

# 氧浓度可控制小鼠饲养箱的研制

张红兵<sup>1</sup>, 郑博<sup>1</sup>, 杨晓岗<sup>1</sup>, 马广强<sup>2</sup>

引用:张红兵,郑博,杨晓岗,等. 氧浓度可控制小鼠饲养箱的研制.国际眼科杂志 2019;19(7):1106-1109

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81570873);陕西省2015年度科学技术研究发展计划项目(No.2015JM8481)

作者单位:<sup>1</sup>(710002)中国陕西省西安市第一医院眼科 陕西省眼科研究所;<sup>2</sup>(330004)中国江西省南昌市,江西中医药大学

作者简介:张红兵,毕业于西安交通大学,博士,主任医师,陕西省眼科研究所副所长,西安市眼科医院副院长,研究方向:视网膜新生血管性疾病。

通讯作者:张红兵. zhanghongbing01@163.com

收稿日期:2018-08-20 修回日期:2019-06-10

## 摘要

目的:探索制作可以自动控制氧浓度的小鼠饲养箱的可行性,为制作早产儿视网膜病变模型提供帮助。

方法:用粘合剂将有机玻璃粘合成透明密闭玻璃箱,前面设置开口便于放入和取出饲养小鼠的笼子,侧面设通风口,KY-2F型数字显示控氧仪置于玻璃箱顶部,其氧气探头和通过电磁阀的送气管从玻璃箱顶部接入箱内,连接控氧仪和电磁阀,用视网膜铺片和HE染色两种方法验证造模效果。

结果:氧箱饲养的C57BL/6J新生小鼠第17d视网膜形成无灌注区并有新生血管生成,HE染色示视网膜新生血管突破内界膜。

结论:本方法制作的氧浓度可控制小鼠饲养箱简单易做、效果可靠。

关键词:早产儿视网膜病变;动物模型;新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.7.04

## Development of a feeding box for mice with controllable oxygen concentration

Hong-Bing Zhang<sup>1</sup>, Bo Zheng<sup>1</sup>, Xiao-Gang Yang<sup>1</sup>, Guang-Qiang Ma<sup>2</sup>

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81570873); 2015 Annual Science and Technology Research and Development Program of Shaanxi Province (No.2015JM8481)

<sup>1</sup>Xi'an First Hospital and Eye Institute of Shaanxi Province, Xi'an 710002, Shaanxi Province; <sup>2</sup>Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Hong-Bing Zhang. Xi'an First Hospital and Eye Institute of Shaanxi Province, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. zhanghongbing01@163.com

Received:2018-08-20 Accepted:2019-06-10

## Abstract

• AIM: To develop a new murine case with automatically controlled oxygen concentration for generating a mouse disease model of human retinopathy of prematurity (ROP).

• METHODS: An oxygen analyzer, an electromagnetic valve, and some of polymethyl methacrylate plates were purchased commercially and used for building up the device. A transparent sealed glass box was built with the organic glass and an adhesive. An opening was arranged in front of box for easy insertion and removal of the cage. A vent was arranged on the side. The KY-2F digital display oxygen controller and solenoid valve were placed on the top of the glass box. The oxygen probe and the air supply pipe through the solenoid valve were put into the box from the top of the glass box, Oxygen controller and solenoid valve were connected. Retina sheets and HE histologically staining were used to evaluate the animal model.

• RESULTS: Retina with non-perfusion area and neovascularization were observed in the C57BL/6J mice 17<sup>th</sup> days after birth from the group in the case with controlled oxygen. Retina with HE staining showed that the neovascularization has penetrated over internal limiting membrane.

• CONCLUSION: The presented methodology here for generating mouse case with controlled oxygen is easy to do and apply, the model can truly mimic ROP histologically.

• KEYWORDS: retinopathy of prematurity; animal model; neovascularization

Citation: Zhang HB, Zheng B, Yang XG, et al. Development of a feeding box for mice with controllable oxygen concentration. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(7):1106-1109

## 0 引言

自从1994年Smith等<sup>[1]</sup>将早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)小鼠动物模型标准化以来,涌现出了许多以该模型为载体的ROP相关基础研究,为深入认识和更好防治ROP起了很大推动作用<sup>[2-5]</sup>。在制作ROP小鼠模型时,如何保持新生小鼠稳定持续暴露在75%±2%的氧浓度是实验成败的关键,我们在实验过程中自行研制了一种简单实用的氧浓度可控制小鼠饲养箱(专利号:ZL 2010 2 0647695.X),效果显著,性能稳定,现报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 数字显示控氧仪(KY-2F型,常州恒隆仪器有

