DOI:10.16016/j.2097-0927.202503005

# 一种基于微流控芯片的体外视网膜微血管体系血栓形成模型的建立

邵淑娴[1],王艳美[1],徐艺菡[1],郑佳欣[1],张宇繁[1],刘丹宁[1],李 远[2] [1]重庆医科大学附属第二医院眼科,重庆;[2]重庆医科大学附属永川医院中心实验室,重庆

[摘要] **目的** 构建一种模拟视网膜血管体系空间结构特征和生物活性的内皮化微流控芯片模型,利用该模型进一步构建血栓模型,并将该血栓模型应用于溶栓效果验证。**方法** 采用软光刻加工技术制备具有分叉结构和三级管径的体外眼底微血管网络微流控芯片。在芯片通道内注入人源视网膜血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cells,HRMECs),通过光学显微镜和细胞骨架染色观察不同时间点内皮细胞的铺设密度及形态特征;采用线粒体膜电位荧光探针(5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide,JC-1)和一氧化氮(nitric oxide,NO)染色评估通道内内皮细胞的生物活性,并通过倒置荧光显微镜进行观察;使用数字注射泵模拟人体血液流动,采用2024年3-6月于重庆医科大学附属永川医院献血站10例健康成人献血者的新鲜血液,实验分为健康成人全血组、TNF-α激活内皮细胞+健康成人全血组及TNF-α激活内皮细胞+TNF-α激活全血组(血液均混合钙黄绿素染色剂),各组均设置37.8、11.1、3.5 μL/min 3种入口血液流速。设置生理盐水组与重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant human tissue-type plasminogen activator,rtPA)组,应用内皮化微流控芯片血栓模型验证溶栓效果;采用细胞核染色与NO染色,结合内皮化微流控血栓模型,评估生理盐水与rtPA在不同干预阶段(血栓形成前、血栓形成后及溶栓后)对内皮细胞功能的影响。**结果** 成功构建了三级微流控芯片血管模型,其直径分别为300、200和100 μm;内皮细胞注入培养72 h后,完全覆盖管壁,光学显微镜和细胞骨架染色显示细胞间排列紧密;JC-1和NO染色证实内皮细胞生物活性良好;相同流速下,与全血组比较,TNF-α激活内皮细胞+健康成人全血组与TNF-α激活内皮细胞+TNF-α激活全血组均观察到通道内血栓面积比率明显增加($P<0.001$);且3.5 μL/min流速下TNF-α激活内皮细胞+TNF-α激活全血组血栓面积比率显著高于其余组($P<0.001$);rtPA组的溶栓效果显著强于生理盐水组($P<0.001$),不同干预阶段微流控芯片通道内内皮细胞贴壁良好,血栓形成可造成微流控芯片通道内内皮细胞NO分泌增多($P<0.001$)。**结论** 成功构建具有视网膜血管体系空间结构和生物活性的微流控芯片模型,并应用于视网膜血管血栓形成与药物溶栓效果验证,为视网膜血管血栓类疾病的研究提供体外模型。

[关键词] 微流控芯片;血栓形成;视网膜疾病

[中图法分类号] R319;R364.15;R774.1 [文献标志码] A

# Development of a microfluidic chip-based *in vitro* model of retinal microvasculature and thrombosis therein

SHAO Shuxian[1], WANG Yanmei[1], XU Yihan[1], ZHENG Jiaxin[1], ZHANG Yufan[1], LIU Danning[1], LI Yuan[2] [1]Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing; [2]Central Laboratory, Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To develop an endothelialized microfluidic chip model that simulates the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82070976);重庆市自然科学基金面上项目(CSTC2021JCYJ-MSXMX0211)

[通信作者] 刘丹宁,E-mail:302110@hospital.cqmu.edu.cn

李 远,E-mail:liyuan_1985999@163.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

**引用格式**:邵淑娴,王艳美,徐艺菡,等. 一种基于微流控芯片的体外视网膜微血管体系血栓形成模型的建立[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(11):1199-1207. DOI:10.16016/j.2097-0927.202503005.

**Citation**:SHAO S X, WANG Y M, XU Y H, *et al*. Development of a microfluidic chip-based *in vitro* model of retinal microvasculature and thrombosis therein [J]. J Army Med Univ, 2025, 47(11): 1199-1207. DOI:10.16016/j.2097-0927.202503005.

spatial architecture and bioactivity of retinal vasculature, enabling thrombosis modeling and thrombolytic efficacy validation. **Methods** A tri-level microvascular network chip (300/200/100 μm diameters) with bifurcated architecture was fabricated using soft lithography. Human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs) were perfused into channels, with endothelial coverage monitored *via* phase-contrast microscopy and F-actin staining. Cellular bioactivity was assessed using mitochondrial membrane potential probes (5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide,JC-1) and nitric oxide (NO) quantification. Fresh blood samples from 10 healthy donors (Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, March to June 2024) were perfused with digital injection pump to mimic blood flow in human body into 3 experimental groups: normal whole blood, and TNF-α-activated endothelium+normal blood, TNF-α-activated endothelium+TNF-α-treated blood. Three inlet blood flow rates of 37.8、11.1 and 3.5 μL/min were set in each group. Two experimental groups, normal saline and recombinant human tissue-type plasminogen activator (rtPA), were established using the endothelialized microfluidic thrombosis model to validate thrombolytic efficacy. Endothelial functional impacts were assessed through integrated DAPI/NO staining and thrombosis model analysis across 3 intervention phases: pre-thrombosis, post-thrombosis, and post-thrombolysis. **Results** A tri-level microfluidic vascular model (300/200/100 μm diameters) was successfully constructed. In 72 h after endothelial cell perfusion, complete channel coverage was achieved, with phase-contrast microscopy and F-actin staining confirming confluent cellular alignment. JC-1/NO assays validated preserved endothelial bioactivity. Compared with the whole blood group, both TNF-α-activated endothelium+normal blood and TNF-α-activated endothelium+TNF-α-treated blood groups exhibited significantly increased thrombus occupancy rates at identical flow rates (all $P<0.001$). Notably, TNF-α-activated endothelium+TNF-α-treated blood group demonstrated the highest thrombus ratio at 3.5 μL/min ($P<0.001$). The rtPA group showed superior thrombolytic efficacy versus saline ($P<0.001$). Endothelial monolayer integrity was maintained across intervention phases, with thrombosis triggering significant NO elevation ($P<0.001$). **Conclusion** Our retinal vasculature-mimetic microfluidic model enables precise thrombosis modeling and drug evaluation, providing new methodology for studying retinal vascular occlusive diseases.

