

论著

高浓度氧诱导增殖性视网膜病变动物模型的构建及判断

邓德勇¹, 韩丽荣², 吴丹巍³, 夏风华², 彭亚军⁴, 孔屹⁴

(1. 武警浙江总队医院眼科, 浙江嘉兴 314000; 2. 上海和平眼科医院, 上海 201104; 3. 上海中医药大学附属岳阳医院眼科, 上海 200003; 4. 第二军医大学附属长海医院眼科, 上海 210003)

摘要: 【目的】探讨一种经济实用的增殖性视网膜病变动物模型的构建及判断方法。【方法】将鼠龄为 2 d 的 SD 幼鼠 20 只随机分为对照组和实验组, 实验组动物置于 80 % 高浓度氧环境中饲养 10 d 后转至自然空气中继续饲养, 而对照组动物则一直置于自然空气中饲养。在鼠龄 20 d 时无痛处死幼鼠, 取眼球作病理切片, 计数其视网膜新生血管芽细胞核, 比较分析其结果。【结果】实验组视网膜新生血管芽细胞核数目达到 (191.1 ± 15.7) 个, 远远高于对照组的 (37.2 ± 23.5) 个, 二者存在着非常显著的差别 ($P < 0.01$)。【结论】高浓度氧能短时间内有效诱导 SD 新生幼鼠视网膜新血管芽的生长, 成功构建增殖性视网膜病变动物模型; 病理组织切片是一个经济有效的判断增殖性视网膜病变动物模型构建成功与否的方法。

关键词: 新生血管; 增殖性视网膜病变; 疾病模型; 动物

【文章编号】 1008-5041(2004)05-0383-03 **【中图分类号】** R774.1 **【文献标识码】** A

Build and evaluation of the oxygen-induced proliferative retinopathy models

Deng De-yong, Han Li-rong, Wu Dan-wei, Xia Feng-hua, Peng Ya-Jun, Kong Yi (Department of Ophthalmology, Zhejiang Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force, Jiaxing 314000, China)

Abstract: 【Objective】To explore economical and useful measures to build and evaluate proliferative retinopathy model.

【Methods】Twenty postnatal 2 days SD newborn rats were randomized to experimental group and control group. The animals of experimental group were raised in hyperoxic environment for ten days and then to room air for seven days as well as that of control group were in room air all the time. The eyeballs were enucleated and fixed by formaldehyde at postnatal 20 days and then cross sectioned and stained with hematoxylin and eosin (HE). The nuclei of proliferative retinal vessels were counted through the cross sections. 【Results】The average nuclei of the new vessels of experimental group were statistically higher than that of control group (191.1 ± 15.7) vs (37.2 ± 23.5) . 【Conclusion】Hyperoxia can induce neovascularization successfully in newborn rats and lead to proliferative retinopathy. Pathological cross sections are also effective and economical assessment methods for retinal neovascularization and proliferative retinopathy.

【Key Words】 Neovascularization; Proliferative retinopathy; Disease models; Animal

新生血管增殖性视网膜病变随着糖尿病及心血管疾病发病率的升高而呈增加趋势, 成为危害中青年视力的重要原因, 是目前眼科研究的重要方向和热点。合理而经济实用的动物疾病模型将为此提供有效的研究对象, 有利于进行相关的实验研究和临床治疗研究。本实验以通过采用高浓度混合氧饲养

新生大鼠构建增殖性视网膜病变动物模型, 应用病理组织切片直接计数视网膜新生血管芽细胞核数目, 来判断疾病模型构建的成功与否。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 SD 新生幼鼠: 由中国科学院上海分院实验动物中心提供。

1.1.2 氮氧混合气: 80 % 氧气和 20 % 氮气充分均匀而成, 由上海海军医学研究所高压氧中心提供,

【收稿日期】2004-03-17; 【修回日期】2004-06-18

【作者简介】邓德勇 (1973-), 男, 籍贯江西高安, 硕士, 主要从事增殖性视网膜病变防治的基础与临床研究。

使用前确保静置 48 h 以上。

1.1.3 密闭饲养容器：用于饲养动物，由 100cm × 60cm × 50cm 的鱼缸改造而成，顶盖改为磨砂玻璃，于顶盖上钻两个直径为 2.5 cm 的孔，用带玻璃管的橡皮塞塞住，玻璃管供氧气导入及残余气体排出。