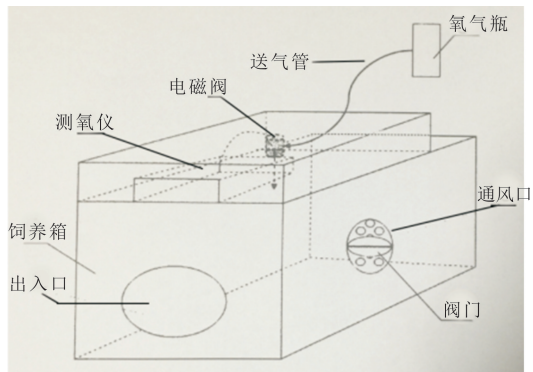


图1 氧浓度可控制小鼠饲养箱模式图。

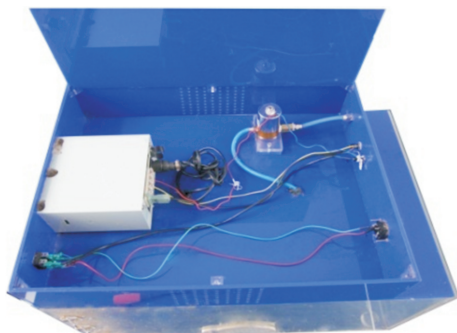


图2 氧浓度可控制小鼠饲养箱内面观。

限公司)、电磁阀(2W-025-08,中国德力西控股集团有限公司)、有机玻璃(5mm,西安久力恒亚克力制品有限公司)、有机玻璃粘合剂(三氯甲烷,湖南恒隆石油化工有限公司)、氧气减压器(YQY-342,上海减压厂)。

**1.2 方法** (1)用玻璃胶粘合作有机玻璃饲养箱,正面开口,供饲养小鼠的笼子出入,开口的周围凿旋转螺丝孔,便于固定封口的密封盖,侧面有通风口,通风口处安装一个阀门,控制通风口大小,平衡饲养箱内外压力。(2)从顶部向饲养箱内接入 KY-2F 型数字显示控氧仪的氧气探头和输送氧气的送气管,送气管由电磁阀控制。(3)连接测氧仪和电磁阀。(4)通过测氧仪上的参数设置按钮,设定测氧仪正常范围为 74%~76%,当氧分压低于 74%时,测氧仪发出指令,报警器发出报警声,同时电磁阀开放,开始向饲养箱里输入氧气,当氧分压高于 76%时,测氧仪发出指令,报警器发出报警声,同时电磁阀关闭,停止输入氧气,最终维持氧分压在 74%~76% (图 1、2)。

**1.2.1 鉴定方法** 将出生第 7d C57BL/6J 小鼠连同母鼠以窝为单位分成两组,每组 6 只,一组在正常环境中饲养 10d,另一组放于高氧箱内连续饲养 5d,再在正常环境中饲养 5d。第 17d 每组 3 只新生小鼠用氯胺酮(60mg/kg,北京双鹤药业股份有限公司)和赛拉嗪(18mg/kg,吉林省方正动物药业有限责任公司)麻醉新生小鼠,剪开左侧肋骨,暴露心脏,向左心室内注射荧光素标记的高分子量右旋糖酐(50mg/mL, Sigma),解剖出眼球,避光在 4%多聚甲醛(博士德生物工程有限公司)固定 24h 后解剖出视网膜,平铺固定在载玻片上,荧光显微镜观察照相。第 17d 每组另外 3 只新生小鼠视网膜做 HE 染色,具体方法为新生小鼠麻醉后解剖出眼球(不暴露心脏),4%多聚甲醛(博士德生物工程有限公司)固定 24h 后,石蜡包埋切片,HE 染色观察玻璃体腔视网膜新生血管生成情况。