[**Key words**] microfluidics; thrombosis; capillaries; retinal disease

Supported by the General Project of National Natural Science Foundation of China (82070976), and the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2021JCYJ-MSXMX0211). Corresponding authors: LIU Danning, E-mail: 302110@hospital.cqmu.edu.cn; LI Yuan, E-mail: liyuan_1985999@163.com.

血栓阻塞是多种视网膜血管类及炎症性疾病的原因及结果,在视网膜动脉阻塞[1]、视网膜静脉阻塞[2-3]、视网膜静脉周围炎[4]等疾病的发生、发展和转归过程中起着关键作用。目前,针对视网膜疾病血栓机制的研究主要依赖于动物实验[5-6]和临床试验研究[7]。其中,动物视网膜血栓模型的构建技术已相对成熟,常用的方法有激光诱导闭塞[8]和血管结扎造模[9]等。然而,由于体内环境的复杂性、种属间生物学差异以及动物个体差异[10]等因素,动物模型在药效物质筛选及其作用机制研究方面存在明显局限性;临床研究则主要聚焦于致病因素分析[11]、抗血栓治疗方案[12]及相关药物[13]的疗效观察。如何在可控条件下精确模拟血栓形成,已成为该领域实验研究的关键科学问题。因此,体外视网膜血管血栓模型的构建为深入探究视网膜血栓性疾病的病因学、病理机制及治疗策略提供了重要的研究平台。

本课题组前期以正常人眼底微动脉网络结构为模型,成功设计并制备出具有体内微血管网络特征的仿生模型[14],相较于常见血管微流控芯片模型[15],在通道的结构以及管径设计上,更接近人眼视网膜血管网络结构。本研究采用课题组前期制备的微流控芯片模型[14],进一步完善其仿生效果,并通过在模型内形成血栓,为视网膜血栓疾病的研究提供新的体外模型和方法学手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane,PDMS)、SYLGARD™184有机硅弹性体固化剂购自美国Dow Corning公司;纤维连接蛋白、硫酸葡聚糖购自北京索莱宝科技有限公司;人源视网膜血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cells,HRMECs)购自香港佰奥森生物医药有限公司;鬼笔环肽、线粒体膜电位荧光探针(5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,

3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide,JC-1)、细胞核染料(DAPI)购自上海碧云天生物技术有限公司;一氧化氮(nitric oxide,NO)检测探针购自上海翌圣生物科技股份有限公司;TNF-α购自上海陶术生物科技有限公司;钙黄绿素购自美国Invitrogen公司;重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant human tissue-type plasminogen activator,rtPA)购自上海勃林格殷格翰药业有限公司。

1.1.2 主要仪器 循环水式多用真空泵购自上海尚普仪器设备有限公司;等离子清洗机购自德国HarrickG公司;RSP01-CS型双向推拉注射泵购自中国嘉善瑞创电子科技有限公司;IX71荧光倒置显微镜购自日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 制备PDMS微血管网络模型微流控芯片

课题组前期采用微流控芯片软光刻工艺,根据健康成人眼底微血管系统图像制备视网膜微血管模型光刻胶阳模[14,16]。将PDMS与固化剂按照质量比10∶1混合均匀后浇注阳模,抽真空去除气泡,60 ℃烘箱固化2 h,取下PDMS微血管网络模型芯片,使用打孔器按照孔位打孔形成液体出入口,等离子处理使芯片与干净的载玻片键合,即获得PDMS微血管网络模型微流控芯片。

1.2.2 内皮化微流控芯片 将微流控模型芯片放置在紫外灯下照射30 min后,使用75%乙醇注入通道内清洗消毒,PBS清洗除去多余乙醇溶液,向微流控芯片通道内注入0.1 mg/mL的纤维连接蛋白,静置2 h后使用无血清培养基冲洗,取呈对数生长的HRMECs,计数得浓度约为1.5×10$^6$个/mL。为增加培养液黏度,降低细胞在微流控芯片通道内的流动速度[17],将HRMECs与4%葡聚糖混合后注入通道,放入细胞培养箱过夜。

为评估内皮细胞在微流控芯片通道内的生长特性,分别在培养24、48和72 h后,通过光学显微镜系统观察细胞形态变化。同时,采用鬼笔环肽染色法对相应时间点的细胞进行固定染色,利用倒置荧光显微镜观察细胞骨架结构的动态变化,从而系统评估内皮细胞在微流控芯片通道内的细胞连接状态。

1.2.3 内皮化的微流控芯片生物活性检测 细胞于微流控芯片通道内生长72 h后,分别使用JC-1染色剂与NO染色剂染色通道内细胞,于倒置荧光显微镜下观察细胞着色情况。

1.2.4 微流控芯片通道内血栓形成 本研究经重庆医科大学附属永川医院临床研究伦理委员会批准(2023年审020号),采用2024年3-6月于重庆医科大学附属永川医院献血站10例健康成人献血者的新鲜血液,并在采血前获得健康成人献血者知情同意。将微流控芯片固定于倒置荧光显微镜载物台上,使用消毒后的聚四氟乙烯管连接数字注射泵与芯片通道入口。设置健康成人全血组(全血组)、TNF-α激活内皮细胞+健康成人全血组(TNF-α内皮+全血组)及TNF-α激活内皮细胞+TNF-α激活全血组(TNF-α内皮+TNF-α全血组);同时,各组血液混合钙黄绿素染色剂,以便于倒置荧光显微镜下进行观察。根据MAUTUIT等[18]研究结果,健康成人视网膜静脉血液流速约为37.8 μL/min,视网膜静脉阻塞患者对侧健康眼与阻塞眼的视网膜静脉血液流速约为11.07 μL/min与3.51 μL/min;为更好地模拟生理及病理状态下视网膜血管内血液的流动,本研究使用数字注射泵设置入口流速为37.8、11.1、3.5 μL/min,于倒置荧光显微镜下观察不同分组与不同入口流速下血栓的形成。使用Image J软件对血栓面积比率(血栓面积比率=血栓面积/通道面积×100%)进行计算,对相同流速下不同组间进行对比分析。

