

家兔常见角膜新生血管模型的建立

魏欣, 王琳, 邓应平

作者单位: (610041) 中国四川省成都市, 四川大学华西医院眼科
作者简介: 魏欣, 博士, 讲师, 曾留学于美国哈佛医学院, 研究方向: 角膜病、青光眼。

通讯作者: 邓应平, 博士, 副主任, 教授, 研究方向: 角膜病. weixin_1982@163.com

收稿日期: 2011-10-12 修回日期: 2012-01-05

Establishment of common corneal neovascularization models in rabbits

Xin Wei, Lin Wang, Ying-Ping Deng

Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Ying-Ping Deng, Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. weixin_1982@163.com

Received: 2011-10-12 Accepted: 2012-01-05

Abstract

• Corneal neovascularization (CNV) is a leading cause of blindness. In the study of human corneal diseases, the rabbits have many advantages, so the rabbit CNV model is the most important CNV animal model. In this paper, CNV models of several rabbits will be introduced, from the making method, mechanism, advantages to disadvantages.

• KEYWORDS: corneal neovascularization; rabbit; animal model

Wei X, Wang L, Deng YP. Establishment of common corneal neovascularization models in rabbits. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(3):444-446

摘要

角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 是致盲的重要原因之一。由于家兔在研究人类角膜疾病方面具有多方面的优势, 因此家兔 CNV 模型是目前最重要的 CNV 动物模型。我们就几种常用的家兔 CNV 模型的制作方法、机制和优缺点作逐一介绍。

关键词: 角膜新生血管; 家兔; 动物模型

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.03.20

魏欣, 王琳, 邓应平. 家兔常见角膜新生血管模型的建立. 国际眼科杂志 2012;12(3):444-446

0 引言

家兔属哺乳纲、兔科、穴兔种, 在眼科实验研究中, 家兔是最常用的动物, 其主要优点在于: (1) 家兔具有相对较大的眼球, 这令其手术操作和观察方面具有了很大的优势; (2) 实验中可以同时对同一家兔的左右眼进行疗效观察, 可避免个体差异; (3) 家兔眼角膜与人类解剖结构相似^[1]。由于家兔模型在研究人类角膜疾病方面具有以上优势, 已成为角膜疾病实验研究的重要工具。

角膜的透明以低水平的血管生成因子和高水平的抗血管生成因子为基础, 而角膜炎症、角膜化学烧伤会打破这种稳态, 产生病理性角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV)。CNV 不但严重影响视力, 而且也是同种异体角膜移植术后发生排斥反应的高危因素, 在临床上是最棘手的问题之一^[2,3]。因此建立理想的 CNV 动物模型成为急需。一种好的 CNV 动物模型需要具有以下优点: 制作简便, 短期内可大量复制, 实验条件要求较简单, 其它因素容易控制。在实验中还应当遵守研究用动物的 ARVO 决议^[4]。近年来, 国内外学者不断探索, 利用多种方法复制出家兔 CNV 模型, 为实验研究提供了重要工具, 现将几种常用的家兔 CNV 模型综述如下。

1 诱导炎症性 CNV 模型

1.1 缝线法 家兔行全身麻醉, 结膜囊内滴 5g/L 地卡因眼液表面麻醉 3 次, 常规消毒后在手术显微镜下进行操作。置开睑器, 距颞上方 (9:00 ~ 2:00) 角巩膜缘 2.5mm 透明角膜处, 用 10-0 尼龙缝线作 5 针间断板层缝线, 深达 1/2 ~ 2/3 角膜厚度, 线距约 3.0mm, 在角膜表面留线头长约 1mm。术后每天局部氧氟沙星眼液滴眼 (4 次/d) 预防感染。术后第 3 ~ 7d 可见新生血管生长, 第 14 ~ 18d 新生血管生长达到高峰。Dana 等^[5]报道: 早在角膜缝线法术后 2h, 即可观察到角膜内 IL-1 α 和 IL-1 β 表达显著增多, 在 24h 达到顶峰, 可见 IL-1 充当了 CNV 形成早期的重要介质。该模型产生 CNV 的机制是缝线反应, 表现为炎症形式。

