论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1078-04

临床用氧对新生鼠视网膜发育的影响

张 琴,韦 红 (重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400010)

摘 要:目的 研究不同临床用氧方式对新生鼠视网膜血管发育的影响以及相应视网膜血管内皮生长因子(VEGF)的表达以探讨 ROP 发病机制,为早产儿临床合理用氧提供实验依据。方法 新生 7 d Wistar 鼠仔 150 只,按不同吸氧方式称质量随机分为 5 组。实验组 1:FiO_2 由 75% 分 5 d 逐渐降低直至停氧(每天下降幅度约为 10%);实验组 2 吸入氧浓度(FiO_2)5 d 逐渐由 30% 升高至 75% 后突然中断吸氧。实验组 3 持续吸 75% 高氧 5 d 后骤然停氧;实验组 4 持续吸 75% 高氧 5 d 后分 5 d 逐渐降低 FiO_2 直至停氧;对照组:置于同实验条件下的空气中饲养。视网膜铺片(ADP 酶染色法)了解视网膜血管形态改变;眼球切片(HE 法)观察视网膜血管的增生和发育情况;免疫组化法观察 5 组标本视网膜各层 VEGF 的表达,并进行视网膜组织内 VEGF 的含量,血管内皮细胞核两者之间相关性分析。结果 ①视网膜铺片和眼球切片 HE 染色显示实验组 2、3 视网膜存在缺氧并出现异常新生血管生成的类似 ROP 表现。②免疫组化结果显示缺氧后视网膜组织内 VEGF 的表达明显增加,主要分布在视网膜节细胞层和内核层的毛细血管内皮细胞细胞质和细胞核中。视网膜新生血管芽细胞核数(以与内界膜相关联的突破内界膜的内皮细胞核数 C 表示)与视网膜组织 VEGF 含量呈正相关($r=0.807$,$P<0.01$)。结论 吸入高浓度氧后突然停氧可严重影响新生鼠视网膜血管的发育,产生类似早产儿视网膜病的病变。因此临床上应严密监测用氧情况,采取逐渐降低氧浓度的吸氧方式。

关键词:视网膜新生血管;吸氧;血管内皮生长因子
中图法分类号:R339.146;R339.31;R459.6 文献标识码:A

Effects of oxygen inhalation modes on retinal vessels development in neonatal rat

ZHANG Qin, WEI Hong (Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different oxygen inhalation modes on retinal vessels development in neonatal rat in order to approach its etiopathogenesis and provide experimental evidence for proper oxygen therapy for premature. Methods Totally 150 postnatal day 7 (P7) Wistar rats were randomly assigned into 5 groups according to different oxygen inhalation modes ($n=30$ in each group). Experimental group 1 were exposed to 75%, 60%, 50%, 40% and 30% oxygen in turn for one day, followed by room air exposure for 5 d. Experimental group 2 were exposed to 30%, 40%, 50%, 60% and 75% oxygen in turn for one day, then exposed in air for 5 d. Experimental group 3 were exposed to 75% oxygen for 5 d, then oxygen supply was suddenly stopped, followed by room air exposure for 5 d. Experimental group 4 were exposed to 75% oxygen for 5 d, then the oxygen supply was reduced by 10% per day till oxygen supply level equal to room air, finally room air exposure for 5 d. The control group were exposed to room air in the same experimental condition. The retinal vascular development and proliferation were evaluated by stretched preparation (ADPase stained retina) and eyeball cross-section. The nuclei of proliferative retinal vessels of 5 groups were counted and the vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions in retina were detected by immunohistochemical staining. The dependability between the nuclei of proliferative retinal vessels and the VEGF expressions in retina were also analyzed. Results In the experimental groups 2 and 3, there existed retinal hypoxia and formed abnormal new vessels as retinopathy of prematurity (ROP). The VEGF expressions increased after hypoxia, mainly in endochylema and nucleus of capillary endothelium of ganglionic layer of retina and inner nuclear layer. Linear

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC,2007BB5326)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5326)
作者简介:张 琴,女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事新生儿方面的研究,发表论文 6 篇。现在重庆市妇幼保健院儿科,重庆 400013。电话:(023)86830936,E-mail:chongqingqin@yahoo.com,
通信作者:韦 红,电话:13650532751,E-mail:waehong@sina.com
收稿日期:2007-10-11;修回日期:2007-11-21

correlation analysis of the data indicated the positive correlation was between the nuclei of the proliferative vessels and the VEGF levels in retina ($r=0.807$, $P<0.01$). Conclusion Abrupt quit of oxygen supply contributes to the development of retinal vessels in neonatal rats and induces pathological changes of retina as ROP. So we should monitor oxygen concentration intimately in clinic and adopt the mode of gradually reducing oxygen supply.