1.2.5 微流控芯片血栓模型的应用 选取形成血栓的内皮化微流控芯片,于倒置荧光显微镜下观察芯片通道内血栓形态,应用3.5 μL/min流速分别向通道内注入生理盐水、rtPA,于1 h后在微流控芯片出口处收集流出的生理盐水、rtPA溶液,使用酶标仪测量溶液在575 nm处吸光度[*OD*(575)]值;无菌的PBS溶液轻轻冲洗多余生理盐水、rtPA,再次于倒置荧光显微镜下观察血栓形态,使用Image J软件计算溶栓前后血栓面积变化,根据公式:血栓面积变化率=(溶栓前血栓面积比率-溶栓后血栓面积比率)/溶栓前血栓面积比率,分析2组溶栓效果。

1.2.6 溶栓前后模型通道内内皮形态和活性检测

使用DAPI染色剂分别对生理盐水与rtPA组血栓形成前、血栓形成后与溶栓后进行细胞核染色,观察血栓形成过程与溶栓行为对内皮化微流控芯片通道内细胞黏附状态的影响;NO染色剂分别对生理盐水与rtPA组血栓形成前、血栓形成后与溶栓后进行染色,基于Image J软件对荧光强度进行定量分析,GraphPad Prism 10.0采用双因素方差分析对血栓形成与溶栓过程对内皮细胞功能的影响进行统计分析(行因素:不同组别对NO生成水平的影响;列因素:不同节点对NO生成水平的影响;交互因素:不同组别在不同节点对NO生成水平的影响),系统评估干预措施对内皮细胞功能的影响。

1.3 统计学分析

本研究中分析了血栓面积比率、血栓面积变化率

与荧光染色强度等指标。采用GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用双因素方差分析，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　成功构建模拟视网膜三级血管网络的PDMS微流控芯片模型

基于健康成人眼底微血管系统图像分析(图1A)，本研究设计并绘制了体外微血管网络模型微流控芯片示意图(图1B)。在制备工艺上，采用微流控芯片软光刻技术，以生物相容性优异的PDMS为基质材料，成功制备出PDMS微血管网络模型微流控芯片(图1C)，该芯片精确模拟了健康成人眼底微血管系统的主要拓扑结构，并根据血管直径特征将其划分为3级：a级(300 μm)、b级(200 μm)和c级(100 μm)。芯片设计采用渐进式分级结构，入口处直径为300 μm，沿流动方向逐渐递减，至出口处降至100 μm，这一设计充分模拟了生理状态下微血管网络的形态学特征。

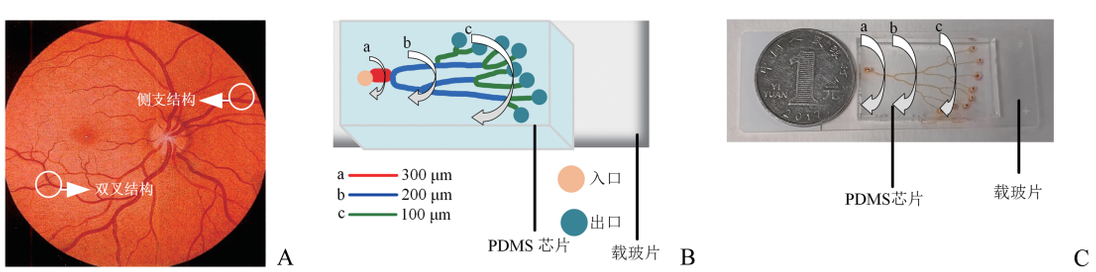
### 2.2　成功构建模拟眼底视网膜血管生物活性的微流控芯片内皮化模型

为更好地模拟眼底微血管网络的生物活性，本研究将HRMECs注入微流控芯片通道内，观察其在通道内的生长。结果显示，接种24 h后，细胞已成功贴附于通道内壁并开始增殖(图2A)；至48 h，细胞数量显著增加，呈现出活跃的生长状态(图2B)；培养72 h后，细胞已完全覆盖微流控芯片通道内壁，形成致密且均匀的单层结构(图2C)。以上结果表明，HRMECs在微流控通道内具有良好的增殖能力和贴壁生长特性，为后续构建功能性视网膜微血管模型奠定了细胞学基础。

倒置荧光显微镜下鬼笔环肽染色观察通道内细胞不同生长时期细胞的骨架结构，结果显示：细胞在通道内生长24 h后，分布相对稀疏，细胞间存在明显间隙(图3A)；培养至48 h，细胞数量显著增加，细胞间连接更加紧密，但仍可见局部间隙(图3B)；至72 h，细胞在通道内形成均匀致密的单层结构，细胞间建立稳定的连接(图3C)。以上观察结果直观地展示了HRMECs在微流控通道内随时间推移逐步形成完整内皮层的动态过程。

### 2.3　微流控芯片具有生物活性

为验证内皮化后的微流控芯片具有生物活性，采取JC-1染色与NO检测探针染色的方式进行评估。微流控芯片通道内的JC-1染色结果显示，细胞呈现高线粒体膜电位状态，表明线粒体功能正常，细胞维持良好的生理活性(图4A)；而JC-1染色未见明显绿色荧光，无明显细胞损伤现象(图4B)；同时，NO染色检测显示微弱绿色荧光信号，表明细胞处于正常生理状态，产生少量的NO(图4C)。以上实验数据证实，内皮化的微流控芯片能够有效模拟微血管网络的生物学特性。