1.2 热灼伤法 目前该方法诱导家兔 CNV 通常使用凹面圆形不锈钢烧烙钉烧灼法^[6]。而火焰烧灼法、铁钉头烧灼法、平面圆形不锈钢烧烙钉烧灼法均易致角膜穿孔, 形成角膜白斑, 大小不一, 很难基线完全一致。烧灼术后第 5 ~ 8d 可见新生血管长入, 第 14d 左右新生血管达到高峰。Cooper 等^[7]认为: 角膜热损伤后, 白细胞浸润和新生血管增生主要是由于局部前列腺素合成增加, 前列腺素启动血管生长因子, 并使其持续产生作用。

1.3 化学烧灼法 建立该模型的基本原理为酸、碱等化学因素作用于角膜后造成角膜炎症等病变, 通过炎症反应诱导 CNV 的形成, 常用的化学药物有氢氧化钠、硝酸银及硝

酸钾等。以碱烧伤为例介绍建模方法:家兔行全身麻醉后,结膜囊内滴5g/L地卡因眼液表面麻醉3次,开睑器开睑。吸干眼表后,将半径为6mm的半圆形滤纸用1mol/L NaOH浸湿后,置于颞上方角膜缘内1mm处约30s,快速用生理盐水冲洗结膜囊及眼表。在碱烧伤后第3d,可见兔角膜缘血管网扩张,新生血管芽深入角膜缘,在角膜上方呈刷状迅速生长;第7d达到高峰期。

以上物理方法诱导建立家兔CNV模型均属于炎症性模型,为建立CNV的经典、传统方法,简单易行、所需仪器少,但所引起的新生血管生长方式及速度不稳定,血管密度不均匀,不便于定量分析及长期观察,此外,此类模型易产生细菌性角膜炎和角膜溃疡^[8,9]。虽然以上模型均属炎症性模型,但从单纯的物理刺激因素与复杂的化学因素引起的CNV来看,它们诱发新生血管的机制仍存在不同。以碱烧伤和缝线法做比较为例:碱为脂溶性物质,当与角膜接触后可引起组织蛋白的迅速凝固和细胞坏死,并与组织中的类脂质起皂化作用造成细胞膜结构的破坏,同时引起眼部血栓形成,从而造成组织的缺血;而缝线模型属于单纯物理刺激因素,基质内缝线的埋入可引起角膜缝线部位局部水肿、炎症细胞侵入^[10]。因此,实验者应根据实验着重观察的重点选择合适的家兔CNV模型。

2 角膜层间植入诱导剂模型

家兔角膜层间植入不同诱导剂以建立家兔CNV模型是近年来研究CNV最常采用的方式之一^[11],具体方法为手术切开角膜作一隧道,将含有刺激新生血管增生的诱导剂如内毒素、bFGF、VEGF、IL-1、肿瘤、二氧化硅等埋置于角膜层间以诱导CNV的形成。下面以最常用的层间植入缓释内毒素和bFGF缓释药丸诱导CNV动物模型的制作为例作具体介绍。

2.1 缓释内毒素聚合物诱导法 该方法首先需要制备缓释聚合物药丸:乙烯-醋酸乙烯酯聚合物(10% Elvax)50g处理后溶于二氯甲烷后与E. Coli内毒素混合并强力搅拌至均质悬液。不同含量内毒素药丸的计算公式:所需内毒素百分比 = $X / (0.1 + X)$, $X = \text{mg 内毒素} / \text{mL 聚合物}$ 。内毒素-Elvax悬液用消毒滴管滴入8孔玻璃板聚合,完全聚合凝固后,制成直径1mm大小,重量约1.5mg丸剂,紫外线消毒后-40°贮藏备用。植入角膜层间时所有步骤均在无菌条件下进行。家兔行全身麻醉后,结膜囊内滴5g/L地卡因眼液表面麻醉3次,在角膜中央做半厚切口3mm后向6:00位潜行分离形成角膜微袋,袋底距角膜缘2mm。用套管植入制备好的缓释药丸,术后涂抗生素眼膏抗炎。术后第3~5d可见新生血管自角膜缘血管网开始向角膜内延伸,第12~14d达到峰值^[12]。

