

高氧诱导 SD 大鼠 ROP 动物模型的建立

迟 静¹, 马晓华², 毕宏生², 季 鹏²

基金项目: 中国山东省科技攻关计划资助项目 (No. 2008GG-30002031)

作者单位: ¹(250014) 中国山东省济南市, 山东中医药大学临床医学学院; ²(250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学附属医院眼科

作者简介: 迟静, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 青光眼。

通讯作者: 马晓华, 女, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 青光眼、眼视光学. mxh666@tom. com

收稿日期: 2011-03-30 **修回日期:** 2011-06-27

Establishment on the SD rats with the hyperoxia-induced animal model of ROP

Jing Chi¹, Xiao-Hua Ma², Hong-Sheng Bi², Peng Ji²

Foundation item: Shandong Science and Technology Research Project, China (No. 2008GG30002031)

¹Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiao-Hua Ma. Department of Ophthalmology, Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China. mxh666@tom. com

Received: 2011-03-30 **Accepted:** 2011-06-27

Abstract

• **AIM:** To investigate the SD rats which were used to establish hyperoxia-induced retinopathy of prematurity (ROP) model, providing experimental basis to study the pathogenesis and treatment of disease.

• **METHODS:** Twenty-four newborn SD rats were divided into two groups, one group were placed in IPR-2 mice separate package where given hyperoxia [(75 ± 2)% O₂] from postnatal day 1 to 7 (P1-7) and after then, exposed to room air (P8-14), the other group placed in room air (P1-14). At P7, P14, retinal flatmounts were obtained to study the retinal vascular pattern; at P14, the eye-tissue-sections were obtained and stained with hematoxylin-eosin to analyze the extraretinal neovascularization; stained immunohistochemically to evaluate the retinal expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF), CD₃₄ protein under light microscopy.

• **RESULTS:** Retinal flatmounts: A large number of the capillary-free area and neovascularization were observed

in experimental group, which was more than that in control group. Tissue-sections stained with hematoxylin-eosin: The number of vascular cell nuclei in experimental group was obviously more than that in control group. Immunohistochemical study: CD₃₄ and VEGF protein expressed positive in the extraretinal vascular cells anterior to the internal limiting membrane. VEGF semi-determination showed the mean gray scale values was lower in experimental group than that in control group, but the area density values in experimental group was higher than that in control group. The development condition of rats was normal.

• **CONCLUSION:** The SD rats with the hyperoxia-induced animal model of ROP can successfully produce retinal neovascularization, and the model can be a reliable animal model as exploring mechanisms and treatment of disease.

• **KEYWORDS:** high-oxygen environment; animal model of ROP; VEGF

Chi J, Ma XH, Bi HS, *et al.* Establishment on the SD rats with the hyperoxia-induced animal model of ROP. *Guji Yanke Zazhi(Int J Ophthalmol)* 2011;11(8):1330-1333

摘要

目的: 探讨用 SD 大鼠建立高氧诱导的早产儿视网膜病变 (ROP) 动物模型, 为研究该病的发病机制及治疗提供理论基础。

方法: 新生 SD 大鼠 24 只分为 2 组, 每组 12 只, 实验组大鼠置于 IPR-2 小鼠隔离包, 连续吸高浓度 O₂ 7d 后, 再置于空气中饲养 7d; 对照组大鼠置于空气中饲养 14d。通过视网膜铺片观察视网膜血管、组织切片 HE 染色观察视网膜新生血管、免疫组织化学观察 VEGF 和 CD₃₄ 蛋白的表达。**结果:** 视网膜铺片显示实验组见大量无灌注区及新生血管芽, 较对照组明显多。HE 染色显示实验组内皮细胞数较对照组明显多。免疫组织化学表明 CD₃₄ 和 VEGF 在突破内界膜的细胞呈阳性表达。VEGF 半定量测定显示实验组平均灰度值较对照组低, 面密度值较对照组高。两组鼠生长发育均未见明显异常。