Key words: retinal neovascularization; oxygen inhalation; vascular endothelial growth factor

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)原称晶体后纤维增生症,是一种增殖性视网膜病变。其特征是早产儿视网膜血管发育异常,新生血管形成,纤维增殖及视网膜脱离,可导致包括终生失明在内的多种严重并发症。近年来由于新生儿重症监护病房(NICU)医疗水平的不断提高,早产儿的存活率明显提高,本病的发病率呈显著增加趋势,已成为世界范围内儿童致盲的主要原因,然而 ROP 的发病机制尚不清楚,既往研究认为高浓度氧是导致 ROP 的重要原因,而目前研究认为 ROP 的产生与"相对缺氧"有关。即使在高浓度氧环境中,早产儿未发育成熟视网膜组织却处于一个"相对低氧"的状态,从而引起一系列血管生长因子大量分泌,促使新生血管大量生成,导致 ROP。因此不能以单纯停氧来防止 ROP 的发生。临床观察显示吸氧浓度和时间与 ROP 的发生有关。本实验模拟临床早产儿的不同用氧情况,研究不同吸氧方式对视网膜血管发育的影响以及视网膜血管内皮生长因子表达,探讨 ROP 的发病机制,为临床合理用氧提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

1.1.1　实验动物　7 日龄清洁级 Wistar 小鼠 150 只,性别不限,由重庆医科大学附属儿童医院动物中心提供。按文献[1]方法建立视网膜新生血管动物模型。

1.1.2　分组　将实验动物分为实验组与对照组,根据不同的吸氧方式将实验组分为 4 组:实验组 1:吸入氧浓度(FiO_2)5 天逐渐由 30% 升高至 75%(每天上升约 10%)后突然中断吸氧。实验组 2:FiO_2 由 75% 分 5 d 逐渐降低直至停氧(每天下降幅度约为 10%);实验组 3:持续吸 75% 高氧 5 d 后骤然停氧;实验组 4:持续吸 75% 高氧 5 d 后分 5 d 逐渐降低 FiO_2 直至停氧(每天下降幅度约为 10%)。对照组:置于同实验条件下的空气中饲养。

1.2　视网膜铺片了解血管发育

实验组 1、2、3 和对照组分别于 P12(生后第 12 天)、P14、P17、P22 取小鼠各 5 只进行视网膜铺片(ADP 酶染色法)实验组 4 于 P14、P17、P22 取小鼠各 6 只进行视网膜铺片,在光镜显微镜下观察视网膜血管形态、分布及数量,具体方法见参考文献[2]。

1.3　定量检测新生血管芽

采用眼球切片法。每组剩余小鼠于 P17 时,颈椎脱臼处死,摘取眼球,制备眼球切片。两组各随机抽取 20 张苏木精-伊红(HE)染色切片,在显微镜下计数突破视网膜内界膜的内皮细胞核数量,分别计算出两组的平均数。计数血管内皮细胞细胞核时仅计数与内界膜有联系的血管内皮细胞细胞核。具体方法见参考文献[2]。

1.4　免疫组化 VEGF 的测定

用免疫组化法测定 VEGF 的表达。即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.5　统计学分析

所有数据以统计分析软件 SPSS 10.0 进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单变量多因素数据方差分析。均数间两两比较采用 SNK-q 检验。

2　结果

2.1　视网膜血管病变的形态学改变

对照组:视网膜血管 P12-P17 由视盘发出,逐渐向四周呈放射状均匀分布发育,管径较粗,分支逐步形成,血管网结构清晰。逐渐形成深浅两层血管网。并通过螺旋形的交通动脉互相连接见(图 1)。实验组 2,3:P12 时自视盘发出的大血管管径变细,分支减少,走行僵直,视网膜中央可见大片无灌注区。P14 时大血管明显扩张、迂曲,中央仍可见大片无灌注区,周边部血管密度增高,在视网膜中周部开始出现新生血管,但是这些血管结构紊乱。P17 时大血管更加扩张、迂曲,视网膜中周部有大量结构分布紊乱的新生血管形成,而且浅层血管网及大部分深层血管网广泛闭塞。可见血管渗漏现象(图 2)。实验组 4:P14 铺片观察与实验组 2.3 相似。P17 时,视网膜中央无灌注区缩小,血管管径、走行基本正常,但深层血管有阻塞现象,P22 时视网膜中央未见无灌注区,血管发育基本成熟;实验组 1 视网膜血管的形态、数量和分布与对照组相似。

