

氧诱导视网膜新生血管小鼠模型的建立与特点

胡金芳^{1,2}, 刘兆凤², 霍璇¹, 林锦镛³, 申秀萍¹

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193

3. 天津市眼科医院, 天津 300020

摘要:目的 建立可靠稳定的视网膜新生血管动物模型, 为探究视网膜新生血管疾病的发生机制和治疗方法奠定模型基础。

方法 通过建立氧诱导视网膜新生血管小鼠模型, 采用 ADP 酶染色和视网膜连续切片法, 定量评估视网膜新生血管生成情况。

结果 模型组小鼠左眼球 ADP 酶染色结果显示, 视乳头周围可见大片无灌注区, 并见血管迂曲、扩张、变形, 视网膜周边部可见大量新生血管生成; 右眼球连续切片发现模型组小鼠有许多明显的血管内皮细胞核突破内界膜, 并且内界膜下的细胞增殖, 排列紊乱, 并见视网膜表面或视网膜前有新生血管芽。**结论** 成功建立氧诱导视网膜新生血管小鼠模型, 并且可作为探究视网膜新生血管疾病发生机制和治疗方法的可靠动物模型。

关键词: 氧; ADP 酶染色; 血管内皮细胞; 视网膜新生血管

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)05-0353-03

Establishment and feature of oxygen-induced retinal neovascularization model

HU Jin-fang^{1,2}, LIU Zhao-feng², HUO Xuan¹, LIN Jin-yong³, SHEN Xiu-ping¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To establish a stable and reliable animal model of retinal neovascularization and to provide a model foundation for further investigation on its mechanism and treatment. **Methods** Oxygen-induced retina new vessels mouse model were established, and retinal neovascularization was evaluated by ADPase staining and retina sect serial sections. **Results** ADPase staining showed a pattern of pathological retinal neovascularization such as non-perfused areas, tortuous, dilated blood vessels and deformation in discus opticus of model mice, and retinal neovascularization in retina perimeter. The serial HE staining sections confirmed many conspicuous vascular endothelial cell breakthrough internal limiting membrane, cell proliferation, rank disorder, new vascular bud in retinal surface. **Conclusion** The oxygen-induced retinal neovascularization mouse model is successfully set up, which could be a reproducible model for the research of mechanism and treatment of retinal neovascularization.

Key words: oxygen; ADPase staining; vascular endothelial cell; retinal neovascularization

视网膜新生血管性疾病包括糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜静脉阻塞等, 是引起视功能丧失的主要原因, 对此类致盲性眼病临床上尚无理想的治疗方法, 更缺乏早期预防和干预的有效手段。此类疾病共同的病理改变是视网膜组织缺氧, 视网膜微循环结构损害而导致血管内皮细胞增生、基底膜增厚, 随之新生血管形成。因此如何预防视网膜新生血管生成并安全有效地治疗已经形成的视网膜新生血管, 是近年来研究热点。目前对视网膜病变的发生机制尚未完全阐明, 用于视网膜

病变研究的动物模型的建立耗时长、成本高, 不利于该类药物的早期筛选研究, 因此建立可靠稳定的视网膜新生血管动物模型, 可为探究视网膜新生血管疾病的发生机制和治疗方法奠定模型基础。

本研究建立视网膜新生血管动物模型, 研究视网膜新生血管形成的机制, 为今后研究该类药物奠定基础。小鼠处于高浓度氧环境后, 视网膜中央产生大量的无血管区, 血管收缩, 因此回到普通空气, 也就是相对的低氧环境中后, 大量的无血管区造成视网膜缺氧, 视网膜产生大量的新生血管。此模型

收稿日期: 2011-07-05

作者简介: 胡金芳 (1980—), 女, 助理研究员, 主要从事药理、毒理学研究。Tel: (022)84845247 E-mail: hujf@tjipr.com

制作周期短,且能产生典型的视网膜新生血管,是理想的模拟视网膜新生血管疾病的动物模型。为探究视网膜新生血管性疾病的发病机制和治疗方法,建立具有相似典型病理特征并且重复性高的动物模型是保证后期研究工作结果客观可靠的前提条件。

1 材料

1.1 试剂

Tris(批号 20070611,天津市博迪化工有限公司),NaOH(批号 20100801,天津市凯信化学工业有限公司),ADP Na₂(批号 A2754, Sigma 公司),马来酸(批号 20061226)、硝酸铅(批号 20110104)、氯化镁(20080920)由天津市光复精细化工研究所生产。