内毒素诱生的CNV与局部内毒素的关系是剂量依赖性的,所以可以通过改变内毒素的浓度较严格地诱导出不同程度的CNV模型,以适于不同研究的需要,但需注意的是内毒素浓度过高会引发显著的角膜炎症,基质混浊而且新生血管生长易融合,影响新生血管测量和计算的准确性,浓度太低则诱导力度过小,不适合模型的要求。内毒素诱导CNV模型继发于炎症反应,并且炎症刺激反应与新生血管的诱生呈正相关,内毒素诱导CNV过程可能受

巨噬细胞分泌的bFGF因子调控,并且被巨噬细胞分泌的其它因子如TNF-2 α 和TGF-2 β 放大。当然,炎症反应并不是新生血管诱生的先决条件,比如bFGF和VEGF等缓释聚合物诱导的则是非炎症性CNV^[4]。

相比炎症性CNV家兔模型角膜全周新生血管丛生难以准确统计分析新生血管面积,内毒素诱导的CNV模型最大的优点是这种模型中CNV范围仅占角膜圆周的10%~20%,便于每日进行连续动态定量测定,并且术者可以通过控制内毒素的浓度较严格地诱导出轻、中、重度CNV模型,以适应不同研究的需要,但其缺点在于操作复杂、影响因素多、手术创伤本身即可引起CNV形成。

2.2 bFGF缓释药丸诱导法 首先制备bFGF缓释药丸:将聚甲基丙烯酸-2-羟乙酯(Hydron)和一定量的诱导剂bFGF混合后加入蔗糖铝(sucralfate),即可制成Hydron包裹的bFGF2-蔗糖铝缓释药丸。其后层间植入方法按常规制作^[13,14],具体参见“缓释内毒素聚合物诱导法”。bFGF是包含146个氨基酸、具有复杂功能的单链肽,目前已被多项体外实验证实具有对血管内皮细胞分化、增殖、迁移和趋化作用。具体机制如下:bFGF诱导的微血管内皮细胞可产生大量的u-PA,在血管生成早期起中心作用,u-PA将纤维蛋白溶酶原转化成具有酶活性的纤维蛋白溶酶,后者又可激活胶原酶,溶解新生血管起始缘的基膜,并导致内皮细胞进入三维的胶原基质,形成新的毛细血管芽^[15]。该模型相对于层间植入内毒素而言,具有了大部分植入内毒素法诱导CNV模型的优点,而且bFGF是一种新生血管的直接刺激因子,可排除炎症等间接新生血管刺激因素,这对于特定的新生血管抑制剂的疗效评价有重要意义。但同样,该模型操作比较复杂,影响因素多,诱导CNV时基线一致性难以控制。

3 免疫原性CNV模型

异种角膜移植或角膜基质内注射牛白蛋白等是诱发免疫原性家兔CNV模型的重要手段,可以用于探讨移植排斥反应的机制及治疗方法等^[16,17]。下面主要介绍异种角膜移植诱导的家兔免疫原性CNV模型:实验动物选择Hartley豚鼠以及新西兰大白兔,豚鼠处死后用315mm环钻切豚鼠中央角膜作为供体;新西兰大白兔作为受体,将其麻醉后采用常规穿透性角膜移植术式,用310mm环钻制作受体植床,用10-0尼龙线将供体角膜缝合于受体植床,共间断缝合12针,术毕采用抗生素眼膏涂眼。一般于术后6~8d植片会发生水肿,血管密集增殖。该模型的机制在于角膜中HLA抗原系统具有种系的差异性,可诱发免疫排斥反应:异种抗原进入机体后,引起机体产生免疫活性细胞或抗体,局部供体抗原与来自全身免疫系统的抗体和免疫细胞结合,形成抗原-抗体复合物,从而激活补体而产生免疫反应,导致淋巴细胞及因子浸润,诱导CNV。该模型非常好地模拟了角膜移植术后排斥反应而诱发的CNV,与人类疾病病程非常相近,是研究角膜移植术后排斥反应机制、发病原因、干预及其治疗的理想模型,缺点在于操作复杂,干扰因素较多。