结论: 高氧诱导 SD 大鼠成功产生视网膜新生血管, 可作为探究 ROP 疾病发生机制和治疗方法的可靠动物模型。

关键词: 高氧环境; 早产儿视网膜病变动物模型; VEGF

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 08. 007

迟静, 马晓华, 毕宏生, 等. 高氧诱导 SD 大鼠 ROP 动物模型的建立. 国际眼科杂志 2011;11(8):1330-1333

0 引言

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 与早产、低出生体质量以及吸高浓度氧气有密切关系,是由于早产儿视网膜血管尚未发育完全,产生视网膜新生血管及纤维组织增生所致。虽然关于 ROP 的临床研究取得了许多成果,但仍受到研究对象和医学伦理等问题的限制。高氧诱导的 ROP 模型先后在猫、家兔、犬、小鼠、大鼠等动物中建立,后两者由于体型小、繁殖快、品种品系多、方法较为成熟且成功率高等特点,得到了广泛的应用^[1]。产后 3wk 新生鼠的视网膜发育与人孕 36wk 的胎儿相似^[2],因此用新生大鼠作 ROP 模型在这些研究中起着重要作用。本研究通过对 SD 大鼠行高氧诱导视网膜病变模拟 ROP,以进一步了解 ROP 的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康雌性 SD 大鼠 4 只(每只平均生育 8~14 只),新生 SD 大鼠共 24 只,由山东大学动物中心提供。各组新生鼠在生后每天换辅料、注射药物前,用电子分析天平称量体质量,观察每天的体质量变化,同时记录睁眼时间及鼠毛的发育情况等。其平均体质量变化相当($P > 0.05$),平均 5~7d 皮肤绒毛发育,13~14d 睁眼,生长发育较正常。VEGF 多克隆抗体(兔抗大鼠),CD₃₄多克隆抗体(兔抗大鼠),5g/L 氯胺酮(重庆制药六厂),25g/L 氯丙嗪(江苏省金坛市制药厂)。IPR-2 小鼠隔离包(苏州市通安医学实验设备厂),OX-100A 型数字测氧仪(浙江建德市新安江分析仪器二厂),组织切片机(德国 Leica),由山东大学实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 ROP 模型的建立 SD 大鼠分娩完成后立即将其与新生鼠一起置于 IPR-2 小鼠隔离包,接入 100% 湿润医用纯 O₂,流量控制在 0.5~0.75L/min,使包内保持(75±2)% O₂浓度,测氧仪全程检测,确保 O₂浓度恒定。每日将笼盒取出,更换饲料、加食水。连续吸高浓度 O₂ 7d 后,再置于空气中饲养 7d。日光照明,环境温度控制在(23±2)℃。

1.2.2 实验分组 新生 SD 大鼠 24 只,依据饲养环境,实验组新生 SD 大鼠 12 只,同日龄未吸 O₂ 新生鼠 12 只作为对照组。实验组新生大鼠置于 IPR-2 小鼠隔离包,连续吸高浓度 O₂ 7d 后,再置于空气中饲养 7d;对照组置于空气中饲养 14d。生后 7d(P7)、14d(P14)为观察时间点。P7 时两组各 4 只新生鼠用于视网膜铺片。P14 时每组各有 4 只鼠分别用于视网膜铺片及组织学研究。

1.2.3 视网膜铺片观察视网膜血管 P7、P14 时 5g/L 氯胺酮 + 25g/L 氯丙嗪 ip,心腔穿刺并注射墨汁,摘除双眼眼球,置于 40g/L 多聚甲醛中固定 48h,手术显微镜下剥下视网膜,4 方向剪开视网膜后铺于载玻片上,滴 500mL/L 甘油,显微镜下观察视网膜血管并照相分析。采用双盲法,在 100 倍视野下,用图像分析系统对每个时间点视网膜铺片的毛细血管无灌注区进行分析,计算出视网膜无灌注区所占的比例。

1.2.4 HE 染色观察视网膜新生血管 P14 时各组 4 只鼠断头处死,摘除双眼眼球,手术显微镜下去除角膜和晶状体,置于 40g/L 多聚甲醛中固定 48h,逐级脱水,浸蜡包

表 1 各组 P7 和 P14 时视网膜毛细血管无灌注区比例

组别	视网膜毛细血管无灌注区比例	
	P7	P14
对照组	5.11 ± 2.1	3.80 ± 1.6
实验组	51.60 ± 10.3	31.73 ± 9.5

表 2 各组 P14 时突破内界膜的内皮细胞数和细胞 VEGF 表达的平均灰度及面密度值

组别	内皮细胞数 (个/mm ²)	平均灰度值	
		平均灰度值	面密度值 (AD × 10 ⁻³)
对照组	1.26 ± 0.18	117.2 ± 7.9	7.18 ± 3.76
实验组	25.21 ± 2.28	102.5 ± 8.7	40.97 ± 4.35

