

Matrigel 诱导实验性脉络膜新生血管的实验研究

王志强¹, 江伟², 梁丽娜², 周尚昆², 宋柯²

作者单位:¹(100091)中国北京市,中国中医科学院西苑医院眼科;²(100040)中国北京市,中国中医科学院眼科医院

作者简介:王志强,在读医学博士,主治医师,研究方向:中西医结合治疗青少年近视和眼底病。

通讯作者:江伟,医学博士,主治医师,研究方向:中西医眼科药理学. jiangw20052002@yahoo.com

收稿日期:2012-09-06 修回日期:2012-11-20

Study experimental choroidal neovascularization induced by Matrigel on animal model

Zhi-Qiang Wang¹, Wei Jiang², Li-Na Liang², Shang-Kun Zhou², Ke Song²

¹Department of Ophthalmology, Xiyuan Hospital CACMS, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

²China Academy of CMS Eye Hospital, Beijing 100040, China

Correspondence to: Wei Jiang. China Academy of CMS Eye Hospital, Beijing 100040, China. jiangw20052002@yahoo.com

Received: 2012-09-06 Accepted: 2012-11-20

Abstract

• AIM: To build up the model of experimental choroidal neovascularization (CNV), for preparing the further pharmacodynamics experiment.

• METHODS: The method of subretinal injection of Matrigel on grey rabbits was used to build up the model of experimental CNV. Fundus examination, FFA, choroidal flat mount and pathological changes were measured to choose the best dose and injecting technique of Matrigel.

• RESULTS: In the FFA examination, the fluorescence leakage was happened in Matrigel 40 μ L and 20 μ L groups at 7 day, which was enhanced at 14 day and 28 day; the fluorescence leakage was happened in Matrigel 10 μ L group at 14 day and 28 day, which was never found in Matrigel 5 μ L group. In the fundus examination, most of retinas were attached back at 7 day; a few of those were detached. A few of retina had proliferative detachment in Matrigel 40 μ L group. Cataract and vitreous muddy were found in Matrigel 40 μ L group. In the tissue pathological examination, small vessels and/or immature fibrous tissues were found in Matrigel 40 μ L and 20 μ L groups. The retinal injure was most severely in Matrigel 40 μ L group.

• CONCLUSION: The method of subretinal injection of Matrigel could create CNV successfully, 20 μ L is the best dose.

• KEYWORDS: choroidal neovascularization; Matrigel; animal model

Citation: Wang ZQ, Jiang W, Liang LN, et al. Study experimental choroidal neovascularization induced by Matrigel on animal model. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2012;12(12):2272-2275

摘要

目的:建立兔眼脉络膜新生血管(CNV)的模型,为治疗CNV相关疾病的药效学实验奠定基础。

方法:采用青紫蓝兔视网膜下注射不同浓度Matrigel的方法建立实验性CNV模型,通过眼底彩照、FFA、脉络膜铺片、组织病理切片分别进行评价分析,确定Matrigel最佳浓度及操作方法。

结果:从FFA来看,Matrigel 40 μ L和20 μ L组从7d起出现荧光渗漏,14d和28d逐渐增强;10 μ L组14d和28d出现荧光渗漏,5 μ L组一直未见明显荧光素渗漏。从眼底情况来看,7d时大部分注射部位的视网膜已贴附回去,仅个别眼出现局限性视网膜脱离,Matrigel 40 μ L组个别眼视网膜增殖明显,造成牵拉性视网膜脱离。因白内障或玻璃体混浊无法进行眼底彩照和造影多出现在Matrigel 40 μ L组。从组织病理学观察,小血管和/或幼稚纤维组织增生多见于Matrigel 40 μ L和20 μ L组。但Matrigel 40 μ L组视网膜损伤明显。

