维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2008)05-0588-04

早产儿视网膜病变动物模型的简易制备

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:采用经济,简易的方法制备早产儿视网膜病变(Retinopathy of prematurity,ROP)的可量化动物模型。方法:新生鼠仔 44 只称重随机分为 2 组,实验组于出生后 7d 置于 75%±1%氧箱内饲养 5d 然后回到正常空气饲养 5d,对照组于正常环境饲养。ADP 酶法视网膜铺片了解视网膜血管的改变,组织切片 HE 染色计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数,免疫组化法观察视网膜各层血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)的表达。结果:持续高浓度氧使鼠仔视网膜血管收缩变窄甚至闭塞,视网膜中央部大片无灌溉区,相对缺氧使视网膜大血管明显扩张、迂曲,大量结构异常的新生血管形成。实验组平均每个切面突破视网膜内界膜的内皮细胞核数为(32.800 0±0.767 8)个,对照组平均为(2.750 0±0.716 4)个,两者比较差异有显著性意义($P<0.01$);对照组 VEGF 染色较实验组减弱。结论:该模型可重复性强、稳定性高、可定量研究。是研究早产儿视网膜病新生血管发生机制及相关治疗的合适模型。

【关键词】视网膜新生血管;新生鼠;疾病模型

【中国图书分类法分类号】R772.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-13

Preparation of a simple animal model of retinopathy of prematurity

ZHANG Qin, et al

(*Department of Neonatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare a quantified animal model of retinopathy of prematurity by economic and easy method. *Methods*: A total of 44 postnatal day 7 wistar rats were randomly assigned into 2 groups according to different oxygen inhalation concentration(n=22). Experimental group was exposed to 75% oxygen for 5 days, and them deprived of oxygen supply suddenly and exposured in air for 5 days. The Control group was exposed to room air in same experiment condition. The retinal vascular development and proliferation were evaluated by stretched preparation (ADPase stained retina)and eyeball cross-section, The expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) was detected by immunohisto-chemical stain. *Results*: The central vessels became tortuous and constricted and the central avascular area increased in high-concentration oxygen environ-ment. But hypoxia environment made great vessels of retina broaden and abnormal curvature become obvious, neova-scularization was seen in the Experimental group. The average numbers of neovascular nuclei which breakthrough limiting membrane of amphiblestrodes in the Experimental group and the Control group were 32.800 0±0.767 8 and 2.750 0±0.716 4 respectively. Stain of VEGF was weaker in the control group than in the treated group. *Conclusion*: The rat modle of retinopathy of prematurity has powerful repeatability, high constancy and can be used in quantitative study. It is a suitable mode to study the pathogenesis and therapy of retinopathy of prema-turity.

【Key words】New vessels of retina; Neonatal rat; Disease mode

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,目前已成为世界范围内儿童致盲的主要原因,为了更好的对此病进行研究我们采用经济,简易的方法制备早产儿视网膜病变的可量化动物模型。

作者介绍:张 琴(1975-),女,主治医师,研究方向:新生儿疾病。

通讯作者:韦 红,女,副教授,E-mail:waehong@sina.com。

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC,2007BB5326)。

1 材料和方法

1.1 材料设备

100%湿润医用纯氧气由重庆医科大学儿童医院氧气科

维普资讯 http://www.cqvip.com

提供，市售 50cm × 30cm × 30cm 半透明无毒硬塑料整理箱，容器的两端侧壁对角线位置分别打孔，一端接进气管，连氧气瓶；另一端接出气管，连于测氧仪。容器的侧壁中上部任一位置（最好距离进气口 10cm，以防打孔时塑料破裂和母鼠啃食）打孔放入饮水瓶的奶嘴，各管道连接口以双面胶粘贴，箱盖与箱体连接处以透明胶粘贴，确保密闭。容器底铺钠石灰颗粒与木屑，保持容器内干燥。用瓷碗装入饲料置于箱内。

1.2 实验动物及分组

同日出生的清洁级 7 日龄 wistar 鼠仔 44 只，雌雄不限，由各自母鼠哺乳，称重统一编号后随机分为实验组及对照组，每组 22 只。由我院动物实验中心提供。