埋,做矢状面平行视神经的连续 4μm 切片,各组随机抽取 30 张(不包括有视神经断面的),常规 HE 染色,以突破视网膜内界膜的血管为新生血管。双盲法计数血管内皮细胞,计算出每眼每张切片突破内界膜的内皮细胞数。

1.2.5 免疫组织化学观察 VEGF 和 CD₃₄ 蛋白的表达 各组随机抽取 20 张未经染色的切片,应用 SABC 法染色。阳性标准:胞质有棕黄色颗粒着色。采用双盲法,于光学显微镜 400 倍视野下,每个时间点的 VEGF 切片图像随机采集 7 幅,取其均值作为每张的结果,输入图像分析系统,对图像中阳性反应部位进行平均灰度和面密度(AD)分析。平均灰度值越低,说明免疫组织化学信号越强;AD 值越高,表明阳性目标面积越大,相应的阳性细胞数越多。

统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行统计分析,实验过程中对视网膜无灌注区的比例、内皮细胞数、细胞 VEGF 表达的平均灰度及 AD 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对两组均数比较采用 *t* 检验;对两因素间的关系采用双因素相关分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜血管形态变化 实验组见大量无灌注区及新生血管芽,较对照组明显增多($P < 0.05$)。对照组,P7 和 P14 时均显示视盘周围放射状分布的视网膜血管主干较粗,毛细血管网发育良好,无明显无灌注区及新生血管芽。实验组,P7 时视盘旁血管主干较细,毛细血管发育不良,无灌注区较对照组明显多;P14 时,实验组视盘周围至中轴部视网膜深层毛细血管广泛闭锁,大量无灌注区,无灌注区边缘见新生血管芽(表 1,图 1)。

2.2 视网膜新生血管形态变化及内皮细胞计数 对照组,视网膜极少见新生血管,突破内界膜的内皮细胞少。实验组新生血管较多,部分形成血管索。突破内界膜的内皮细胞数较对照组明显增多($P < 0.05$,表 2,图 2)。

2.3 VEGF 和 CD₃₄ 的表达 CD₃₄ 和 VEGF 在突破内界膜的细胞呈阳性表达。VEGF 半定量测定显示实验组平均灰度值较对照组低,AD 值较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$;表 2;图 3,4)。