结论:Matrigel 视网膜下注射可成功诱导CNV形成,20 μ L为最佳剂量。

关键词:脉络膜新生血管;基质胶;动物模型

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2012.12.07

引用:王志强,江伟,梁丽娜,等. Matrigel 诱导实验性脉络膜新生血管的实验研究. 国际眼科杂志 2012;12(12):2272-2275

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是眼科多种疾病的临床病理特征,常见于年龄相关性黄斑变性、眼组织胞浆菌病综合征、病理性近视、多灶性脉络膜炎以及血管样条纹等。尤其在湿性AMD的发病中^[1],CNV的出现会带来眼底视网膜下出血、渗出及纤维组织增生,严重而急速地导致患者中心视力下降。如何对CNV进行治疗已经成为这类疾病的主要治疗目标,目前的治疗手段主要有药物、基因治疗、手术及光动力疗

法^[2]等。而在对治疗方法的研究开发过程中,一个合适的动物模型显得尤为重要。目前围绕 CNV 生成的动物模型存在很多问题:如重复性差、成功率不高、CNV 生长不持久等。例如目前应用最广泛的是激光打破 Bruch's 膜诱导 CNV 形成^[3],可应用于灵长类动物、大鼠、小鼠等,缺点是在兔眼上造模不满意,而兔眼较大,比小鼠更适合于眼局部给药的疗效观察;此外在这个模型上 CNV 活动期时间短,局部瘢痕化现象出现早。Matrigel 是一种由 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠肉瘤中提取的基质胶,主要含有层粘连蛋白、胶原蛋白 I 和肝磷脂蛋白多糖以及一些生长因子,如 bFGF, IGF 和 EGF 等。Matrigel 的物理特性是在 4℃ 时为液态,37℃ 时为固态,固态时能够缓慢释放各种生长因子。以往实验正是利用这种生物物理学特点将 Matrigel 注入视网膜下,在局部形成类似于 drusen 的组织结构,诱导 CNV 生成^[4,5]。本实验在既往实验研究基础上,结合本实验室研究条件和手段,试图探讨不同剂量 Matrigel 注入青紫蓝兔视网膜下后眼后节组织的变化及 CNV 生长情况,为此模型的进一步应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康青紫蓝兔,体质量 2~2.5kg,雌雄不限,经裂隙灯、眼底镜检查无先天眼疾者可纳入实验,购自北京芳元缘养殖场。主要实验试剂及配制:Matrigel,美国 BD 公司,编号 356234;盐酸赛拉嗪注射液,吉林省华牧动物保健品有限公司,批号 2010.6;盐酸氯胺酮注射液,福建古田药业有限公司,批号 100817;倍诺喜,参天制药(中国)有限公司,批号 J20070072;复方托吡卡胺眼水,参天制药(中国)有限公司,批号 MP1105;氯霉素眼药水,武汉天天明药业有限责任公司,批号 2010030013。主要器械及仪器设备:手术显微镜:苏州六六视觉科技股份有限公司,型号 Y220T4;眼底荧光血管造影仪:美国 Topcon 公司;显微镜图像采集系统:日本 Olympus,型号 DP71;一次性使用无菌胰岛素注射器(29G 针头):美国 BD 公司,批号 9341355;石蜡切片机:德国 Leica, RM2245。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 青紫蓝兔 15 只随机分 5 组,每组 3 只,均行双眼注射,第 1 组视网膜下注射 Matrigel 40 μ L,第 2 组视网膜下注射 Matrigel 20 μ L,第 3 组视网膜下注射 Matrigel 10 μ L,第 4 组视网膜下注射 Matrigel 5 μ L,第 5 组 1 眼不处理,另 1 眼视网膜下注射 PBS 20 μ L。

1.2.2 视网膜下注射方法 青紫蓝兔使用 40mg/kg 盐酸氯胺酮和 5mg/kg 盐酸塞拉嗪肌肉注射全身麻醉后,复方托吡卡胺散瞳,倍诺喜点结膜囊表面麻醉。将一片载玻片置于角膜上方以便观察眼底。注射前氯霉素结膜囊点眼,一次性无菌胰岛素注射器抽取液态 Matrigel 后从睫状体平坦部进针,刺入玻璃体腔,手术显微镜下注视针尖刺入视网膜下,注射部位选择视盘鼻/颞侧有髓神经纤维下中外 1/3 处。将全部针尖没入视网膜下后固定不动,推药,拔针。视网膜无大面积出血、晶状体无划伤视为造模成功。

