技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)02-0192-03

脉络膜新生血管 CNV 动物模型的评估新方法

许 琴[1],Nalini S.Bora[2],Puran Bora[2]
(1. 贵州遵义医学院附院检验科,遵义 563003;2. University of Arkansas)

【摘 要】目的:建立 C57BL/6 小鼠脉络膜新生血管(Choroidal neovascularization,CNV)动物模型的评估方法。方法:①应用氪红激光对小鼠实验性视网膜进行光凝,激光的功率、光凝斑直径和曝光时间分别为 250 mW、50 μm 及 0.05 s 诱导 CNV 动物模型。②分别于光凝后 1、3、5、7、10 d,用 2×10^6FITC-dextran 荧光素灌注小鼠心脏。③mAb 特定抗 Elastin 抗体标记 Bruch 膜。④视网膜色素上皮(Retinal pigment epithelium,RPE)-脉络膜-巩膜复合体铺片。⑤激光共聚焦显微镜对 RPE-脉络膜-巩膜复合体进行 CNV 形态进行观察和测量。结果:光凝后 3 d 可见新生血管及走向清晰可见,光凝后 7 d CNV 达到高峰。结论:用抗体标记 Bruch 膜。FITC-dextran 荧光素灌注小鼠心脏,激光共聚焦显微镜对 RPE-脉络膜-巩膜复合体进行氪红激光诱导 C57BL/6 小鼠的 CNV 模型进行评估,直观,可靠。

【关键词】脉络膜新生血管;动物模型;氪红激光;共聚焦显微镜;评估
【中国图书分类法分类号】R77 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-04-30

A new assessment method for animal model of choroidal neovascularization (CNV)

XU Qin, et al
(*Department of Clinical Laboratory Science, the Affiliated Hospital, Zunyi Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To establish a new assessment method for animal model of choroidal neovascularization (CNV). *Methods*: In this model, CNV was induced by laser photocoagulation in C57BL/6 mice with the krypton red laser. Animals from each group were sacrificed and were perfused through the heart with fluorescein-labeled dextran (FITC-Dextran) on day 1, 3, 5, and 7 post laser. Retinal pigment epithelium-choroid-scleral tissue, after using a mAb specific for elastin staining, was examined to determine the incidence and size of CNV complex by confocal microscopy. *Results*: Confocal micrograph of the neovascular complex in C57BL/6 mice showed the new vessels (green), and damaged Bruch's membrane (BM) and RPE were stained red for elastin. CNV appeared on day 3 post laser, reaching the peak on day 7 post laser. *Conclusion*: The new assessment method of animal model of choroidal neovasculation (CNV) is feasible, reliable and visualized.

【Key words】choroidal neovascularization; animal model; krypton red laser; confocal microscopy; assessment

年龄相关性黄斑变性(Age-related macular degeneration,AMD)已成为世界范围老年人视力丧失的主要原因之一[1],年龄相关性黄斑变性在临床上分为干性和湿性两型,湿性又称渗出性,以脉络膜新生血管(Choroidal neovascularization,CNV)形成为特征。CNV 是引起 AMD 视力丧失的主要原因。目前 CNV 的发病机制不清楚,也无满意的治疗方法[2],因此建立理想的 CNV 动物模型及建立其评估方法对深入研究 CNV 发病机制及临床防治十分必要[3]。用能量输出功率 250 mW,直径 50 μm,直径 50 μm,曝光时间 0.05 s 的氪红激光诱导CNV 生成;对于新生血管的观察我们采用荧光(Fluorescein-labeled dextran,FITC-dextran)[4,5]心内灌注抗体标记 Bruch 膜及视网膜色素上皮(Retinal pigment epithelium,RPE);RPE-脉络膜-巩膜铺片;共聚焦显微镜观察 CNV 生成的方法。用抗体标记出 Bruch 膜及 RPE,更好地显示 CNV 在Bruch 膜及 RPE 间的走形及形态分布,目前未见国内报道。