1.1.4 病理切片机及光学显微镜：由上海第二军医大学附属长海医院眼科病理室提供，用于眼球病理标本切片的制作与观察。

1.1.5 硅橡胶：用于保持容器内的干燥。

1.2 实验分组及动物饲养

1.2.1 实验分组：选取鼠龄 2d、带母鼠的 SD 新生幼鼠 20 只，分实验组和对照组。

1.2.2 动物饲养和处理：实验组动物置于密闭饲养容器中，经橡皮塞的玻璃管导入上述氮氧混合气，气体流量为 2.5 L/min，容器中放入足量的食物、水及用以保持容器干燥的硅橡胶。饲养时每日连续供给混合气体 23 h 后将动物置于自然空气环境中饲养 1 h。动物饲养条件：温度（22.0 ± 2.0），湿度保持在（50.0 ± 10.0）% 范围，光照时间为 12.0 h/d，光照强度小于 300 lux。按此法持续饲养 10 d 后将动物移入自然空气环境中继续饲养 1 w；对照组动物一直处于自然空气环境中饲养，饲养条件同上。在鼠龄 20 d 时，乙醚吸入麻醉后处死动物，取眼球制作病理切片。

1.2.3 病理切片的制作与观察：将所取得的幼鼠眼球用 7 号针头于角膜部刺穿一小孔，多聚甲醛固定 24 h，常规病理连续切片，切片厚 6 μm，HE 染色。随机取 30 片经过视神经乳头的连续切片，用光学显微镜观察，寻找突破视网膜内界膜并与内界膜有直接联系的新生血后芽（玻璃体腔中孤立的血管除外），计数其细胞核数。

1.3 结果分析与统计学处理

采用双盲法。实验结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，样本均数采用 *t* 检验作统计学分析。

2 结 果

经高浓度氧处理过的实验组 SD 幼鼠视网膜出现大量的新生血管芽，其细胞核计数高达（191.1 ± 15.7）个，而对照组则未见有明显的新生血管芽生长，大多数眼球表现为无视网膜新生血管生长，

平均细胞核计数仅为（37.2 ± 23.5）个，二者存在着非常显著的差别（ $P < 0.01$ ）。

3 讨 论

增殖性视网膜病变是一组严重的致盲性视网膜病变，包括早产地视网膜病变、糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞及视网膜静脉周围炎等。经济实用又符合增殖性视网膜病变发展规律的动物模型将为广大眼科同仁对增殖性视网膜病变进行更深更广的研究提供可靠的实验对象。

研究表明，尽管增殖性视网膜病变的致病原因多种多样，但都与局部视网膜组织缺血缺氧、促血管生长因子产生过多以及血管内皮细胞和视网膜色素上皮细胞相应受体表达增多密切相关^{1~4}。本研究中实验组 SD 幼鼠视网膜新生血管芽明显多于对照组，表明有明显的视网膜新生血管芽形成，提示高浓度氧饲养后相对的缺氧状态可以引起明显的新生血管形成，动物模型的构建获得成功。此法构建增殖性视网膜病变模型的可能机制是在高浓度氧环境中因氧分压较高而能满足视网膜发育的需要，使得血管的发育延缓。当缺氧时，视网膜组织供氧不足，诱导视网膜色素上皮细胞及血管内皮细胞 VEGF 等血管生长因子的表达，促视网膜血管发育并诱导视网膜新生血管增殖^{5,6}。本动物模型的构建是通过相对的缺氧所引起，符合临床常见增殖性视网膜病变的发病过程。高浓度氧易获得，可以避免药物等其他因素的干扰，同时，构建周期短，可以在相同条件下大批量的构建，有利于消除模型构建条件的差异，使不同实验组间的对照更具可比性。