1.2.3 眼底彩照和 FFA 检查 分别于造模后 1,2,4wk 行眼底彩照、FFA。青紫蓝兔全身麻醉散瞳,拍摄药物注射部位及附近视网膜,眼底彩照之后将 200g/L 荧光素钠(1mL/kg)耳缘静脉注入青紫蓝兔,立即计时,3min 内为造影早中期,5min 后为造影晚期。

1.2.4 脉络膜铺片 造模后 1,2,4wk,分别取各组青紫蓝兔一只全身麻醉,舌下静脉注射 FITC(fluorescein isothiocyanate dextran,异硫氰酸荧光素葡聚糖,分子量 2×10^6),处死后取 1 眼在 40g/L 多聚甲醛溶液中固定 24h,剪开角膜,去除眼前节,缓慢剥离视网膜神经层,将余下 RPE-脉络膜-巩膜复合体放射状剪开,RPE 面向下铺于盖玻片上,甘油封片,荧光倒置显微镜下观察。

1.2.5 石蜡组织切片及光镜标本制备 (1)组织固定:摘除眼球后放入 40g/L 多聚甲醛溶液中固定 24h 后,去除角膜、晶状体,继续固定。(2)组织蜡块制备:将眼杯脱水包埋,冷却后切片。(3)石蜡切片及 HE 染色:包埋的标本切成 5 μ m 石蜡切片,展片机展片 4h,次日染片,苏木素-伊红染色。

2 结果

2.1 眼底彩照及 FFA 检查 1wk 时,3 眼因白内障无法进行眼底彩照,其中 1 眼无法进行 FFA 检查。此 3 眼中,2 眼为 Matrigel 注射组,1 眼为 PBS 注射组。1wk 时眼底彩照示,大部分注射后视网膜已贴附回去,仅个别眼出现局限性视网膜脱离。视网膜注射部位下方的 RPE 出现色素紊乱,注射当时造成的视网膜小片状出血大部分已吸收;FFA 检查显示仅 Matrigel 40 μ L 及 20 μ L 出现荧光渗漏。2wk 时,3 眼因白内障或玻璃体浑浊无法进行眼底彩照和造影,其中 Matrigel 40 μ L 组视网膜增殖明显,造成牵拉性视网膜脱离;FFA 显示 Matrigel 40 μ L,20 μ L 及 10 μ L 组出现部分荧光素渗漏。4wk 时,没有出现新的白内障或玻璃体浑浊情况,FFA 显示除 5 μ L 外其余各组均出现荧光素渗漏(图 1)。

2.2 病理组织切片分析 各组均可见到一定程度的玻璃体腔炎性反应,低剂量组除视锥、视杆细胞层细胞突变性、坏死、肿胀、崩解、液化,导致该层组织疏松变薄,甚至消失及各层不同程度炎性细胞浸润外,视网膜其它层组织结构均完整。小血管和/或幼稚纤维组织增生多见于 Matrigel 40 μ L 和 20 μ L 组。但 Matrigel 40 μ L 组视网膜损伤明显,可见内核层部分胞核变性、坏死,细胞间水肿、细胞吸收使该层变薄,部分标本可见核固缩和核碎片,个别严重者内核层消失。外网层神经纤维肿胀、变性、坏死、溶解,结构疏松,吸收变薄。外核层神经纤维细胞可见水肿、核固缩,崩解,碎裂,结构疏松,吸收使该层变薄。视锥、视杆细胞层细胞突变性、坏死、肿胀、崩解、液化,导致该层组织疏松变薄,甚至消失。脉络膜层血管扩张、充血,部分标本可见慢性炎性细胞浸润,呈斑片状密集分布,伴有血管和纤维组织增生,该层厚度明显增加,其中可见散在被破坏的色素细胞层黑色素上皮细胞和游离的黑色素(图 2)。