1.3 模型的制备

将实验组 7d wistar 鼠仔及其哺乳母鼠置入密闭的氧箱内，接 100%湿润医用纯氧，调节气体流量 0.5~0.75L/min，每天 3 次（9am，2pm，6pm）用测氧仪监测出气管中的氧浓度使其保持在（75 ± 1）%；温度保持 22℃ ~ 25℃，湿度 50% ~ 70%。2d 1 次更换箱内垫料、饲料及母鼠，开箱约 0.5h。在此环境中饲养 5d 后，从氧箱中取出，在常氧环境中饲养。对照组始终在常氧环境中饲养。

1.4 视网膜铺片

对照组与实验组分别于 12d，14d，17d 取鼠仔各 4 只进行视网膜铺片（ADP 酶染色法）。具体方法：1%水合氯醛腹腔麻醉（1ml/kg），断头取出眼球，眼科剪剪去除角膜，眼科镊夹住视神经根部，用小毛刷由视神经根部轻轻向前挤压，去除晶状体和玻璃体，剥离视网膜，固定于 4%多聚甲醛过夜，用 Tris- 马来酸缓冲液漂洗，置于 37℃反应液中孵育 15min，在 10%硫化铵中反应 1min，在光学显微镜下观察视网膜血管形态、分布及数量。

1.5 视网膜组织切片制作及观察

于 17d 将两组鼠仔各 10 只颈椎脱臼处死，摘取眼球并编号。将眼球浸泡在 4%多聚甲醛固定液中，固定 48h 后常规脱水，石蜡包埋，平行于角膜至视乳头的矢状位连续切片，贴片，厚度 4~6μm，每只眼球选取 20 张切片（去掉有视神经的切面）用于检查。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血管内皮细胞核数量，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。

1.6 VEGF 的免疫组化检测

从两组中各随机抽取 20 张未经染色的切片，进行 VEGF 免疫组化检测（SABC 法），DAB 显色，以细胞胞浆呈棕黄色为阳性，观察视网膜各层中 VEGF 的表达。一抗由北京中杉金桥生物技术有限公司提供，二抗由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.7 统计学分析

所有数据以统计分析软件 SPSS10.0 进行分析，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用两组独立样本 t 检验分析方法比较各组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目。以 $P \leq 0.05$ 为差异有显著性统计学意义。

2 结 果

2.1 两组视网膜血管形态和分布的改变

2.1.1 对照组 12d 时，视网膜血管自视盘发出，向四周呈放射状均匀分布，管径较粗，分支较少但结构清晰，周边部视网膜血管网结构尚未形成，可见到少量无灌注区（图 1、3）。14d 时血管发育进一步成熟，分支良好，周边部视网膜血管网结构清晰，周边部无灌注区进一步减少，能分辨出深浅两层血管网（图 2、4）。17d 时血管基本成熟，可见两层血管网状结构通过螺旋形的交通动脉互相连接（图 5）。

2.1.2 实验组 12d 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，周边部仍可见部分小血管结构。14d 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（图 6）。17d 时大血管更加扩张、迂曲，视网膜中周部有大量新生血管形成，血管密度更加增高，但这些新生血管网结构及分布极其紊乱，丧失了正常的放射状及多角形结构，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 7、8）。

2.2 视网膜新生血管内皮细胞核计数结果

实验组鼠仔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 9）其突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目为 32.800 0 ± 0.767 8 个，对照组基本上未见突破内界膜的内皮细胞核，平均每张切片为 2.750 0 ± 0.716 4 个，内界膜下的细胞也无明显增殖（图 10），两组比较差异有显著性意义（$P<0.01$）。

2.3 VEGF 的免疫组化检测

视网膜切片中的棕黄色颗粒为 VEGF 阳性表达。显微镜下观察，实验组和对照组均有 VEGF 的棕黄色颗粒，对照组的阳性颗粒数量和强度均小于实验组（图 11）。实验组表达主要位于内丛状层和内核层毛细血管及内皮细胞的细胞质内（图 12）。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（D）以表示阳性产物的强度。对照组 D 为 0.275 ± 1.570；实验组 D 为 0.573 5 ± 1.040 0，两者差异有显著性。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