**1.2.2 视网膜新生血管量化** 在高氧条件下,未发育成熟

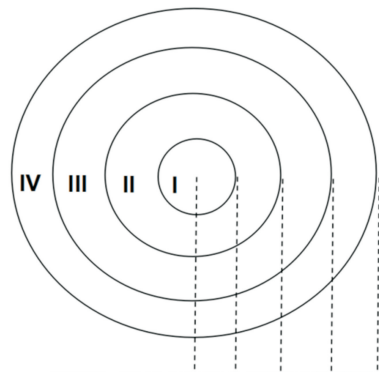


图3 视网膜分区模式图(相邻分区线的距离相同)。

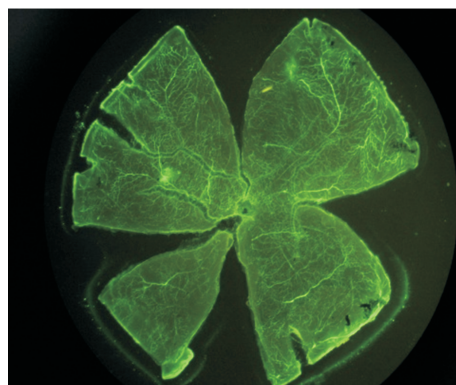


图4 正常新生小鼠第 17d 视网膜铺片(结合荧光素的高分子量右旋糖酐心脏灌注):视网膜无灌注区和新生血管生成( $\times 4$ )。

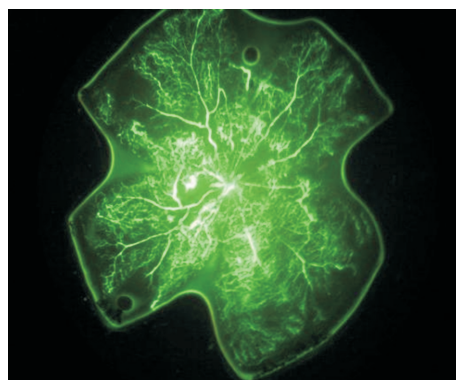


图5 高氧条件下第 17d 新生小鼠视网膜铺片(结合荧光素的高分子量右旋糖酐心脏灌注):视网膜血管大片无灌注区和新生血管生成( $\times 4$ )。

的新生小鼠视网膜,在血管化过程中生成了病理性新生血管、新生血管芽和新生血管突<sup>[6-8]</sup>。尽管这些新生血管芽和新生血管突可能分布不一致,但是如果将视网膜用不同半径的同心圆分成四个区(以视盘为中心,分别以视盘到视网膜边缘距离的 1/4、2/4、3/4 和 4/4 为半径画圆,将视网膜分成 I、II、III、IV 四个区),通过计数不同区的新生血管芽和新生血管突,可以反映氧诱导视网膜病变的严重程度<sup>[9]</sup>(图 3)。

## 2 结果

**2.1 视网膜铺片** 第 17d 正常环境中饲养的 3 只 C57BL/6J 新生小鼠视网膜大血管走行正常,无迂曲扩张,小血管分布均匀,无无灌注区和新生血管生成,而高氧组 3 只 C57BL/6J 新生小鼠视网膜大血管迂曲扩张,小血管分布不均匀,后极部视网膜大片无灌注区形成,周围大量新生血管生成(图 4、5)。



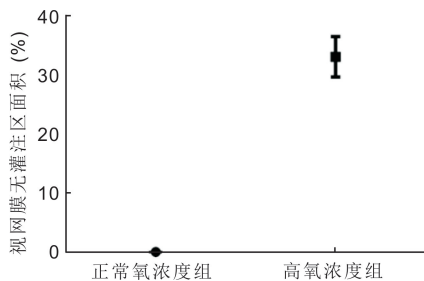


图6 视网膜无灌注区与全部视网膜面积的比值:正常氧条件下新生小鼠视网膜无灌注区形成,而高氧条件下新生小鼠视网膜无灌注区面积为33.07%。

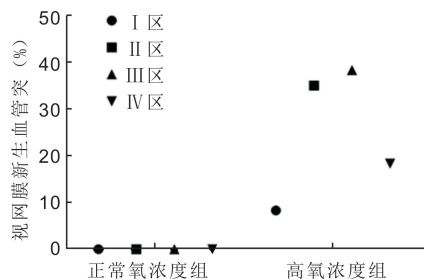


图7 视网膜新生血管突在视网膜不同区域的分布:正常氧条件下新生小鼠视网膜没有新生血管突生成,而高氧条件下新生小鼠视网膜大量新生血管突生成,且主要位于II和III区。

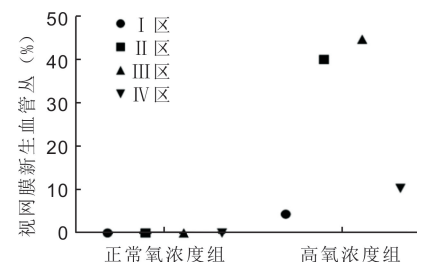


图8 视网膜新生血管丛在视网膜不同区域的分布:正常氧条件下新生小鼠视网膜没有新生血管丛生成,而高氧条件下新生小鼠视网膜大量新生血管丛生成,且主要位于II和III区。