2.2　视网膜血管增生的定量结果

光镜下所见:计数各组小鼠平均每只眼球每张切片上突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数目。实验组 2 小鼠的每个切面均可见突破内界膜的内皮细胞核及新生血管断面,内界膜下的细胞增殖,排列紊乱(图 3);与实验组 3 相似。对照组基本上未见突破内界膜的内皮细胞核,内界膜下的细胞也无明显增殖(图 4);实验组 1,4 小鼠突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核与对照组相比差异无显著性。不同组实验对象突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目(C)见表 1。

2.3　VEGF 免疫组化结果

2.3.1　光学显微镜观察所见　对照组:在视网膜节细胞层和内核层可见少许 VEGF 阳性细胞,细胞质着色呈淡黄色(图 5);实验组 2:可见在视网膜节细胞层和内核层 VEGF 阳性细胞数量明显增多,表达增强,细胞质着色呈棕黄色(图 6)与实验组 3 相似;实验组 1、4 视网膜组织中 VEGF 的表达与对照组无明显差异。

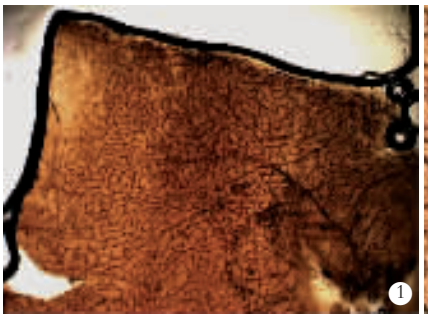


图1 对照组 P17 视网膜铺片 （×400）

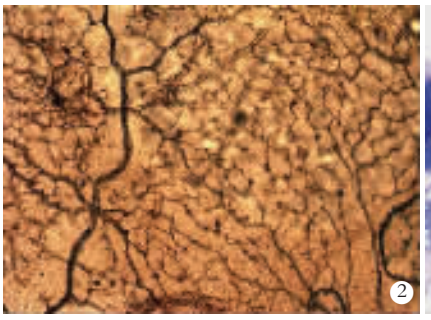


图2 实验组2 P17 视网膜铺片 （×400）

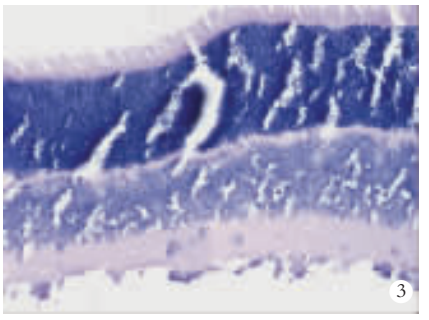


图3 实验组2 视网膜 HE 染色 （×400）

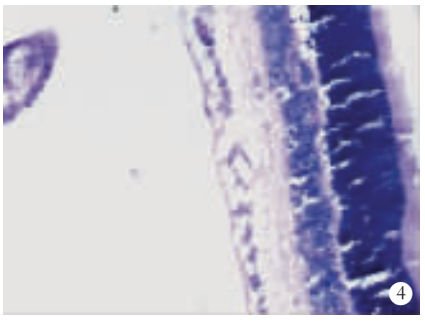


图4 对照组视网膜 HE 染色 （×400）

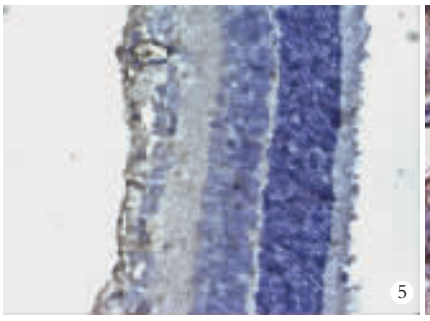


图5 对照组视网膜 VEGF 免疫组化染色 （×400）



图6 实验组2 视网膜 VEGF 免疫组化染色 （×400）

2.3.2 用 Image-Pro Plus Version 5.1 软件对免疫组织化学染色结果进行分析 每张切片任意选取 3 个高倍视野（×400），测量细胞的平均光密度值以表示阳性产物的强度。细胞的平均光密度值（D）见表 1。