a：示通道直径300 μm，b：示通道直径200 μm，c：示通道直径100 μm

A：健康成人眼底微血管系统；B：PDMS微血管网络模型微流控芯片示意图；C：PDMS微血管网络模型微流控芯片成品图

**图1　基于眼底血管分级结构构建PDMS视网膜血管三级网络微流控通道**

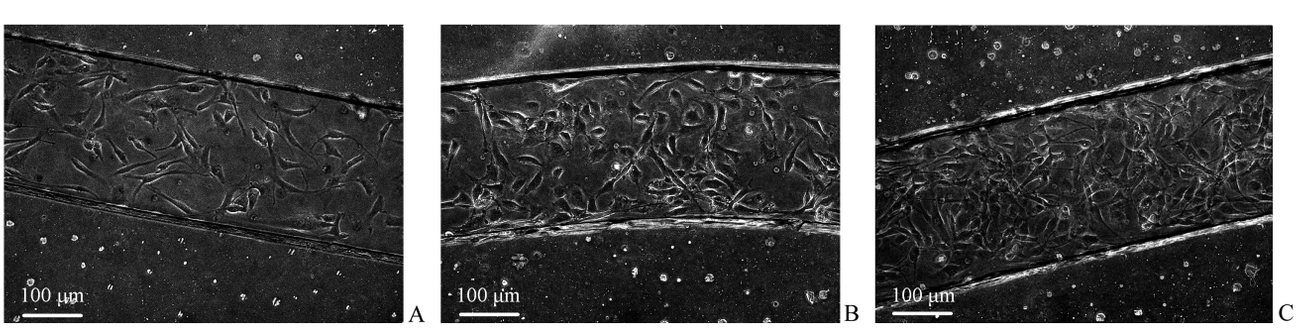



**图2　光学显微镜下HRMECs在微流控芯片通道内24 h(A)、48 h(B)和72 h(C)后细胞形成态图**

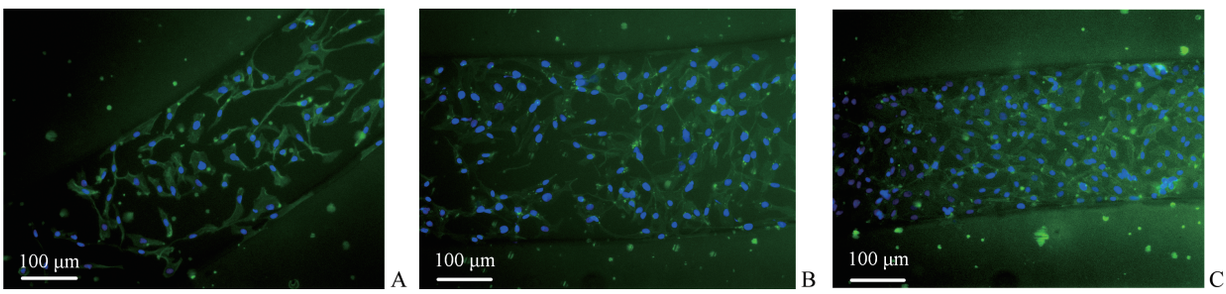
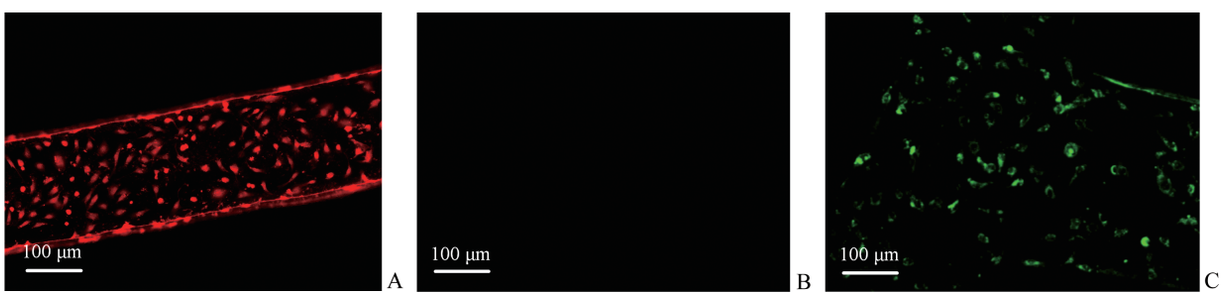



**图3 倒置荧光显微镜下HRMECs在微流控芯片通道内24 h(A)、48 h(B)和72 h(C)后骨架染色结果**




A:微流控芯片通道内细胞JC-1染色 红色荧光:示细胞健康状态;B:微流控芯片通道内细胞JC-1染色;C:微流控芯片通道内细胞NO染色

**图4 内皮化后的微流控芯片通道生物活性检测**

### 2.4 微流控芯片通道内血栓形成

微流控平台操作装置示意图如图5A所示。将各组混合钙黄绿素染色剂的血液通过数字注射泵设置不同流速注入内皮化的微流控芯片通道内,于倒置荧光显微镜下观察血栓形成过程。

倒置荧光显微镜下观察观察在不同实验条件下形成的血栓形态、大小。全血组在病理流速下可见少量血栓形成;TNF-α内皮+全血组及TNF-α内皮+TNF-α全血组在不同入口流速下均有血栓形成(图5B)。Image J分析血栓面积,结果显示:TNF-α内皮+全血组与TNF-α内皮+TNF-α全血组,在不同流速下均有血栓形成;相同流速下,TNF-α内皮+TNF-α全血组比其余2组血栓面积比率更加显著[交互作用:$F(4,18)=44.68$,$P<0.001$;行因素:$F(2,18)=140.20$,$P<0.001$;列因素:$F(2,18)=85.04$,$P<0.001$,图5C];同时,根据TNF-α内皮+TNF-α全血组在不同流速下形成的血栓面积比率,可得3.5 μL/min流速下,该组的血栓面积比率更显著[$F(2,6)=1\,535$,$P<0.001$,图5D]。提示通道内血栓的形成与炎症因子刺激通道内细胞及通道内血液流速密切相关。