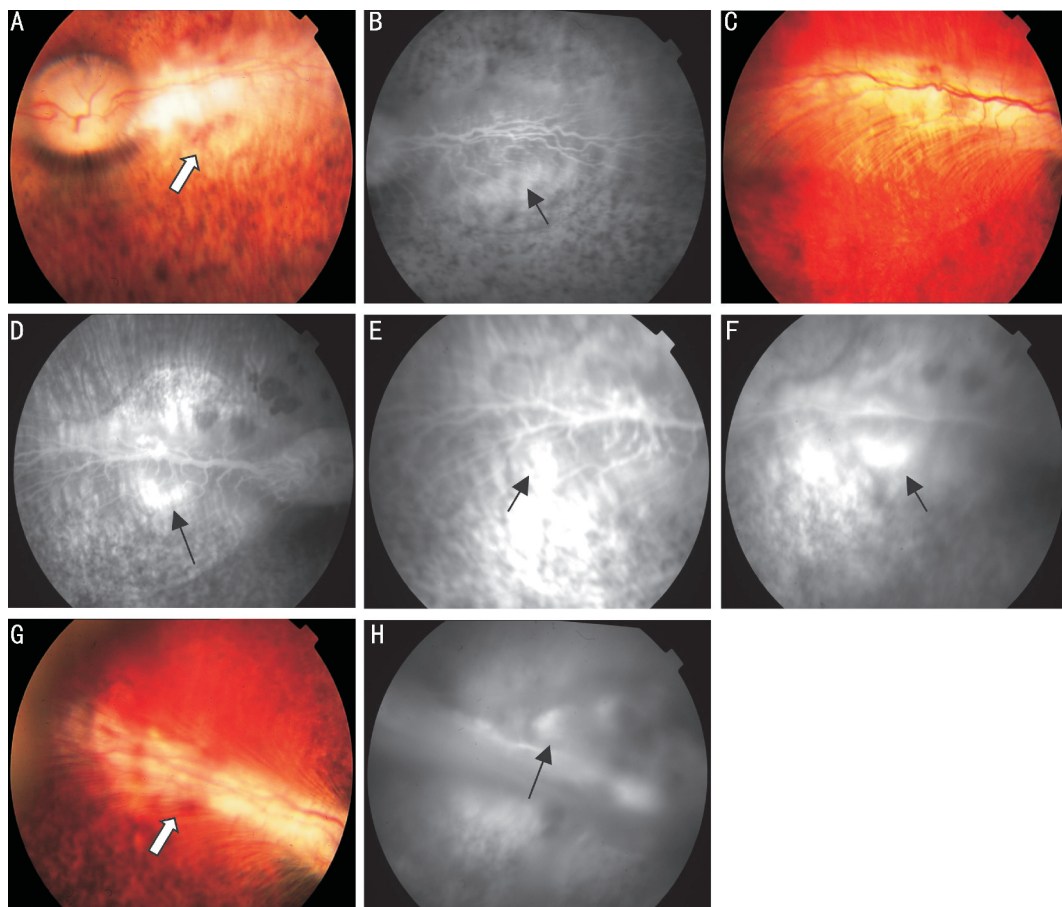


图1 Matrigel视网膜下注射后青紫蓝兔眼底彩照和荧光血管造影图 A:Matrigel注射5 μ L后2wk,眼底见少量出血(白箭头); B:Matrigel注射5 μ L后2wk,FFA无明显渗漏;C:Matrigel注射20 μ L后1,2,4wk,眼底可见新生血管生长;D: Matrigel注射20 μ L后1wk, FFA出现荧光素渗漏(如黑箭头所示);E: Matrigel注射20 μ L后2wk, FFA出现荧光素渗漏(如黑箭头所示);F: Matrigel注射20 μ L后4wk, FFA出现荧光素渗漏(如黑箭头所示);G: Matrigel注射40 μ L后2wk眼底仍有少量出血(白箭头);H:FFA显示眼底荧光渗漏明显(黑箭头所示)、视网膜前新生血管形成。