表1 各组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目（指标 C）和 VEGF 阳性细胞的平均光密度值（指标 D）

组别	指标 C	指标 D
实验组 1	2.40 ± 0.68	0.28 ± 1.43
实验组 2	28.95 ± 0.10[a]	0.58 ± 1.42[a]
实验组 3	32.80 ± 0.77[a]	0.57 ± 2.14[a]
实验组 4	3.05 ± 0.69	0.30 ± 1.26
对照组	2.75 ± 0.71	0.28 ± 1.40

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.4 实验检测结果的相关性分析

我们将视网膜新生血管芽与视网膜组织 VEGF 按同一动物指标为一组数据的对应关系两两进行直线相关性分析。结果表明，视网膜新生血管芽细胞核数与视网膜组织 VEGF 含量存在明显的相关性（$r=0.994$，$P<0.05$）。

在有效的 20 对实验数据中，我们发现视网膜新生血管芽细胞核数（以与内界膜相关联的突破内界膜的内皮细胞核数 C 表示）与视网膜组织 VEGF 含量呈正相关（$r=0.807$，$P<0.01$）。

3 讨论

目前 ROP 真正的发病机制尚未阐明，临床及基础研究均提示不合理的吸氧方式是早产儿视网膜病发生的重要原因之一。高氧可促使早产儿未发育成熟的视网膜血管收缩、闭塞，视网膜组织相对低氧，从而引起一系列血管生长因子大量分泌，促使新生血管大量生成，导致 ROP，本实验模拟临床上较常见的早产儿用氧情况设计 4 种吸氧方式，观察不同吸氧方式对视网膜血管发育的影响。实验组 1 模拟临床病情迅速稳定后逐渐降低氧浓度直至停氧，结果视网膜铺片上未见新生血管形成，切片中新生血管内皮细胞核极少，可能与暴露在高氧中的时间较短，视网膜血管收缩及视网膜缺血程度轻，视网膜相对低氧不明显。而实验组 2 中，我们模拟临床患者需氧逐渐增加，病情好转后立即停氧；实验组 3 模拟病情较重持续吸入高氧，病情好转后立即停氧造成一个较大波动的血氧浓度。这两组新生鼠连续吸 5 d 高氧后视网膜铺片显示视网膜血管发育过程中视网膜血管形态异常，新生血管大量形成，形成 ROP。证实了高氧以及氧浓度波动与 ROP 新生血管形成有关，与国内外报道一致[2-5]。实验组 4 模拟临床病情重连续给予 5 d 高氧，稳定后逐渐降低 FiO_2，其新生血管内皮细胞核与对照组无显著差异，视网膜铺片在高氧时虽有血管收缩，新生血管生成的改变，但继续使用低氧却可以改善视网膜相对缺氧状态，随着吸氧时间的延长，异常的血管形态明显改善。这提示我们，在吸入高氧后恰当地继续使用低氧的确可以避免发生 ROP。提示临床上不能以单纯停氧来防治 ROP，反而应该补氧纠正“缺氧”，补充氧治疗被提倡作为 ROP 阈值病变前期的治疗方法之一。对胎儿眼的进一步研究表明，血管内皮生长因子（VEGF）在视网膜的表达呈波峰式分布，高峰在孕 9～13 周和 26 周左右，与梭形细胞（血管内皮前细胞）、血管内皮细胞增殖呈正相关，说明 VEGF 在正常视网膜血管发育过程中起促进作用。当 VEGF 缺乏时，血管内皮细胞的