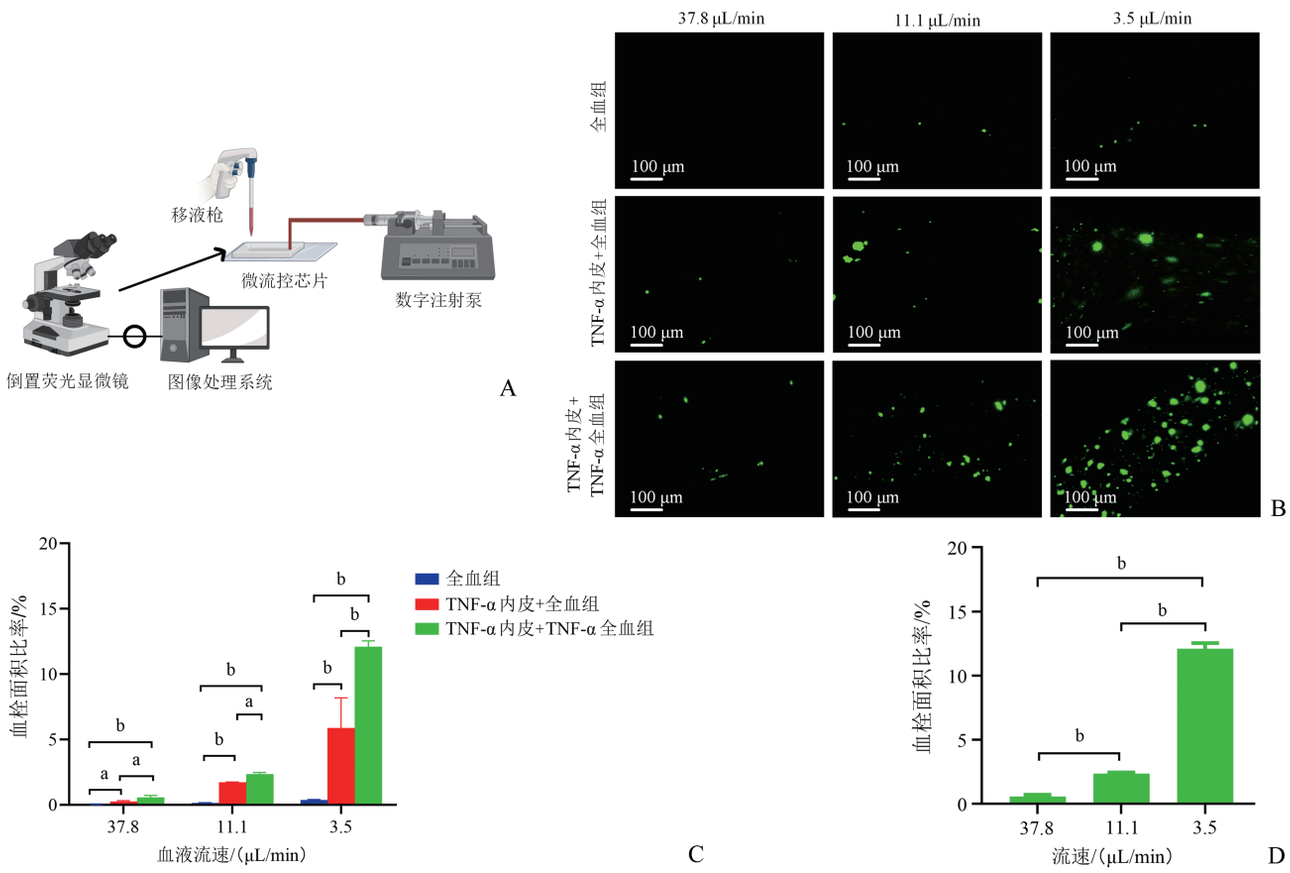
### 2.5 微流控芯片血栓模型可用于溶栓药物研究

基于成人视网膜血管结构特征构建的内皮化微流控芯片血栓模型可用于溶栓效果研究。生理盐水组中,溶栓干预前后血栓形态学特征未呈现显著改变(图6A);相比之下,rtPA组表现出明显的血栓溶解效应,溶栓后血栓结构呈现显著体积缩减(图6B);通过Image J软件对血栓面积变化进行定量分析,结果表明,rtPA组的血栓面积减少率显著高于生理盐水组[$F(2,2)=1\,043$,$P<0.001$],证实其具有更优的溶栓效果(图6C);rtPA测得吸光度值显著高于生理盐水组[$F(2,2)=1.71$,$P<0.001$],表明该模型成功验证rtPA溶栓效果强于生理盐水(图6D)。综上可知,微流控芯片血栓模型可应用于相关视网膜血管血栓疾病的溶栓药物研究。

### 2.6 溶栓前后芯片生物活性

通过DAPI染色评估血栓形成及溶栓过程对微流控芯片内皮化通道内细胞黏附状态的影响。结果显示:生理盐水组在血栓形成前、血栓形成后/溶栓前与溶栓后3个时间节点均未观察到显著细胞核缺失现象(图7A),提示血栓形成过程与溶栓操作未引起内皮细胞脱离微流控芯片;rtPA干预组亦呈现相似趋势(图7B),表明溶栓药物rtPA未加剧细胞脱壁风险。

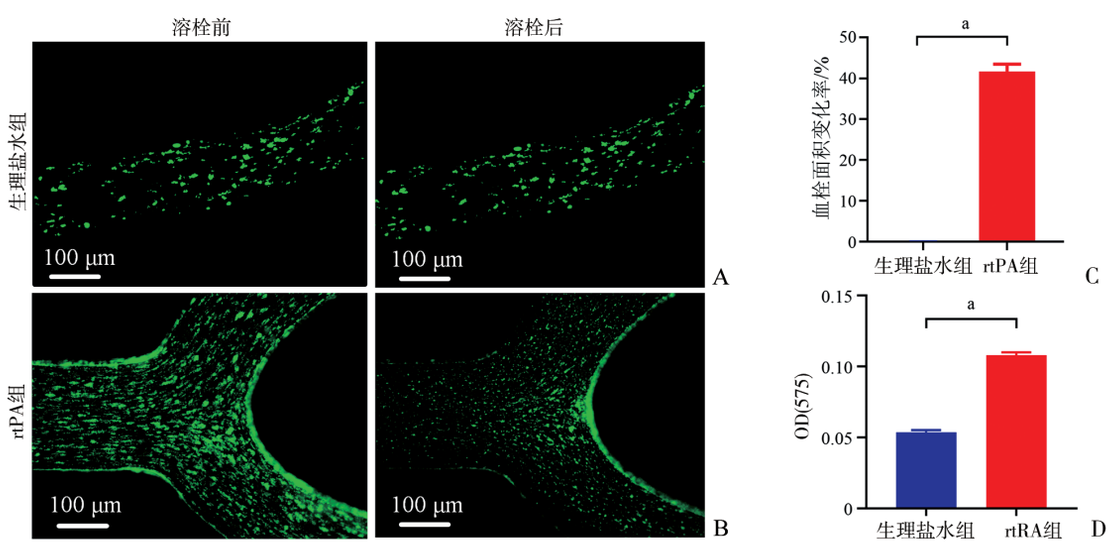
进一步通过NO荧光探针检测NO生成水平发现,血栓形成后微流控通道内荧光强度较血栓形成前显著增强[交互作用:$F(2,12)=0.28$,$P>0.05$;行因素:$F(1,12)=0.21$,$P>0.05$;列因素:$F(2,12)=281.30$,$P<0.001$,图7C],提示内皮细胞在血栓应激状态下NO分泌水平急剧升高,表明溶栓操作未诱发持续性NO分泌异常。提示本研究构建的内皮化微流控血栓模型可用于溶栓药物效果评估及内皮细胞功能机制研究。




a:$P$<0.01,b:$P$<0.001

A:微流控芯片操作装置示意图;B:倒置荧光显微镜下观察3组在不同条件下形成的血栓;C:3组不同流速下形成的血栓面积比率对比;D:TNF-α内皮+TNF-α全血组不同流速下形成血栓面积比率