作者介绍:许 琴(1966-),女,副教授,
研究方向:补体与眼疾。

1 材料与方法

1.1 主要材料及动物

健康雄性 C57BL/6 小鼠 30 只(4~6 周;The Jackson 实验室提供)。2×10^6 FITC-dextran(Sigma-Aldrich),Anti-goat CY(Sigma-Aldrich),mAb 特定抗 Elastin 抗体(Sigma-Aldrich),CY-CLOGYL 1%(Alcon.fort worth.TX),Ketamine and Xylazine(Alfasan International B.V.,Woerden,The Netherlands),激光共聚

焦显微镜及 LSM510Image-Pro Plus 软件(Zeiss)。

1.2 激光诱导小鼠 CNV 形成动物模型的制作

1%CYCLOGYL® (cyclopentolate hydrochloride ophthalmic solution)1 滴左眼扩瞳,20 min 做第 2 次扩瞳。Ketamine(100 mg/ml)和 Xylazine(20 mg/ml) 1:1 等体积混匀,腹腔注射 0.1 ml。手持盖玻片作为接触镜,用波长为 659 nm 氪红激光光凝视网膜,氪红激光(光凝的激光能量输出功率为 250 mW,光斑直径 50 μm,曝光时间 0.05 s),在视神经周围,距视盘1.5 ~ 2.0 PD 处,避开血管每只眼等距离光凝 5 个点,激光时产生的汽化泡沫(浓白泡沫状,伴有轻响)[6]示激光点 Bruch's 膜破裂。光凝后眼底如有出血表示血管受损,该眼另作标记,不作为观察 CNV 的产生。激光后立即用棉签将小鼠舌头挑至嘴外。实验动物右眼作为对照,扩瞳后不做处理。激光后 1、3、5、7、10 d 处死小鼠。

1.3 分析检测 CNV 的生成

1.3.1 FITC-dextran 心内荧光素灌注 小鼠分别于光凝后(1、3、5、7、10 d),Ketamine 和 Xylazine 以体积 1:1 等体积 0.1 ml 腹腔麻醉,仰卧位固定,剖开胸腔,剪开心包膜,暴露心脏。蝴蝶针头刺入左心室尖,1 ml 含 50 mg 荧光标记的(FITC-Dextran, Sigma)PBS(pH7.3)缓慢灌流心脏,小鼠的眼膜、口、鼻、耳廓、四肢微微黄染,示灌流成功。荧光标记后血管显绿色。

1.3.2 剥离 RPE- 脉络膜 - 巩膜 处死动物,摘下眼球,10% 磷酸盐缓冲福尔马林固定 1 h,冲洗后放入 PBS 溶液,解剖显微镜下去除角膜、晶状体、玻璃体,小心剥离神经视网膜层,将 RPE- 脉络膜 - 巩膜复合体置于载玻片上,解剖显微镜下以视乳头为中心对称行 5 ~ 6 条放射状切开。

1.3.3 抗体标记 Bruch 膜及 RPE RPE- 脉络膜 - 巩膜在 5% 牛血清白蛋白孵育 1 h 后,PBS 漂洗 3 次,滴加 mAb 特定抗 Elastin 抗体(1.0 mg/ml;1/200 稀释,Sigma-Aldrich),并置于湿盒内缓慢摇床上 4℃过夜(避光),PBS 漂洗 3 次,每次间隔 5 ms;加入二抗 Anti- goat CY3(1.0 mg/ml,1/2 000 稀释)于 37℃湿盒避光孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次。标记后损伤的 Bruch 膜及 RPE 染色为红色。

1.3.4 视网膜铺片观察 CNV 将 5 ~ 6 条放射状切开的 RPE- 脉络膜 - 巩膜复合体 RPE 面向上平铺在载玻片上(巩膜面朝下)成梅花瓣状,盖上盖玻片,滴少量甘油明胶封片,激光共聚焦显微镜对 RPE- 脉络膜 - 巩膜复合体 CNV 进行观察和测量。