2.2 视网膜新生血管量化分析 正常C57BL/6J新生小鼠在第17d已经完成视网膜血管化,无无灌注区、视网膜新生血管突和新生血管丛生成,而经过高氧环境诱导的C57BL/6J新生小鼠,第17d视网膜中央大片无灌注区生成(33.07%),并有新生血管突和新生血管丛生成,且主要聚集在II区(40.27%)和III区(44.97%),而I区(4.36%)和IV区(10.40%)较少(图6~8)。

2.3 视网膜切片比较 正常环境中饲养的3只C57BL/6J新生小鼠,第17d视网膜结构规整,内界膜完整,神经节细胞层为单层细胞结构,主要由神经节细胞核组成,血管结构可见,但是少且排列整齐(图9);饲养箱内高氧诱导的C57BL/6J新生小鼠,第17d视网膜神经纤维层结构紊乱,内界膜不完整,为长入的新生血管破坏,部分增生的血管内皮细胞长入玻璃体腔,形成管腔样结构,由于血管内皮等细胞的增生,单层的细胞结构变为多层,并且排列不规则(图10)。

### 3 讨论

目前国内从事ROP基础研究很多,制作该动物模型时建立高氧环境常有以下几种方法:(1)给小鼠饲养箱内间断人工充氧,用测氧仪间断测定饲养箱内氧浓度;(2)用高压氧舱饲养小鼠;(3)购置进口控氧仪(PRO-OX 110

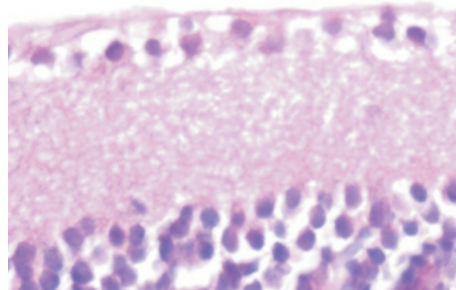


图9 正常新生小鼠第17d视网膜HE染色:视网膜内界膜完整,没有新生血管长入( $\times 100$ )。

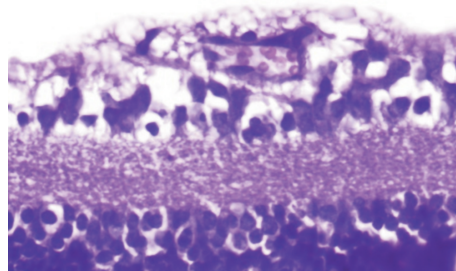


图10 高氧诱导后第17d新生小鼠视网膜,视网膜内界膜不完整,新生血管突视网膜内界膜规整,无新生血管突破(HE染色 $\times 100$ )。

chamber oxygen controller, Biospherix Ltd, Redfield, NY)。这些方法存在很多现实问题,测氧仪间断测量饲养箱内氧浓度,很难保持饲养箱内氧浓度稳定,费时费力,还容易影响实验结果稳定性;进口控氧仪控氧性好,但是价格昂贵,一般研究人员很难有充足的实验经费购买这种设备;高压氧舱控氧效果理想,但是专门为动物实验购买这种昂贵仪器的可能性更小,同时维持仪器正常运转的费用高昂,专门借用可能性也不大。基于上述原因,研制氧浓度可控性好、价格实惠的小鼠饲养箱,对成功制作ROP动物模型具有明显实用价值。

KY-2F数字显示控氧仪由氧电极、放大器、模拟比较器和报警器四部分组成,其中氧电极以铂金为阴极,氯化银为阳极,并以聚四氟乙烯为渗透隔离膜,气体中的氧气可以透过薄膜到达阴极,在650mV的极化电压下发生化学反应,并快速达到平衡,同时产生一个极限扩散电流,此电流大小与气体中的氧分压成正比,因此可以感受周围环境中的氧分压变化。产生的电流一部分通过显示屏,显示所测气体的氧气含量,另一部分通过模拟比较器推动继电器,当氧气含量超过设定值时仪器发出声光报警,同时向电磁阀输出电流。

电磁阀是利用电磁感应原理,控制阀门开启或关闭的自动化基础元件,在本研究中,它可以调整氧气瓶向饲养箱内输送氧气的流量和速度,当数字控氧仪产生的电流流入电磁阀里面的线圈时,由于电磁感应产生电磁力,当电磁力大于电磁阀里弹簧对动铁芯的阻力时,动铁芯克服弹力,和静铁芯直接吸和,阀门被打开,氧气进入氧箱,当数字控氧仪没有电流流入电磁阀线圈时,线圈不能产生电磁力,动铁芯在弹簧的弹力作用下离开静铁芯,阀门关闭,氧气不再进入饲养箱。