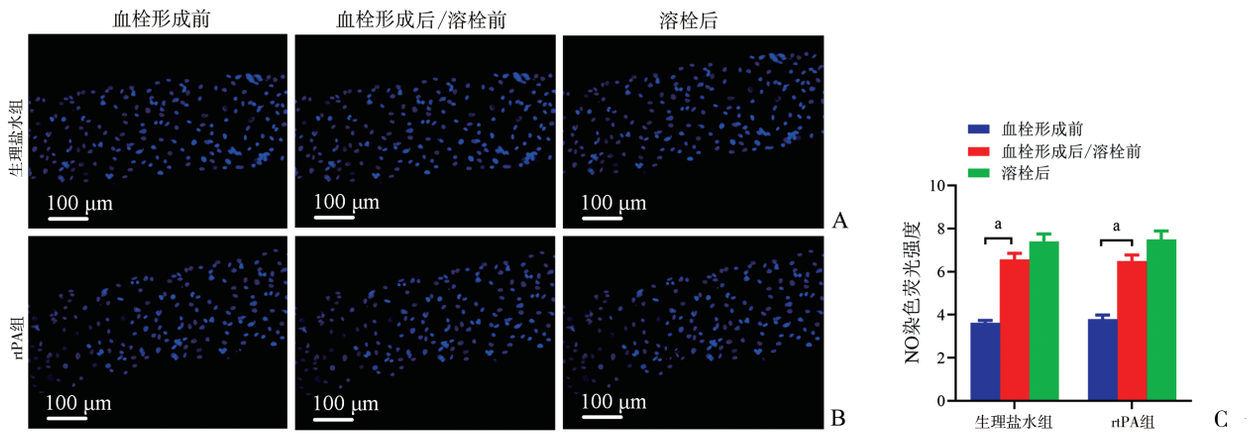
**图5 微流控芯片通道内血栓形成**




a:$P$<0.001

A:生理盐水溶栓前和溶栓后微流控芯片通道内血栓形态;B:rtPA溶栓前和溶栓后微流控芯片通道内血栓形态;C:生理盐水与rtPA血栓面积变化率相比较;D:生理盐水与rtPA溶栓后收集液在575 nm处吸光度值

**图6 内皮化微流控芯片血栓模型内溶栓**




A、B:生理盐水组和rtPA组在微流控芯片通道内血栓形成前、血栓形成后/溶栓前以及溶栓后DAPI染色细胞核;C:生理盐水组与rtPA组分别在内皮化微流控芯片通道血栓形成前、血栓形成后/溶栓前以及溶栓后NO染色荧光强度对比 a:$P<0.001$

**图7 内皮化微流控芯片血栓形成前、后与溶栓前、后的生物活性评估**

## 3 讨论

本研究应用微流控加工技术,以生物相容性优异的PDMS为基质材料,成功构建了模拟健康成人视网膜血管系统三级网络结构的微流控芯片,并通过在内壁铺设HRMECs,模拟视网膜微血管的管壁结构和生物活性。通过控制血液流速与应用TNF-α刺激,成功诱导内皮化微流控芯片通道内血栓形成,并验证了在此血栓模型中进行溶栓药物研究的可行性。为视网膜微血管结构与功能研究,以及视网膜血管血栓形成与溶栓治疗机制研究提供了重要的体外实验平台。

### 3.1 内皮化微流控芯片血栓模型的构建

本研究构建了300、200与100 μm三级视网膜血管体外管径,充分考虑到视网膜血管直径的生理和病理变化特征。生理状态下视网膜中央动脉当量与视网膜中央静脉当量一般分别约为165.45、238.66 μm[19];病理状态下,血管直径可发生缩小或扩张[20]。本研究通过观察微流控芯片通道内细胞形态和细胞骨架,得出结论:HRMECs在注入微流控芯片通道72 h后可形成连续且紧密排列的内皮层,这一发现与ESCH等[21]研究结果相一致。

为评估内皮细胞的生理状态,本研究采用JC-1染色法检测线粒体膜电位[22],并通过NO染色评估细胞代谢。JC-1染色可通过细胞的线粒体膜电位变化,推断细胞的健康状态:细胞处于健康状态时,线粒体膜电位较高,JC-1在线粒体内聚集形成J-聚集体,发出红色荧光;细胞处于凋亡或损伤状态时,线粒体膜电位降低,JC-1染料以单体形式存在,发出绿色荧光。NO染色结果反映血管内皮细胞的功能状态[23]:正常生理状态下,内皮细胞中的NO水平较低,荧光强度较弱;而在病理状态下,如内皮细胞凋亡时,NO水平升高,荧光强度增加[24]。结果显示,正常细胞呈现高线粒体膜电位状态,同时NO维持在较低水平,荧光信号强度较弱,表明内皮细胞在微流控芯片通道内保持良好的生理状态和生物活性,证实该模型能够有效模拟具有生物活性的视网膜血管系统。

本研究证实炎症因子TNF-α具有诱导血栓形成的能力,这与TSAI等[25]的研究结果一致。进一步研究观察到TNF-α内皮+TNF-α全血组在血液流速为3.5 μL/min时,微流控芯片通道内血栓面积比率显著高于其余各组。TNF-α可诱导HRMECs功能障碍,导致血小板聚集和黏附能力增强[26]。当内皮细胞受到TNF-α激活时,内皮损伤胶原纤维暴露,激活血小板和凝血因子,启动凝血级联反应,微流控通道内血栓形成。