4 其他家兔CNV模型

除了以上介绍的家兔CNV模型,还有一些不是非常

常用的造模方式,如对家兔角膜上皮机械刮除、角巩膜缘1.5mm宽结膜条带切除联合睑裂缝合术、机械造瓣等方法以诱导家兔CNV模型^[18]。方法多种多样,但基本上均有比较明显的缺点,如造模后动物个体差异较大,基线难于控制在同一水平线,且定量分析比较困难等^[19,20]。

总的来讲,能够诱导CNV增生的原因多种多样,目前国内外学者已经培育出多种CNV动物模型,但由于家兔CNV模型在研究人类角膜疾病方面具有独特优势,已成为角膜疾病实验研究的重要工具。虽然诱导CNV的病因可以互相关联,但现有的模型还是能够大致复制出各种诱导CNV的主要因素。当然,我们也应充分认识到人与家兔生物学特性的差异以及多种因素对动物实验效果的影响,根据实验目的的不同,选择合理的造模方法,探索更为理想的动物模型,促进人类对角膜疾病各方面的不断深入研究,以便更准确地模拟出人类CNV的疾病表现,为进一步研究其发病机制及治疗措施创造可能并打下基础。

参考文献

- 1 施新猷. 现代医学实验动物学. 北京:人民军医出版社 2000;522
- 2 Sivak JM, Ostriker AC, Woolfenden A, et al. Pharmacologic uncoupling of angiogenesis and inflammation during initiation of pathological corneal neovascularization. *J Biol Chem* 2011;286(52):44965-44975
- 3 Sener E, Yuksel N, Yildiz DK, et al. The impact of subconjunctivally injected EGF and VEGF inhibitors on experimental corneal neovascularization in rat model. *Curr Eye Res* 2011;36(11):1005-1013
- 4 邱培瑾,姚克. 角膜新生血管的动物模型. 国外医学眼科学分册 2000;24(6):360-363
- 5 Dana MR, Zhu SN, Yamada J. Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization. *Cornea* 1998;17(4):403-409
- 6 Paranthan RR, Bargagna-Mohan P, Lau DL, et al. A robust model for simultaneously inducing corneal neovascularization and retinal gliosis in the mouse eye. *Mol Vis* 2011;17:1901-1908
- 7 Cooper CA, Bergamini MV, Leopold IH. Use of flurbiprofen to inhibit corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1980;98(6):1102-1105

- 8 Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, et al. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007;35(8):745-748
- 9 Mello GH, Lupion FG, Oliveira FM, et al. Effect of subconjunctival bevacizumab on corneal neovascularization and reepithelization 25 days after chemical burn. *Arq Bras Oftalmol* 2011;74(1):48-52
- 10 常岩,蔡莉,王雨生,等. 贝伐单抗眼液对兔眼角膜新生血管抑制作用的实验研究. 眼科新进展 2010;30(7):605-611
- 11 Becker MD, Kruse FE, Jousseaume AM. *In vivo* fluorescence microscopy of corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236(5):390-398
- 12 高晓唯,刘玉清,楼玉芳,等. 内毒素诱导法制作兔眼角膜新生血管模型的实验研究. 中国实用眼科杂志 1996;14(12):720-722
- 13 Pang C, Gao Z, Yin J, et al. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295(2):E313-E322
- 14 Kenyon BM, Voest EE, Chen CC. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(8):1625-1632
- 15 Su W, Li Z, Lin M, et al. The effect of doxycycline temperature-sensitive hydrogel on inhibiting the corneal neovascularization induced by BFGF in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(3):421-427
- 16 Li C, Zhang F, Wang Y. S100A proteins in the pathogenesis of experimental corneal neovascularization. *Mol Vis* 2010;16:2225-2235
- 17 Damms T, Ross JR, Duplessie MD. Intracorneal bovine albumin: an immunologic model of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235(10):460-466
- 18 Amano S, Rohan R, Kuroki M. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(1):18-22
- 19 Regenfuss B, Bock F, Parthasarathy A, et al. Corneal angiogenesis--from bedside to bench and back: a tribute to Judah Folkman. *Lymphat Res Biol* 2008;6(3-4):191-201
- 20 Shi W, Liu J, Li M, et al. Expression of MMP, HPSE, and FAP in stroma promoted corneal neovascularization induced by different etiological factors. *Curr Eye Res* 2010;35(11):967-977