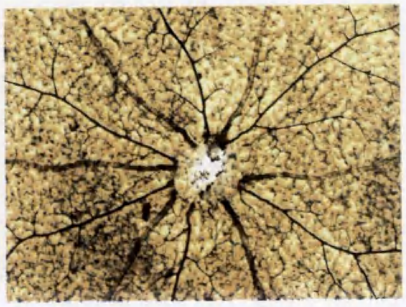


图 1 对照组 12d 视网膜铺片 ADP 酶染色×400

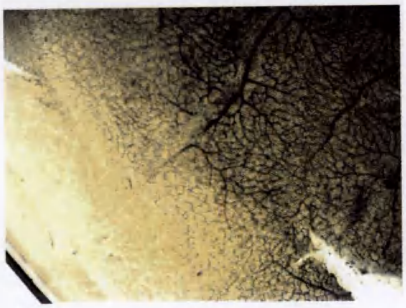


图 2 对照组 14d 视网膜铺片 ADP 酶染色×400



图 3 对照组 12d 视网膜铺片 ADP 酶染色×400

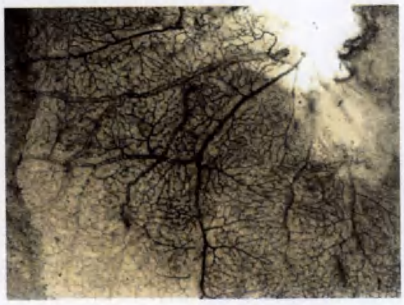


图 4 对照组 14d 视网膜铺片 ADP 酶染色×400

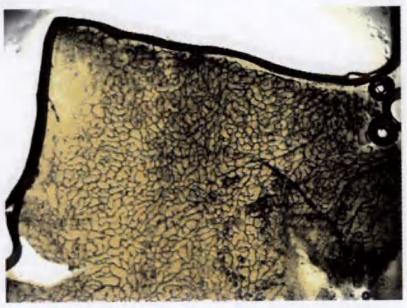


图 5 对照组 17d 视网膜铺片 ADP 酶染色×400

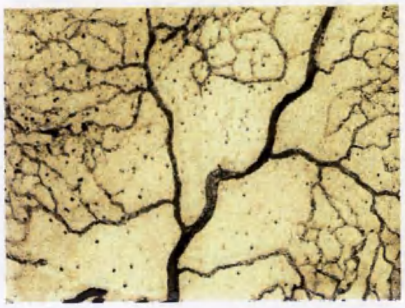


图 6 实验组 14d 视网膜铺片 ADP 酶染色×400



图 7 实验组 17d 视网膜铺片 ADP 酶染色×400

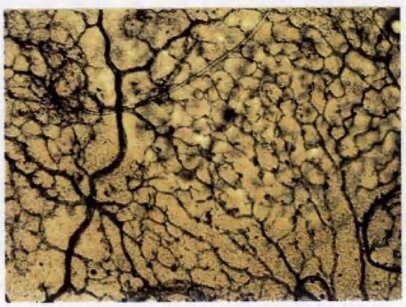


图 8 实验组 17d 视网膜铺片 ADP 酶染色×400



图 9 实验组视网膜 HE 染色×400

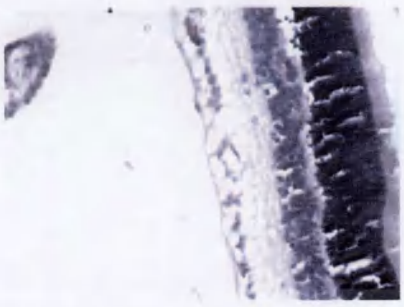


图 10 对照组视网膜 HE 染色×400

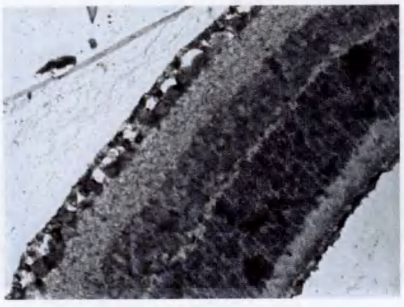


图 11 对照组视网膜 VEGF 免疫组化染色×400

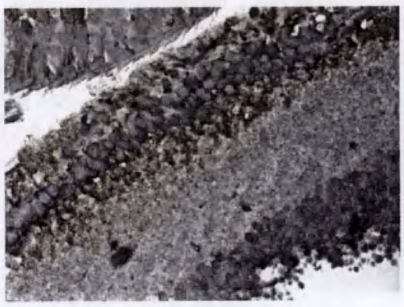


图 12 实验组视网膜 VEGF 免疫组化染色×400

3.1 ROP 动物模型的制作

在胚胎早期视网膜没有血管,由玻璃体动脉供应营养。胎龄 4 个月时视网膜血管由视盘开始发育,逐渐向周边发展。胎龄 8 个月时血管发育到达鼻侧周边部分,直至胎儿足月,视网膜颞侧血管才发育成熟。因此,早产婴儿其周边视网膜血管尚未发育,存在着血管未发育区域。这是早产儿视网膜病的发病基础。早产儿胎龄越小,视网膜血管发育越不成熟。ROP 真正的发病机制尚未阐明,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,高氧却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