分化、增殖和迁移均受阻,且呈剂量相关性[6]。VEGF 也是启动新生血管形成所必需的最重要物质,对于正常血管发育和异常新生血管形成均起重要作用,VEGF 直接受氧浓度调节,在众多细胞因子中可能起关键性作用[3]。缺血缺氧可诱导 VEGF mRNA 的转录及其蛋白的表达,使视网膜外颗粒层、内颗粒层及节细胞层中血管内皮细胞、血管壁、移行的色素上皮细胞甚至游行于血管内的白细胞 VEGF mRNA 表达明显增高[7],使眼内局部 VEGF 的含量增加。本实验证实不同吸氧方式下视网膜 VEGF 表达不同,高氧后骤然停氧 VEGF 的表达明显增加,本实验视网膜新生血管芽细胞核数与视网膜中 VEGF 含量呈正相关,提示 VEGF 对视网膜新生血管的形成以及 ROP 的发病机制有重要的影响。而在对照组与实验组 4 中 VEGF 表达无差异。我们的动物模型证实了高氧下视网膜处于‘相对缺氧’的假设,相对缺氧导致 VEGF 的大量分泌,促使新生血管大量生成,导致 ROP,这与 Smith 等[8]对早产儿视网膜病的研究一致。综上所述,不恰当的吸氧方式是引起 ROP 的重要原因,视网膜的相对缺氧缺血、VEGF 大量产生以及新生血管大量形成可能与 ROP 的发病有关。临床工作中,应尽快稳定早产儿生命体征,采取合适的给氧方式。

参考文献:

[1] 韩 梅,孔怡淳,赵堪兴,等. 氧诱导视网膜病变鼠模型血管内皮生长因子 mRNA 的表达[J]. 中华眼底病杂志,2005,21(5):292-295.
[2] 王玉环,陈 超,石文静,等. 不同吸氧方式对新生鼠视网膜血管发育的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(2):129-132.
[3] 石文静,陈 超,周国民,等. 血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子-2 及雌激素受体在早产儿视网膜病发病机制中的作用[J]. 复旦学报:医学版,2007,34(2):228-232.
[4] McColm J R,Geisen P,Hartnett M E. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia:relevance to clinical ROP[J]. Mol Vis,2004,10:512-520.
[5] McColm J R,Cunningham S,Wade J,*et al*. Hypoxic oxygen fluctuations produce less severe retinopathy than hyperoxic fluctuations in a rat model of retinopathy of prematurity[J]. Pediatr Res,2004,55(1):107-113.
[6] Bautch V L,Redick S D,Scalia A,*et al*. Characterization of the vasculogenic block in the absence of vascular endothelial growth factor-A[J]. Blood,2000,95(6):1979-1987.
[7] Pe'er J,Folberg R,Itin A,*et al*. Upregulated expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy[J]. Br J Ophthalmol,1996,80(3):241-245.
[8] Smith L E. Pathogenesis of retinopathy of prematurity[J]. Semin Neonatol,2003,8(6):469-473.

(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2008)11-1081-01

个案与短篇

严重缺损前牙牙髓炎一次法根管治疗术的临床观察

赵文峰,陈增力,刘继延,张伶军,王丽英 (北京军区总医院口腔科,北京 100700)

牙髓炎采用常规法治疗疗程长,患者复诊次数多。近年来,一次法根管治疗术治疗牙髓炎得到普遍应用。我科在 2001-2004 年期间,采用一次法根管治疗术治疗严重缺损前牙牙髓炎患者 111 例,效果可靠。

1 资料与方法

1.1 研究对象

111 例严重缺损前牙牙髓炎患者,男性 45 例,女性 66 例。年龄 19~67 岁,平均 42.1 岁。122 颗前牙,上颌中切牙 52 颗;上颌侧切牙 44 颗;下颌中切牙 20 颗;下颌侧切牙 6 颗。其中,常规治疗 61 颗,一次法 61 颗。

1.2 方法

常规法开髓后 3 d 根管预备、消毒,7 d 后充填;一次法开髓、根管预备、充填一次完成。2 周后行 X 线检查。

1.3 评定标准

成功:无疼痛、叩痛,X 线检查根尖无阴影;失败:有疼痛、叩痛,X 线检查根尖部阴影上,根管超填、欠填。

2 结果

122 颗严重缺损前牙牙髓炎常规法和一次法根管治疗术结果见表 1。

表 1 122 颗严重缺损前牙牙髓炎常规法和一次法根管治疗术结果

方法	牙数	成功(颗)	失败(颗)	成功率(%)
常规法	61	56	5	91.8
一次法	61	57	4	93.4

3 讨论

前牙严重缺损是指牙冠 1/3 以上的缺损,在临床上表现多

(下转 1084 页)

作者简介:赵文峰,男,河南省安阳市人,硕士,主任医师,主要从事口腔正畸、口腔修复和口腔颌面外科方面的研究,发表论文 30 余篇。电话:(010)66721957

收稿日期:2008-05-07;修回日期:2008-05-13