3 讨论

在建立氧诱导 ROP 的动物选择方面,目前国内外目前大多集中选择 C57BL 小鼠、SD 大鼠、Brown Norway 有色

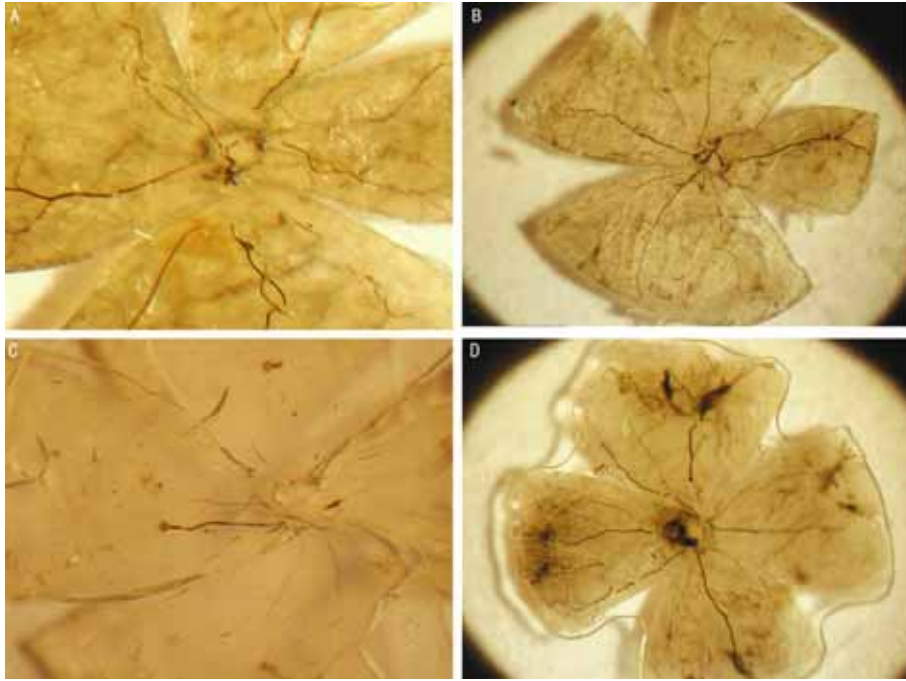


图1 各组新生大鼠视网膜血管形态变化 A:对照组 P7;B:对照组 P14; C:实验组 P7;D:实验组 P14。

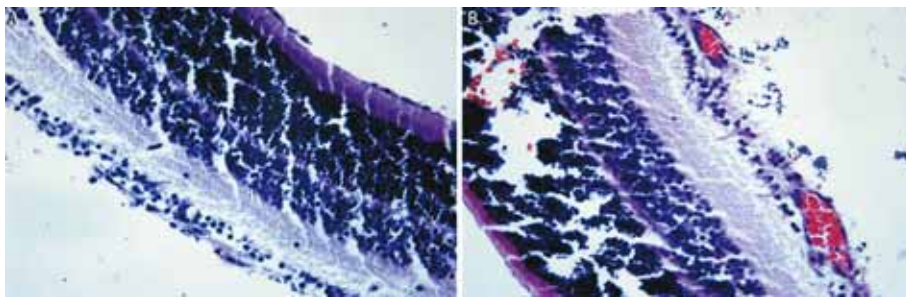


图2 各组视网膜新生血管形态变化(HE×400) A:对照组; B:实验组。

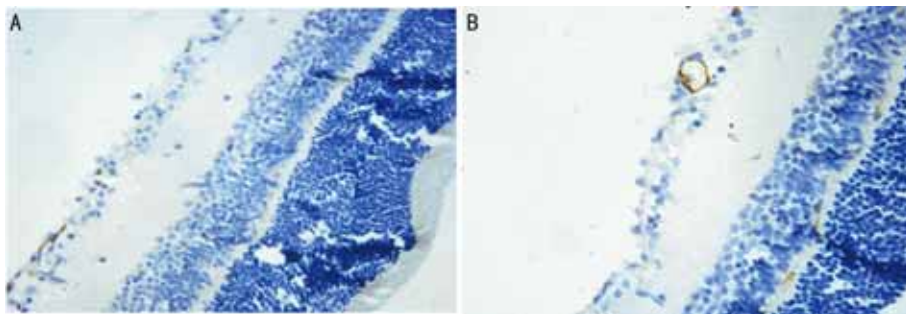


图3 各组视网膜中 CD₃₄ 的表达(SABC×400) A:对照组;B:实验组。

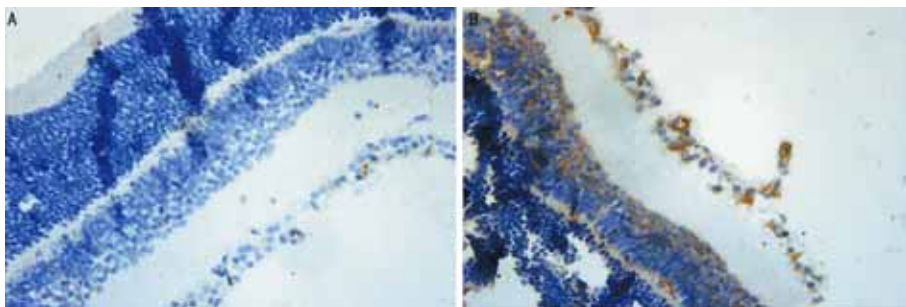


图4 各组视网膜中 VEGF 的表达(SABC×400) A:对照组;B:实验组。

大鼠等啮齿类动物,该类动物生理性视网膜血管都是从血管周围的血管前体细胞发育而来,这点与人类相似。相对于小鼠而言,大鼠耐高氧能力及生命力要明显增强;并且

出生后第17d的大鼠相对于同鼠龄的小鼠而言,眼球体积大,可为玻璃体腔内注射提供有利的操作条件^[3]。

为探究ROP的发病机制和治疗方法,建立具有相似

的典型病理特征并且重复性高的动物模型是保证后期研究工作结果客观可靠的前提条件。目前,国内外也有许多实验通过制作 ROP 鼠模型对 ROP 的治疗进行研究。宋哲等^[4]通过可变氧环境下形成 ROP 模型成型率可达 66.7%,用间接检眼镜检查法排除非 ROP 模型。Barnett 等通过研究增加产仔数,导致大鼠幼仔体质下降、营养不良,有助于增加新生血管的形成,使制作的模型也更接近于早产儿患病经历的条件^[5]。Penn 等^[6]将新生鼠放在不同的氧环境中,制作视网膜新生血管的模型,以期通过类固醇达到治疗 ROP 的目的。Akula 等^[7]用氧疗法诱导 SD 大鼠视网膜病变对眼轴长、视网膜表面积,以及前到后轴向长度的比率进行了评价。Rabinowitz 等^[8]用 43 例野生型小鼠进行研究,实验组出生后 5d 接触 750mL/L 氧气,随后 5d 接触室内空气(相对缺氧),对照组从出生一直接触室内空气,从而制作出 ROP 动物模型。

经过高氧环境、正常氧环境(相对低氧)的可变氧环境下形成 ROP 模型的过程:(1)刚出生的 SD 大鼠视网膜血管发育不成熟,在高氧刺激下,视网膜血管首先发生可逆性、痉挛性收缩,但在持续高氧作用下,小血管便发生闭塞,形成视网膜无灌注区,刺激视网膜组织 VEGF 分泌增多,引起血管内皮细胞增殖。(2)幼鼠再返回到正常氧环境中,无灌注区可引发缺血、缺氧,刺激视网膜组织 VEGF 分泌增加,引起血管内皮细胞大量增殖。大量的 VEGF 产生 2d 便可产生新生血管^[9]。在本研究中,我们定制专门的 IPR-2 小鼠隔离包饲养动物,测氧仪全程检测,确保 O₂ 浓度恒定在(75±2)%,建立的 SD 大鼠 ROP 模型较成功,经免疫组织化学证实,视网膜新生血管发生率达 100%,为实验研究的准确性奠定了基础。饲养过程中,我们每日将笼盒取出,更换饲料、加食水,保证大鼠正常的饮食和保证生活环境的干燥舒适,保持饲养环境安静,避免嘈杂,从