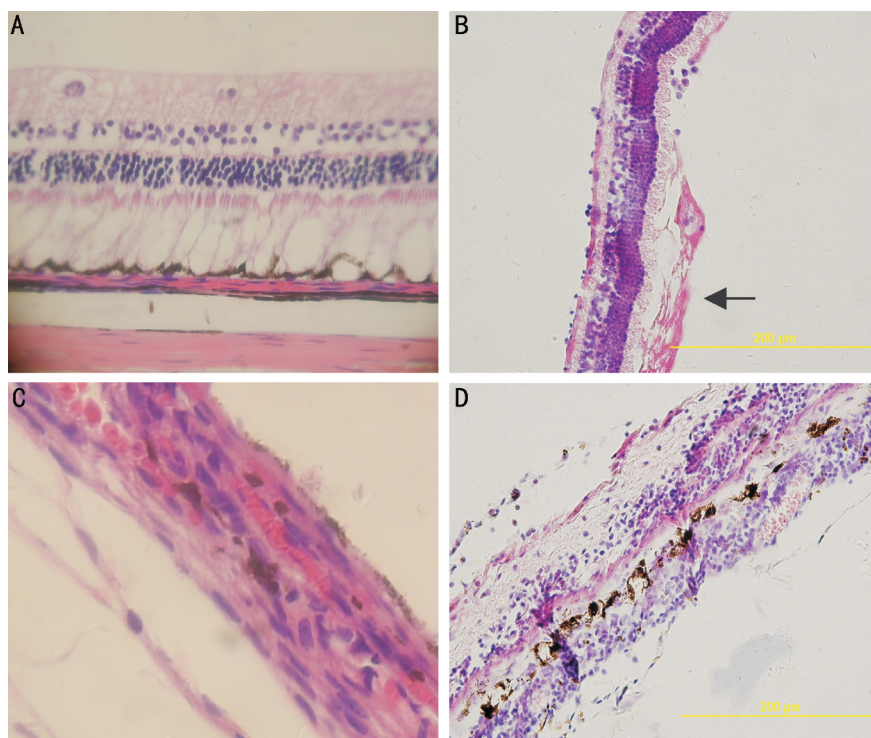


图2 Matrigel视网膜下注射青紫蓝兔眼后节石蜡切片 HE 染色 A:空白对照组(HE \times 200)结构正常; B: 10 μ L Matrigel组,Matrigel位于视网膜下(黑箭头所示),少量炎性细胞浸润;C:40 μ L Matrigel组,脉络膜充血、血管纤维组织增生;D:20 μ L Matrigel组(HE \times 200),脉络膜层炎性反应较重。

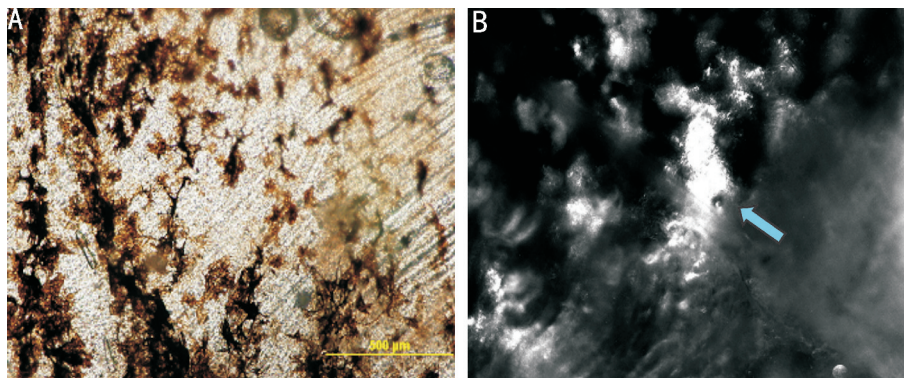


图3 青紫蓝兔 RPE 脉络膜巩膜复合体铺片 A:普通光镜下观察,Matrigel 注射到视网膜下导致 RPE 细胞坏死,色素紊乱,Matrigel 平铺于 RPE 层之上,半透明状,伴少量气泡; B:荧光倒置显微镜下观察,Matrigel 遮挡荧光,边缘区域 CNV 呈现高荧光(蓝箭头)。