2 结 果

2.1 眼底观察

动物光凝后,30 只眼 150 个激光点中,143 个点有气泡,光斑中央有气泡形成(95.3%),正常无出血;如击破小血管时,有出血,该眼不用于实验观察。光凝后观察眼底见光斑中央为浓白色。

2.2 CNV 观察

动物用荧光 fluorescein-dextran 灌注及抗 Elastin 抗体标记,共聚焦显微镜检测平铺的 RPE- 脉络膜 - 巩膜,CNV 复合物染色为绿色,而 Elastin 在 Bruch's 膜染成红色;造模后第 3 d,共聚焦显微镜检查可见光斑中央有新生血管 CNV 长出。光凝后 7 d 光凝斑深部明显 CNV 来源于深部脉络膜血管,朝向视网膜神经层生长(图 1),正常对照组见(图 2)。

2.3 CNV 发生率

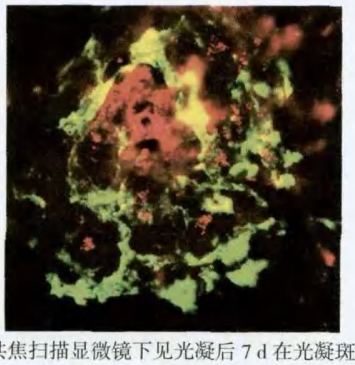
见表 2。

3 讨 论

AMD 成为 50 岁以上人群致盲的主要原因。它分为渗出性和干性两型,渗出性 AMD 以 CNV 为特征。脉络膜新生血

表 1 C57BL/6 小鼠眼激光后激光气泡的发生率

小鼠种类	小鼠(只)	左眼激光点	总激光点	激光后气泡发生率
C57BL/6	30	5	150	95.3%

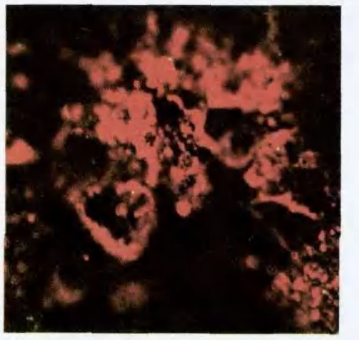


激光共焦扫描显微镜下见光凝后 7 d 在光凝斑边缘及光凝斑中心的深部脉络膜血管可见 FITC 显影(CNV 复合物显绿色,Bruch'膜及 RPE 显红色)

图 1 共聚焦显微镜下激光诱导观察 C57BL/6 小鼠 CNV

表 2 激光诱导 C57BL/6 小鼠 CNV 的发生率

分 组	小鼠总数	左眼激光点	激光点总数	CNV 发生率
激光组	30	5	150	144(96%)
对照组	10	0	0	0%



对照组的 Bruch's 膜(BM)和 RPE,未见(绿色)新生血管

图 2 共聚焦显微镜下对照组 C57BL/6 小鼠的 Bruch's 膜和 RPE,无 CNV 形成

管是来自脉络膜毛细血管的增殖血管,通过 Bruch 膜的裂口而扩展,于 Bruch 膜与 RPE 之间、或神经视网膜与视网膜色素上皮之间或位于 RPE 与脉络膜之间增殖形成,多见于黄斑部,因而严重地损害了中心视力。目前对脉络膜新生血管的发病机制尚不明确。