而提高了动物的成活率。

本研究中通过高氧-正常氧环境形成了 ROP 模型,通过自身繁育 SD 大鼠不仅降低了成本,而且具有体型小、生长快、繁育性能好、存活率高、重复性好、制作周期短、应用广泛、方法较为成熟且成功率高、不受外界环境影响等优点,同时新生鼠视网膜发育与胎儿相似,这些为以后实验研究提供 ROP 模型奠定基础。

参考文献

- 1 单海冬,赵培泉.早产儿视网膜病变的动物模型.中华眼底病杂志 2005;21(5):340-343
- 2 Blaschke AJ, Staley K, Chun J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 1996;122(4):1165-1174
- 3 张敏,贾丽丽,宋蓓雯,等.小鼠视网膜新生血管模型的建立及特征.国际眼科杂志 2008;8(8):1542-1545
- 4 宋哲,黎晓新.可变高氧环境下 SD 大鼠可形成 ROP 模型.国际眼科杂志 2008;8(4):729-731
- 5 Barnett JM, Yanni SE, Penn JS. The development of the rat model of retinopathy of prematurity. *Doc Ophthalmol* 2010;120(1):3-12
- 6 Penn JS, Rajaratnam VS, Collier RJ, et al. The effect of an angiostatic steroid on neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(1):283-290
- 7 Akula JD, Favazza TL, Mocko JA, et al. The anatomy of the rat eye with oxygen-induced retinopathy. *Doc Ophthalmol* 2010;120(1):41-50
- 8 Rabinowitz R, Katz G, Rosner M, et al. The effect of thalidomide on neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(6):843-848
- 9 Fruttiger M. Development of the mouse retinal vascular: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(2):522-527