### 3.2 内皮化微流控芯片血栓模型的应用与局限性

本研究通过内皮化微流控血栓模型揭示了血栓形成与rtPA溶栓过程对内皮细胞黏附特性及NO分泌功能的影响。血栓形成虽未造成内皮细胞结构性脱落(DAPI染色无核缺失),但显著激活了NO的应激性分泌。内皮细胞在受到炎症因子刺激时,激活内皮型NO合酶途径快速释放NO,维持血管舒张并抑制血小板过度活化[27]。因此,本课题组猜测本研究中血栓形成后NO的显著升高与诱导血栓形成过程中TNF-α的应用相关。内皮细胞是构成血管内壁的一层特殊细胞,在维持血管稳态、调节血管张力、控制物质交换、参与免疫反应以及防止血栓形成等方面发挥着关键作用[28]。与内皮化微流控芯片模型相比,单纯细胞模型无法提供动态的流体环境和精确的微环境控制,在

模拟真实生理条件方面存在较大局限性[29]。综上所述,本研究构建的内皮化微流控芯片模型能够真实模拟体内视网膜血管系统的真实结构和功能,从而实现相关疾病的病理生理机制研究。

与QIU等[30]构建的微流控芯片血管模型相比,本研究构建的微流控芯片模型能够更准确地模拟视网膜血管结构;同时,HREMCs的应用,使微流控芯片模型具备了一定的生物活性。

综上所述,本研究成功构建了具有生物活性的三级视网膜血管微流控芯片模型,并通过炎症因子刺激和血流动力学调控成功制备内皮化微流控血栓模型,经验证可用于体外药物溶栓研究。该仿生微流控血栓模型成功模拟了视网膜血管系统的血栓形成过程,其建立的标准化评估体系为视网膜血管疾病的溶栓治疗研究提供了可靠的体外实验平台,尤其在药物筛选和疗效评价、视网膜内皮屏障研究方面展现出重要应用价值。但是,本研究也存在一定的缺陷:仅通过DAPI染色细胞核的方式,观察了微流控芯片血栓模型形成前后、溶栓前后通道内细胞是否因动力因素而脱壁;仅使用NO染色定量分析微流控芯片血栓模型形成前后、溶栓前后细胞活性。在后续的实验研究中,本课题组将进一步对细胞存活、增殖和凋亡的相关指标进行分析。

**利益冲突** 本文所有作者声明不存在利益冲突

**参考文献:**

[1] 袁航, 谢立科, 罗傑, 等. 视网膜动脉阻塞危险因素和治疗的研究现状[J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(3): 446-449. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.3.13.
YUAN H, XIE L K, LUO J, *et al*. Review about risk factors and treatment in retinal artery occlusion[J]. Int Eye Sci, 2021, 21(3): 446-449. DOI: 10.3980/j. issn. 1672-5123. 2021.3.13.

[2] CHEN T Y, UPPULURI A, ZARBIN M A, *et al*. Risk factors for central retinal vein occlusion in young adults[J]. Eur J Ophthalmol, 2021, 31(5): 2546-2555. DOI: 10.1177/1120672120960333.

[3] 胡帅, 迟凯耀, 郑燕林. 基于易栓症相关风险因素的视网膜静脉阻塞发病机制[J]. 中医眼耳鼻喉杂志, 2023, 13(2): 109-112. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9006.2023.02.013.
HU S, CHI K Y, ZHENG Y L. Research progress on risk factors of retinal vein occlusion associated with thrombolysis[J]. J Chin Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2023, 13(2): 109-112. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9006.2023.02.013.

[4] 王文吉. 视网膜血管炎[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2014, 14(2): 69-73. DOI: 10.14166/j.issn.1671-2420.2014.02.012.
WANG W J. Retinal vasculitis[J]. Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2014, 14(2): 69-73. DOI: 10.14166/j.issn.1671-2420.2014.02.012.

[5] AMERI H, RATANAPAKORN T, RAO N A, *et al*. Natural course of experimental retinal vein occlusion in rabbit; arterial occlusion following venous photothrombosis[J]. Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008, 246(10): 1429-1439. DOI: 10.1007/s00417-008-0878-4.

[6] KHAYAT M, LOIS N, WILLIAMS M, *et al*. Animal models of retinal vein occlusion[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(14): 6175-6192. DOI: 10.1167/iovs.17-22788.

[7] VIEIRA M J, CAMPOS A, DO CARMO A, *et al*. Thrombophilic risk factors for retinal vein occlusion[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18972. DOI: 10.1038/s41598-019-55456-5.

[8] VESTERGAARD N, CEHOFSKI L J, HONORÉ B, *et al*. Animal models used to simulate retinal artery occlusion: a comprehensive review[J]. Transl Vis Sci Technol, 2019, 8(4): 23. DOI: 10.1167/tvst.8.4.23.

[9] AYYOUB S, ORRIOLS R, OLIVER E, *et al*. Thrombosis models: an overview of common *in vivo* and *in vitro* models of thrombosis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2569. DOI: 10.3390/ijms24032569.

[10] 王莎, 刘斯琪, 丁鹏敏, 等. 体外模型在中药代谢研究中的应用[J]. 药学进展, 2020, 44(2): 119-132. DOI: 10.1016/j.aps.2020.01.002.
WANG S, LIU S Q, DING P M, *et al*. Application of *in vitro* models in metabolism of traditional Chinese medicines[J]. Prog Pharm Sci, 2020, 44(2): 119-132. DOI: 10.1016/j.aps.2020.01.002.

[11] 陶玏, 杜红艳. 同型半胱氨酸与多种眼疾病的关联及机制探究[J]. 内蒙古医学杂志, 2024, 56(4): 464-467. DOI: 10.16096/J.cnki.nmgyxzz.2024.56.04.017.
TAO L, DU H Y. Relationship between homocysteine and various eye diseases and its mechanism[J]. Inn Mong Med J, 2024, 56(4): 464-467. DOI: 10.16096/J. cnki. nmgyxzz. 2024.56.04.017.

[12] VALERIANI E, PACIULLO F, PORFIDIA A, *et al*. Antithrombotic treatment for retinal vein occlusion: a systematic review and meta-analysis[J]. J Thromb Haemost, 2023, 21(2): 284-293. DOI: 10.1016/j.jtha.2022.10.003.