1.2 动物

C₅₇BL/6J 乳鼠(SPF级,北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证 SCXK(京)2009-0004,动物质量合格证号 0209896、0212225)饲养在有中央空调的观察室(津实设施准第 012 号,符合屏障级标准)中,小鼠饲料为天津市华荣实验动物科技有限公司提供,饮纯净水。

1.3 仪器

Olympus BH—2 普通光学显微镜、Olympus DP71 病理显微摄影仪(日本奥林巴斯光学工业株式会社),EG—1150H+C 组织石蜡包埋机(德国 Leica),VIP5J—F2 全封闭组织脱水机、IVS—410 推拉式切片机、DRS—2000J—D2 自动染色装置、Las—J2 自动封片机均购自日本樱花检验仪器株式会社。

2 方法

2.1 视网膜新生血管小鼠模型的建立^[1-2]

模型组取 2 窝 10 只 C₅₇BL/6J 幼鼠,2 d 龄时合笼饲养,7 d 龄时由 1 只母鼠和幼鼠进入氧箱,另一只母鼠放在正常室内空气中饲养。饲养期间氧气的体积流量控制为 0.50~0.75 L/min,容器内氧气体积分数为(75±2)%,每天打开氧箱更换垫料、加食、换水、替换母鼠。用测氧仪间断监测容器内的氧浓度,每天 4~6 次,室温控制在(23±2)℃,在此高氧环境中饲养 5 d,5 d 后(即 12 d 龄)将幼鼠放回正常空气环境中,以诱导小鼠视网膜新生血管产生,由 2 只母鼠共同喂养。对照组 2 窝 10 只幼鼠在正常空气环境下生长,室温控制在(23±2)℃。

2.2 心脏灌注、取材

于 17 d 龄时,ip 注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻

醉,打开小鼠胸腔,于左心室灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛各 1 mL,然后立即摘取眼球,左右眼球分别置于 4% 多聚甲醛中固定,4℃ 保存。

2.3 左眼球视网膜铺片、ADP 酶血管染色^[3-4]

将固定过的左眼球,流水冲洗,在解剖显微镜下去除角膜、晶状体、玻璃体后,将视网膜小心分离下来置于玻璃皿上,用毛笔刷除视网膜表面的色素,以视乳头为中心放射状对称切为 4 片,按照 ADP 酶染色的方法对视网膜铺片进行染色。将视网膜铺片用 Tris-马来酸缓冲液(0.5 mol/L, pH 7.2)冲洗 5 次,每次 15 min;于 37℃ 孵育液(0.2 mol/L, pH 7.2 的 Tris-马来酸缓冲液中加入 3 mmol/L 硝酸铅、6 mmol/L 氯化镁、1 mg/mL ADP)中反应 15 min;Tris-马来酸缓冲液(0.5 mol/L, pH 7.2)冲洗 5 次,每次 15 min;10% 硫化铵显色反应 5 min;Tris-马来酸缓冲液(0.5 mol/L, pH 7.2)冲洗 5 次,每次 15 min;甘油缓冲液封片,将铺片置显微镜下观察并摄片,采用 Image-Pro® Plus (IPP) 图像分析软件对图片血管进行分析。

2.4 右眼球连续切片、HE 染色

将固定过的右眼球,常规脱水、透明、浸蜡,石蜡包埋,矢状面平行视神经进行连续切片(去掉有视神经的切面),片厚 5 μm,每片相隔 30 μm,每只眼球选取 10 个切片。常规脱蜡后进行切片 HE 染色,于高倍镜下观察切片中突破内界膜(inner limiting membrane, ILM)的血管内皮细胞核的情况,并计数。计数血管内皮细胞核时仅计数与内界膜有紧密联系的血管内皮细胞核,不包括玻璃体腔内其他与内界膜无联系的血管内皮细胞核。

2.5 数据处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理为 *t* 检验。

3 结果

3.1 左眼球视网膜铺片、ADP 酶血管染色

结果显示,正常对照组视网膜血管以视盘为中心呈放射状排列直至周边,末梢分支变细与侧支分出的毛细血管相互吻合,形成密集的毛细血管网,走行自然,分布均匀,呈两层分布,无血管闭塞,而模型组视乳头周围可见大片无灌注区,并见血管迂曲、扩张、变形,视网膜周边部可见大量的新生血管生成(图 1),对照组和模型组的图片血管累积光密度值(IOD)分别为(3.5±1.5)×10⁴和(15.5±6.2)×10⁴(*P*<0.001),表明模型组新生血管形成。