缺乏适当的模型尤其是评估方法已阻碍了对 CNV 的发病机制及与相关的治疗老年性黄斑变性的研究[3]。因此,建立重复性好、成本低的动物模型及评估方法对深入研究 AMD 的发病机制、病理改变及临床治疗具有非常重要的临床意义。我们用能量输出功率 250 mW,直径 50 μm,曝光时间0.05 s 的氪红激光,在距视盘 1.5 ~ 2.0 PD 处,避开血管,每眼 5 个激光点,诱发小鼠 CNV 模型;对于新生血管形态的观察,我们采用了荧光 FITC-dextran[4,5]心内灌注,抗体标记 Bruch 膜及 RPE,视网膜铺片,共聚焦显微镜观察视网膜铺片的方法。具体为:①选用 2×10^6 高分子量的 FITC-dextran 荧光素灌注小鼠心脏,2×10^6(Fluorescein isothiocya nate,FITC),是异硫氰酸荧光素在溶解状态下呈黄绿色荧光。2×10^6 高分子质量的 FITC,不会通过毛细血管壁渗漏,能滞留在血管内,发出绿色荧光从而标记出 CNV。②选用抗体标记 Bruch 膜及 RPE 显红色,将发绿荧光的血管与染为红色的 Bruch 膜及 RPE 区分开来,还未见国内有报道。③通过共聚焦显微镜观察视网膜铺片清晰地显现新生血管 CNV 在 Bruch 膜及 RPE 间的走形及形态分布。④用 Image-Pro Plus 软件对 CNV 的大小进行分析。我们的诱导及评估方法发现模型 CNV 发生率为 96%左右,模型在光凝后第 3 天可观察到新生血管生长,第 7 天达高峰。

氪红激光光凝促使 Bruch 膜破裂,诱导 C57BL/6 小鼠脉络膜新生血管生长,该模型成模时间短、成模率高是研究视网膜新生血管的较为理想的动物模型。我们选用用高分子量的心脏荧光素灌注、抗体标记 Bruch 膜及 RPE、共聚焦显微镜检测视网膜新生血管生成评估模型的方法直观、可靠、可行,Image-ProPlus 软件以微米为单位对 CNV 定量分析,为今后探究视网膜新生血管疾病发生机制和治疗 CNV 相关疾病提供可靠实验依据。

参 考 文 献

[1] McCarty C A,Mukesh B N,Fu C L,et al. Risk factors for age-related maculopathy:the visual impairment project[J].Arch Ophthalmol,2001,119(10):1455-1462.

[2] 杨秀梅,王雨生.脉络膜新生血管动物模型[J].国际眼科纵览,2006,30(3):166-170.

[3] Bora N S, Kaliappan S, Purushottam J, et al. CD59, a complement regulatory protein,controls choroidal neovascularization in a mouse model of wet-type age-related macular degenerationl[J].The Journal of Immunology,2007,178:1783-1790.

[4] 李娟娟.光动力法诱导大鼠视网膜新生血管动物模型的建立[J].国际眼科杂志,2008,8(9):1764-1766.

[5] Damato R,Wesolowski E,Smith l E. Microscopic visualization of the retina by angiography with high molecular weight fiuorescein-labeled dextrans in the mouse[J].Microvasc Res,1993,46(2):135-142.

[6] Takebana Y,kurokawa T,kitamura T,et al.Suppression of laserindaled choroidal neovascularization by oral Tranilast in the rat[J].Invest Opthamol Vis Sci,1999,40(2): 459.

[7] 王雨生.脉络膜新生血管性疾病[M].北京:人民卫生出版社,2007.160-175.

[8] Jiang W,Chiou G C Y. The development of age related maculardegeneration (AMD) experimental models[J].Int J Ophthalmol,2007,7(3):585-589.

[9] 李学晶,唐由之,王慧娟,等.脉络膜新生血管动物模型的建立与评估[J].国际眼科杂志,2009,2(9):246-249.

[10] 李 岱,曾水清,陈 晓,等.激光诱导鼠脉络膜新生血管的两种检测方法对比研究[J].咸宁学院学报(医学报),2005,19(6):465-468,472.

[11] Criswell M H, Ciulla T A, Hill T E,et al.The squirrel monkey:characterization of a new-worn mate model of experimental choroidal neovaseularization and comparison with the macaque[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2004,45(2):625-634.

[12] Edelman J L,Castro M.Quantitative image analysis of laser induced choroidal neovascularization in rat[J].Exp Eye Res,2000,71(5):523-533.

(责任编辑:冉明会)