[13] 牛浩宇, 余萍. Faricimab玻璃体腔内注射治疗视网膜静脉阻塞的研究进展[J]. 眼科学报, 2024, 39(11): 586-592. DOI: 10.1016/j.ophtha.2024.01.029.
NIU H Y, YU P. Advances in the treatment of retinal vein occlusion with Faricimab intravitreal injection[J]. Eye Sci, 2024, 39(11): 586-592. DOI: 10.1016/j. ophtha. 2024. 01.029.

[14] 李远, 刘北忠, 龚放, 等. 基于微流控芯片技术的体外微

血管网络模型构建及血液动力学研究[J]. 军事医学, 2014, 38(11): 885-889. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2014.11.011.
LI Y, LIU B Z, GONG F, *et al*. Construction of a microvascular network model *in vitro* by microfluidic technology for hemodynamic investigations[J]. Mil Med Sci, 2014, 38(11): 885-889. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2014.11.011.

[15] GAO X M, ZHANG T C, HUANG X J, *et al*. Impact of rise and fall phases of shear on platelet activation and aggregation using microfluidics[J]. J Thromb Thrombolysis, 2024, 57(4): 576-586. DOI: 10.1007/s11239-024-02968-1.

[16] LI Y, LU Y, CHEN Q, *et al*. Probing of peripheral blood mononuclear cells anchoring on TNF-α challenged-vascular endothelia in an *in vitro* model of the retinal microvascular [J]. Biomed Microdevices, 2017, 19(3): 54. DOI: 10.1007/s10544-017-0194-z.

[17] 李远, 刘北忠, 龚放, 等. 一种圆形横截面PDMS微血管模型的构建[J]. 纳米技术与精密工程, 2015(1): 50-55. DOI: 10.13494/j.npe.20140054.
LI Y, LIU B Z, GONG F, *et al*. Construction of a circular cross-section PDMS microvascular model[J]. Nanotechnol Precis Eng, 2015(1): 50-55. DOI: 10.13494/j.npe.20140054.

[18] MAUTUIT T, CUNNAC P, TRUFFER F, *et al*. Absolute retinal blood flow in healthy eyes and in eyes with retinal vein occlusion[J]. Microvasc Res, 2024, 152: 104648. DOI: 10.1016/j.mvr.2023.104648.

[19] 王爽, 魏串串, 刘雪, 等. 北京市40岁以上中老年人群视网膜血管直径的五年变化[J]. 眼科, 2018, 27(6): 438-442. DOI: 10.13281/j.cnki.issn.1004-4469.2018.06.010.
WANG S, WEI C C, LIU X, *et al*. 5-year changes of retinal vascular diameters in elderly population in Beijing[J]. Ophthalmol China, 2018, 27(6): 438-442. DOI: 10.13281/j.cnki.issn.1004-4469.2018.06.010.

[20] 王玉雯,李芙蓉,袁容娣.Gpr124对高糖环境下视网膜微血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成的调控作用[J].陆军军医大学学报,2024,46(18):2101-2109. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202403058.
WANG Y W,LI F R,YUAN R D.Regulatory effect of Gpr124 on proliferation, migration and angiogenesis of retinal microvascular endothelial cells under high-glucose condition[J]. J Amry Med Univ,2024,46(18):2101-2109.DOI:10.16016/j.2097-0927.202403058.

[21] ESCH M B, POST D J, SHULER M L, *et al*. Characterization of *in vitro* endothelial linings grown within microfluidic channels[J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(23-24): 2965-2971. DOI: 10.1089/ten.tea.2010.0371.

[22] GOTTSCHALK B, KOSHENOV Z, MALLI R, *et al*. Implications of mitochondrial membrane potential gradients on signaling and ATP production analyzed by correlative multi-parameter microscopy[J]. Sci Rep, 2024, 14: 14784. DOI: 10.1038/s41598-024-65595-z.

[23] 官福新, 周露露, 张宸豪, 等. JC-1单染法检测CCCP对内皮细胞线粒体膜电位的影响[J]. 吉林医药学院学报, 2014, 35(5): 324-326. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2014.05.002.
GUAN F X, ZHOU L L, ZHANG C H, *et al*. Effect of CCCP on endothelial cells mitochondrial membrane potential by JC-1 single staining detection[J]. J Jilin Med Coll, 2014, 35(5): 324-326. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2014.05.002.

[24] 张再丰, 王秀丽, 张赏月, 等. 内源性一氧化氮对血管内皮细胞超氧化物歧化酶1活性及细胞凋亡的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(15): 1176-1180. DOI: 10.3760/cma.j.cn101070-20210517-00545.
ZHANG Z F, WANG X L, ZHANG S Y, *et al*. Effects of endogenous nitric oxide on superoxide dismutase 1 activity and apoptosis of vascular endothelial cells[J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2021, 36(15): 1176-1180. DOI: 10.3760/cma.j.cn101070-20210517-00545.

[25] TSAI M, KITA A, LEACH J, *et al*. *In vitro* modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology[J]. J Clin Invest, 2012, 122(1): 408-418. DOI: 10.1172/JCI58753.

[26] SWIERINGA F, HEEMSKERK J W M, ASSINGER A. Platelet activation and signaling in thrombus formation[J]. Blood, 2025: blood. 2024025320. DOI: 10.1182/blood.2024025320.

[27] KIM M E, LEE J S. Advances in the regulation of inflammatory mediators in nitric oxide synthase: implications for disease modulation and therapeutic approaches[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(3): 1204. DOI: 10.3390/ijms26031204.

[28] AUGUSTIN H G, KOH G Y. A systems view of the vascular endothelium in health and disease[J]. Cell, 2024, 187(18): 4833-4858. DOI: 10.1016/j.cell.2024.07.012.

[29] HROVATIN K, SIKKEMA L, SHITOV V A, *et al*. Considerations for building and using integrated single-cell atlases[J]. Nat Methods, 2025, 22(1): 41-57. DOI: 10.1038/s41592-024-02532-y.

[30] QIU Y Z, LIN J, WANG A, *et al*. Clinically relevant clot resolution *via* a thromboinflammation-on-a-chip[J]. Nature, 2025. DOI: 10.1038/s41586-025-08804-7.

(收稿:2025-03-03;修回:2025-03-21)
(编辑 李 玥)