维普资讯 http://www.cqvip.com

一系列细胞因子如：血管内皮生长因子、色素细胞衍生因子等大量分泌，促使新生血管大量生成，导致 ROP[1]。对 0～7d 的小鼠玻璃体动脉消退和视网膜血管形成的研究表明，7d 的小鼠视网膜血管发育最接近早产儿视网膜血管的特点[2]将这种小鼠置于高氧环境中会出现视网膜血管增生等类似与 ROP 的表现，我们选择 7d 龄 wistar 新生鼠研究 ROP，是因为这种鼠具备的特性适合制备氧诱导的血管增生性视网膜病模型[3]。建立早产儿视网膜病变动物模型的关键是箱内的氧浓度是否稳定。预实验中我们发现氧浓度过低对新生血管的形成不利，而氧浓度过高 >80%则会使小鼠及哺乳母鼠的死亡率明显上升。同时箱内温度、湿度的控制也是影响小鼠存活的重要因素。本实验采用由市售整理箱改制成高氧箱，箱底铺钠石灰颗粒可保持干燥，使用透明胶密闭便于观察和换母鼠和饲料等物，且密闭性高。通过控制室内的温度和湿度间接控制箱内温度.

3.2 视网膜新生血管指标的量化

由于正常的视网膜血管不会突破内界膜，故突破内界膜进入玻璃体腔的血管应视为新生血管[4]，计数突破内界膜的内皮细胞核来反映视网膜血管的增殖具有科学性[2]。HE 染色可很好的显示视网膜结构和突破内界膜的血管内皮细胞核，使计数工作简便易行。为和玻璃体动脉内皮细胞核区别，我们仅计数与内界膜有联系的血管内皮细胞细胞核。视网膜铺片能直接反映视网膜血管的形态和分布，更加直观。视网膜 VEGF 免疫组化的检测能半定量反映在高浓度氧环境中引起视网膜相对缺氧从而引起一系列细胞因子如：血管内皮生长因子大量分泌，促使新生血管大量生成。最后导致 ROP。

此模型的建立简便经济，易于实施，结果稳定，可重复性强。是研究早产儿视网膜病新生血管发生机制及相关治疗的合适模型。

参 考 文 献

[1] Smith LE. Pathogenesis of retinopathy of prematurity[J]. Semin Neonatol,2003;8(6):469-473.

[2] Smith LEH,Wesolowski E,McLellan A,et al.Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1994;35(1):101-106.

[3] Ventresca MR,Gonder JR,Tanswell AK. Oxygen-induced proliferative retinopathy in the newborn rat[J]. Can J Oph thalmol,1990;25(2):186-189.

[4] 张惠蓉，主编.视网膜临床和基础研究[M]. 太原：山西科学技术出版社，1995.323-325.

（责任编辑：谭乐勤）

（上接第 577 页）

and TNF-α[J]. Diabetologia,2007;50(10):2221-2223.

[12] Vitkova M,Klimcakova E,Kovacikova M,et al. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity[J]. J Clin Endocrinol Metab,2007;92(6):2330-2335.

[13] Lafontan M,Moro C,Sengenes C,et al. An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides:the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2005;25(10):2032-2042.

[14] Moro C,Klimcakova E,Lolmede K,et al. Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue[J]. Diabetologia,2007;50(5):1038-1047.

（责任编辑：关蕴良）

（上接第 580 页）

[6] 龚振明，傅继梁.p16INK4a 基因及调控[J].生物化学与生物物理进展，2002;29:193-196.

[7] Palmisano WA,Divine KK,Saccomanno G,et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. Cancer Res,2000;60(21):5954-5958.

[8] Belinsky SA,Nikula KJ,Palmisano WA,et al. Aberrant met hylation of p16(IN K4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998;95(20):11891-11896.

（责任编辑：谭乐勤）