既往的增殖性视网膜病变动物模型种类较多，有糖尿病视网膜病变动物模型、视网膜静脉阻塞动物模型及早产儿视网膜病变动物模型等。对于糖尿病视网膜病变来说，通过高精饲料饲养或注射 STZ 诱导⁷ 的糖尿病视网膜病变动物模型更为合理，但动物造模周期长，饲养过程中动物死亡率高，费用也非常昂贵。而激光光凝视网膜静脉血管造成的视网膜静脉阻塞模型⁸，与视网膜静脉阻塞患者的疾病发展过程非常类似，是静脉阻塞实验与临床研究的最佳动物模型，因需较大的动物才能施行激光光凝术，而术后需较长时间才能产生视网膜新生血管，使得实验费用大增，不利于大范围实验研究的

开展。另外，激光光凝的程度受很多因素的影响，很难完全保证一致，使实验个体间产生较大的差异。

对于增殖性视网膜病变模型是否构建成功，最为有效的方法是视网膜铺片，直接观察视网膜新生血管的形成并测量视网膜新生血管的长度，但此法使得视网膜标本只能一次使用，不利于进一步研究的开展，如免疫组织化学测定。而文献报道的静脉内注射墨水或荧光素等方法⁹，是能够较好显示视网膜内血管生长情况的方法，荧光素注射法能动态观察视网膜血管变化，有利于动态研究疾病的发展过程，但因此法需要通过裂隙灯等工具观察或照相，需要使用较大的动物（如猪、狗及猫等），而应用墨水者则可能因墨水的存在，使实验结果受到干扰。本研究应用的通过病理组织切片计数视网膜新生血管芽细胞核的方法，可以有效判断有无视网膜新生血管芽形成，明确增殖性视网膜病变动物模型构建是否成功，可以定量分析视网膜新生血管芽情况，可以量化分析药物干预的效果及进行相关的病理研究¹⁰；另外，本法亦有利于同一组标本进行多因素研究，而使实验材料得到充分利用，降低实验成本。但受组织切片技术和染色技术影响较大，可能产生一定的人为干扰。

综上所述，应用高浓度氧造成的相对缺氧能够成功构建SD新生幼鼠增殖性视网膜病变模型，而视网膜组织病理切片计数视网膜新生血管芽细胞核数也是判断增殖性视网膜病变模型的构建成功与否的有效方法。

【参考文献】

1 Thieme H, Aiello LP, Takagi H, et al. Comparative analysis of vas-

- cular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells J. Diabetes, 1995, 44: 98 - 103.
- 2 Pe'er J, Shweiki D, Itin A, et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases J. Lab Invest, 1995, 72: 638 - 645.
- 3 Aiello LP, Avery DL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders J. New Engl J Med, 1994, 331: 1480 - 1487.
- 4 Pierce EA, Avery RL, Foley ED, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization J. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 905 - 909.
- 5 邓德勇、韩丽荣、吴丹巍，等. 血管内皮生长因子反义寡聚脱氧核苷酸对增生性视网膜病变幼鼠血管内皮细胞生长因子表达的影响 J. 中华眼底病杂志, 2003, 19 (3): 172 - 174.
- 6 Lawrence TS, Rehemtulla A, Ng EY, et al. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-flucytosine. Cancer Res, 1998, 58 (11): 2588 - 2593.
- 7 Armstrong D, Al-Awadi F. Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes J. Free Radic Biol Med, 1991, 11 (4): 433 - 436.
- 8 Danis RP, Bingaman DP, Yang Y, et al. Inhibition of preretinal and optic nerve head neovascularization in pigs by intravitreal triamcinolone acetonide J. Ophthalmology, 1996, 103 (12): 2099 - 2144.
- 9 Larrazabal LI, Penn JS. Fluorescein angiography of the newborn rat. Implications in oxygen-induced retinopathy J. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990, 31 (5): 810 - 818.
- 10 Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse J. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35 (1): 101 - 111.

(责任编辑：李宏伟)

关于参考文献类型标识

在参考文著录中，光盘版增加了“文献类型标识”及“载体类型标识”。如下：(1) 文献类型标识：专著 M；期刊 J；论文集 C；学位论文 D；标准 S；报告 R；专利 P；报纸 N；(2) 电子文献类型标识：数据库 DB；计算机程序 CP；电子公告 EB；(3) 电子文献的载体类型及其标识：联机网上数据库 DB/OL；磁带数据库 DB/MT；光盘图书 M/CD；磁盘软件 CR/DK；网上期刊 J/OL；网上电子公告 ED/OL。

(编辑部)