有机玻璃饲养箱是根据有机玻璃对气体压力耐受程度和便于观察而采用的,并参考小鼠饲养笼的尺寸设计饲

养箱的体积、出入口和通风口,最后用有机玻璃胶粘合而成。有机玻璃饲养箱接口密封处无氧气漏出,侧面透气孔可以有效平衡饲养箱内外压力,避免饲养箱因箱内压力过高而爆裂,顶部接入的控氧仪探头可以灵敏及时的感知饲养箱内氧分压,并通过报警器上的显示器显示出来,同时控氧仪还可以通过电磁阀,及时调控氧气管的开放和闭合,最终使饲养箱内氧浓度稳定在设定范围。

KY-2F 数字显示控氧仪、电磁阀和有机玻璃的合理组合,得到氧气浓度可以控制的小鼠饲养箱,通过与标准测氧仪的比较,发现饲养箱上的测氧仪可以准确测量饲养箱内氧分压,并及时将电信号发送给报警装置和电磁阀,始终维持饲养箱里氧分压在需要范围内,为顺利进行试验、消除误差和结果稳定奠定了基础,这也被以后的实验结果所证实。

我们应用自己设计的氧浓度可控制小鼠饲养箱,按照文献建议的方法<sup>[1,9]</sup>,6只在氧箱内饲养的 C57BL/6J 新生小鼠,第 17d 视网膜全部诱导出了新生血管(3 只新生小鼠视网膜做 HE 染色,3 只新生小鼠视网膜做铺片),而在正常环境中饲养的新生小鼠第 17d 视网膜完全血管化,并且没有新生血管生成,并已有相关论文发表<sup>[10-12]</sup>。

总之,该装置设计合理,控制饲养箱内氧分压快速准确,相关部件全部国产,价格不贵,维修方便,既解决了间断测氧的繁琐和不能维持饲养箱内氧分压始终在 75%左右的缺点,又避免了购买高压氧舱和早产儿暖箱的高昂费用,既满足了本研究需要,又可在其它相关研究使用,具有一定推广价值。

#### 参考文献

- 1 Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen - induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35 (1): 101-111
- 2 Al-Shabrawey M, Bartoli M, El-Remessy AB, et al. Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor

overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy. *Am J Pathol* 2005;167(2): 599-607

3 Zhang J, Zhao R, Chen J, et al. The Effect of Interleukin 38 on Angiogenesis in a Model of Oxygen-induced Retinopathy. *Sci Rep* 2017; 7(1):2756

4 Mezu - Ndubuisi OJ, Taylor LK, Schoepfoerster JA. Simultaneous Fluorescein Angiography and Spectral Domain Optical Coherence Tomography Correlate Retinal Thickness Changes to Vascular Abnormalities in an *in vivo* Mouse Model of Retinopathy of Prematurity. *J Ophthalmol* 2017;2017:9620876

5 Lee S, Elaskandran M, Lau LF, et al. Interplay between CCN1 and Wnt5a in endothelial cells and pericytes determines the angiogenic outcome in a model of ischemic retinopathy. *Sci Rep* 2017; 7(1):1405

6 Lange C, Ehlken C, Martin G, et al. Intravitreal injection of the heparin analog 5 - amino - 2 - naphthalenesulfonate reduces retinal neovascularization in mice. *Exp Eye Res* 2007; 85(3):323-327

7 Maier P, Unsoeld AS, Junker B, et al. Intravitreal injection of specific receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222 584 improves ischemia-induced retinopathy in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243 (6):593-600

8 Shen J, Xie B, Hatara CM, et al. Vegf or EphA2 antisensepolyamide-nucleic acids; vascular localization and suppression of retinal neovascularization. *Mol Ther* 2007;15(11):1924-1930

9 Lange C, Ehlken C, Stahl A, et al. Kinetics of retinalvaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247(9):1205-1211

10 Zhang H, Wang X, Xu K, et al. 17β-estradiol ameliorates oxygen-induced retinopathy in the early hyperoxic phase. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;457 (4): 700-705

11 Zhang HB, Sun NX, Liang HC, et al. 17 - Alpha - estradiol ameliorating oxygen - induced retinopathy in a murine model. *Jpn J Ophthalmol* 2012;56(4): 407-415

12 Zhang HB, Sun NX, Liang HC, et al. The protective effect of 17beta-estradiol on oxygen-induced retinopathy and its relation with the changes of malondialdehyde. *J Biomed Res* 2010;24(2):138-144