下植

负载胰岛素水凝胶结膜下植入在大鼠糖尿病视网膜病变中的应用

入负载胰岛素的水凝胶，胰岛素药效可长达2个月之久。

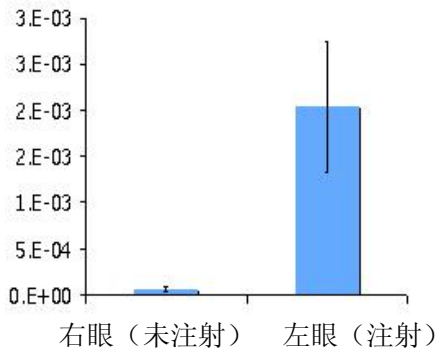


图1 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶后药物到达视网膜情况

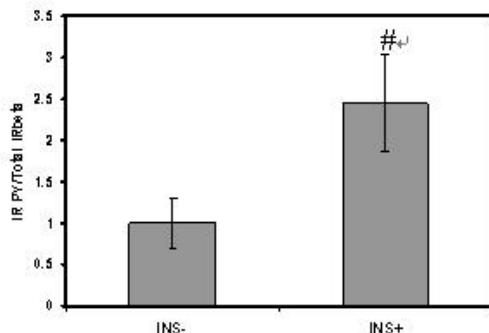


图2 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶后诱导大鼠视网膜胰岛素受体磷酸化

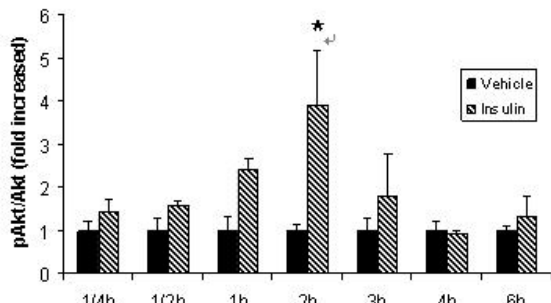


图3 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶后诱导大鼠视网膜蛋白激酶磷酸化

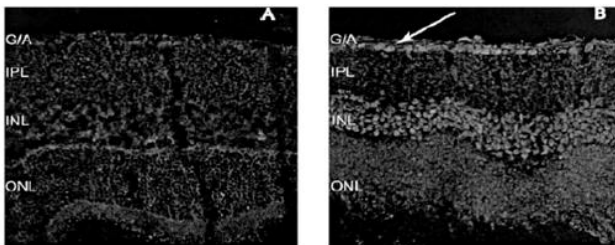


图4 胰岛素刺激神经细胞蛋白激酶磷酸化

表1 结膜下植入负载胰岛素的水凝胶2个月时，2组大鼠血糖水平

组别	例数 (n)	体质量 (g)	血糖 (mmol/L)
观察组	13	421.65±22.13	5.68±0.85
对照组	13	126.77±13.15	21.73±2.36
<i>t</i>		41.30	23.07
<i>P</i>		0.000	0.000

4 讨论

糖尿病视网膜病变可以造成视力不可逆性损害，治疗比较棘手^[3]。临床上根据是否出现视网膜新生血管为判别依据，将其分为增殖性糖尿病性视网膜病变

(PDR) 和非增殖性糖尿病性视网膜病变 (NPDR)。目前国内外对DR的临床研究颇多，但角度迥异，概括起来大致可以分为以下5个方面：(1) 寻找导致DR发生和进展的独立危险因素；(2) 探索快速、经济、便捷的筛检手段以早期发现DR，通过控制危险因素延缓DR的发生和进展；(3) 药物治疗延缓DR的发生和进展；(4) 药物辅助、治疗方法改良或放宽适应证等手段改善视网膜激光光凝和玻璃体切割手术对糖尿病黄斑水肿和晚期DR的治疗效果；(5) 探索DR与全身系统性疾病的关系，建立通过DR预警全身系统性疾病发生的可能性^[4]。

目前激光手术和玻璃体切割术是临床上常用的用来治疗糖尿病性视网膜病变的方法，但是他们具有破坏性而且不能定位糖尿病视网膜病变的潜在生物学。胰岛素作为一种视网膜神经元的存活因子，大剂量高频率胰岛素强化治疗，可降低DR风险。Florys B等^[5]研究发现早期胰岛素强化治疗可以明显降低糖尿病晚期视网膜病变和白内障的发生率；有研究表明严格控制血糖水平可以使视网膜病变的发生和进展下降63%，增殖性糖尿病视网膜病变下降47%^[6]，但是胰岛素治疗DR受限诸多^[7]。全身给药，超剂量胰岛素会引发低血糖；眼结膜下注射，因胰岛素半衰期短所致频繁给药，降低了病人的顺应性^[8]。

STZ诱发的大鼠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的氧自由基，造成β细胞损伤，进而导致血胰岛素下降和血糖升高，形成胰岛素依赖型糖尿病模型，一般通过一次性腹腔注射均达成模标准，成模率达100%^[9]。本研究采用该方法对36只大鼠建立DR模型，成模36只，成模率100%。本研究中采用STZ作为一种化学性诱导剂诱导建立大鼠DR模型，并采用结膜下给药技术，研究结果显示结膜下注射极低剂量胰岛素可经巩膜到达视网膜，诱导视网膜胰岛素受体和蛋白激酶磷酸化，对糖尿病破坏的视网膜神经元有一定的生物活性，与Misra GP等研究结果一致^[10]。此外，笔者认为本研究中结膜下植入负载胰岛素的水凝胶之后，胰岛素缓慢释放长达2个月

负载胰岛素水凝胶结膜下植入在大鼠糖尿病视网膜病变中的应用

的研究结果具有较深远的意义。众所周知,胰岛素是治疗糖尿病的有效药物,临床上一般采用皮下注射,但是胰岛素半衰期较短,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,影响治疗结果。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。结膜下植入水凝胶是一种对病人微创的手术,因为水凝胶可以在体内完全降解因而无需手术切除。

综上所述,结膜下植入负载胰岛素的水凝胶,胰岛素缓慢释放长达2个月,有效的避免血糖波动,维持血糖水平至正常范围,且该水凝胶在体内完全降解,无需手术切除。但是目前该项研究尚处于实验室的动物模型研究,尚未用于临床,尚需更深更进一步的研究,以待可以用于临床。

参考文献

- [1] Zheng YF, He MG, Congdon Nathan. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2012, 60(5): 428-431.
- [2] Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the diabetes control and complications trial[J]. *Ophthalmol*, 1995, 102: 647-661.
- [3] 邢薇,董志军,张铁民. 糖尿病视网膜病变发病机制的研究进展[J]. *中国实用眼科杂志*, 2014, 32(6): 675-678.
- [4] 李筱荣,刘巨平. 认识糖尿病视网膜病变临床研究热点难点,探索优化未来临床研究方向[J]. *中华眼底病杂志*, 2014, 30(2):121-123.
- [5] Florys B. Prevalence of chronic diabetes complications depending on the method of insulin therapy in children and adolescents with type1 diabetes[J]. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw*, 2004, 10(1): 31-39.
- [6] Genuth S. Insights from the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study on the use of intensive glycemic treatment to reduce the risk of complications of type 1 diabetes[J]. *EndocrPract*, 2006, 12(1): 34-41.
- [7] 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.
- [8] Reiter CE, Sandrasegarane 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.
- [9] 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.
- [10] Misra GP, Singh RS, Aleman TS, et al. Subconjunctivally implantable hydrogels with degradable and thermoresponsive properties for sustained release of insulin to the retina[J]. *Biomaterials* 2009, 30(33): 6541-6547.