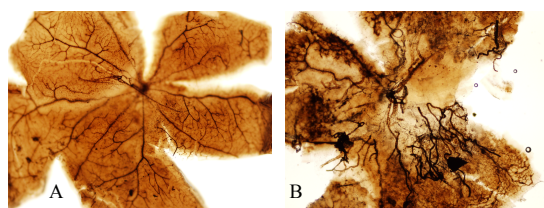


图1 对照组(A)和模型组(B)的视网膜血管形态

Fig. 1 Retina blood vessel forms of control group (A) and model group (B)

3.2 右眼球连续切片、HE 染色

结果显示,突破内界膜的血管内皮细胞核数对照组和模型组分别为 0 和 (21.2 ± 12.5) 个 ($P < 0.001$)。正常组小鼠视网膜内界膜平整,视网膜结构清楚,表面光滑,未见血管内皮细胞核突入玻璃体腔,而模型组小鼠有许多明显的血管内皮细胞核突破内界膜,并且内界膜下的细胞增殖,排列紊乱,并见视网膜表面或视网膜前有新生血管芽(图2)。

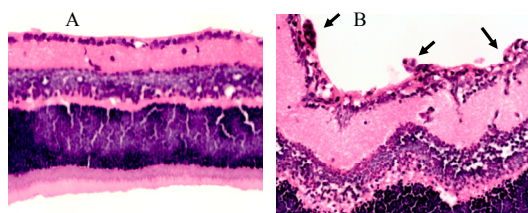


图2 对照组(A)和模型组(B)的视网膜结构

Fig. 2 Retina structures of control group (A) and model group (B)

4 讨论

本研究建立氧诱导新生血管小鼠模型,采用ADP 酶染色和连续切片法定量评估视网膜新生血管,观察到视网膜出现无灌注区和新生血管形成,此模型可作为探究视网膜新生血管疾病发生机制和治疗方法的可靠动物模型。

可靠的动物模型及适宜的观察评价方法是进行视网膜新生血管性疾病防治研究的基础,本实验选择 C57BL/6J 新生小鼠作为研究视网膜新生血管的动物模型的原因为:(1)正常小鼠的视网膜血管在出生后才开始发育,类似于人类早产儿视网膜血管的发育过程;(2)生后第7天新生小鼠玻璃体动脉退化的程度最大,视网膜血管发育的程度最小,暴露于75%高氧中5 d后,可产生能定量研究的视网膜新生血管,且该方法重复性极高;(3)用该方法新生血管发生率可以达到100%,有利于进行视网

膜新生血管治疗方面的研究。

小鼠视网膜铺片被广泛应用于视网膜血管的形态学研究,目前视网膜铺片的制作方法主要有3种:(1)墨汁和伊文思蓝灌注法;(2)高分子荧光素右旋糖苷灌注法;(3)ADP 酶染色法。其中墨汁灌注法和高相对分子质量荧光素右旋糖苷灌注法在灌注过程中容易压力过大,引起血管破裂,从而发生血管渗漏的假阳性结果^[5]。本实验采用ADP 酶染色法,能显示所有血管,包括新生血管丛,同时左右眼球可以用两种方法进行评估,节约成本,更适宜于研究新生血管形成的发病机制及其抑制剂在治疗视网膜新生血管中的作用。

本研究采用两种定量评估视网膜新生血管的方法,其中计数视网膜组织切片中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目是进行定量研究的金标准,能够客观评价该模型新生血管生成情况,视网膜内界膜在正常情况下均匀一致而无特殊结构及细胞,视网膜血管位于内界膜下,不会突破内界膜,而病理状态下的新生血管会突破内界膜位于视网膜表面。目前国内外都以计数视网膜组织切片中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数作为进行定量研究的标准。苏木素-伊红染色可很好地显示视网膜内界膜及突破内界膜的血管内皮细胞核,且方法简便易行,通过计数视网膜组织切片中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数可反映视网膜新生血管的增生情况。

参考文献

- [1] 刘爱华, 张红, 孙靖, 等. 氧诱导视网膜病变小鼠模型新生血管变化规律及 VEGF 的动态表达 [J]. 眼科新进展, 2009, 29(12): 899-903.
- [2] Smith L E, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35: 101-111.
- [3] 左玲, 栾永昕, 裴颖, 等. 血管内皮生长因子受体 KDR 基因胞外段 1-3 区基因转染抑制氧诱导小鼠视网膜新生血管的研究 [J]. 中华眼科杂志, 2011, 47(5): 398-403.
- [4] 孔祥梅, 孙兴怀, 俞道义, 等. 眼科常用实验动物视网膜血管的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(6): 416-418.
- [5] 孟丽娜, 董晓光, 王晔, 等. 血管内皮抑素蛋白抑制小鼠视网膜新生血管的研究 [J]. 中华眼科杂志, 2010, 46(7): 646-648.