2.3 脉络膜铺片结果 Matrigel 注射后平铺于视网膜下,正好遮挡了生长于其下的 CNV 组织。因此在进行脉络膜铺片时大多数 CNV 生长区域被遮挡,在荧光显微镜下不显影。仅有个别 Matrigel 边缘地区可见高荧光(图 3)。

3 讨论

本实验在既往研究报道的基础上结合自身实验室的设备条件,成功地采用 Matrigel 注射的方法诱导出青紫蓝兔实验性 CNV 模型。因青紫蓝兔眼球相对较大,采用经玻璃体腔微量注射器视网膜下注射的方法操作相对简便,效果稳定,隆起的视网膜经观察在较短的时间内就能贴附回去。经活体观察和组织病理学检查,认为 20 μ L 是本模型的最佳使用剂量。一方面,此剂量能在早期(7d)即产生血管荧光素渗漏、幼稚纤维组织增生;另一方面,此剂量对正常视网膜结构损伤较小,不易引起白内障、玻璃体浑浊以及视网膜增殖及牵拉性网脱等并发症。但值得注意的是,由于兔眼自身生理学特点,玻璃体受到搅扰后容易产生玻璃体视网膜增殖性改变,因此,建议每只兔眼仅注射 1 次,注射时针尖需完全没入视网膜,缓慢推针,快速出针,出针后轻压针孔半分钟,整个过程在手术显微镜下操作完成。为了避免晶状体划伤,应在睫状体平坦部或略靠近视神经方向进针,刺入后针体不要上挑,应向后极部方向刺入,但也要避免刺入太深扎伤其它部位的视网膜。总之,经几次练习操作,此种方法不难掌握,但如果应用在更小的动物如大鼠上,这种方法还是十分困难的,我们也曾进行过一定尝试,但成功率很低。

另外,兔眼石蜡包埋及切片均认为有一定难度,原因是视网膜容易在脱水包埋的过程中脱落而影响后期观察。本次实验也有一定数量的兔眼视网膜脱落,究其原因有:(1)组织固定不充分,建议新鲜眼球立即放入 40g/L 多聚

甲醛,剪掉角膜,取出晶状体,双侧睫状体平坦部开窗,经充分固定后再进行脱水包埋。(2)组织脱水过程要全部手工操作,动作轻柔。(3)兔眼眼球较大,需自制包埋盒。包埋时一定要避免气泡产生,建议角膜面向上直接对准灌蜡口,尽量保持组织不移位。

本次实验我们认为,Matrigel 视网膜下注射可成功诱导 CNV 形成,小血管和/或幼稚纤维组织增生多见于 Matrigel 40 μ L 和 20 μ L 组。因 Matrigel 40 μ L 组织损伤及炎症反应严重,Matrigel 10 μ L 及 5 μ L 诱导 CNV 生成不明显,因此选择 Matrigel 20 μ L 为最佳剂量。视网膜下注射时穿过玻璃体腔,对玻璃体有一定扰动,尽量避免反复进出。由于本次实验为每只眼视盘鼻、颞侧各注射 1 次,建议下次实验只注射 1 次,即每只眼注射一个点。由于 Matrigel 遮挡荧光的作用比较明显,因此本模型不能行脉络膜铺片。评价兔模型 CNV 的生长情况应选择 FFA 或 ICG 造影。

参考文献

- 1 Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age - related macular degeneration. *Neuron* 2012;75(1):26-39
- 2 Amoaku W, Blakeney S, Freeman M, et al. Action on AMD. Optimising patient management: act now to ensure current and continual delivery of best possible patient care. *Eye(Lond)* 2012;1:S2-21
- 3 Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog Retin Eye Res* 2010;29(6):500-519
- 4 汪振芳,万鹏霞,何丽文,等. 大鼠视网膜下注射 Matrigel 诱导视网膜色素上皮异位和脉络膜新生血管形成. *中华生物医学工程杂志* 2007;13(6):345-348
- 5 Qiu G, Stewart JM, Sadda S, et al. A new model of experimental subretinal neovascularization in the rabbit. *Exp Eye Res* 2006;83(1):141-152