

小鼠伊文思蓝尾静脉或腹腔注射及视网膜铺片技术的优化

邢春涛^{1,2}, 余琦², 张璐莎², 李珏^{2,3}, 关华², 王乐², 李蓉^{1,2,4}

引用:邢春涛,余琦,张璐莎,等. 小鼠伊文思蓝尾静脉或腹腔注射及视网膜铺片技术的优化. 国际眼科杂志 2023; 23(7): 1093-1098

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81773795);陕西省科技资源开放共享平台资助项目(No.2020PT-003)

作者单位:¹(750004)中国宁夏回族自治区银川市,宁夏医科大学临床医学院;²(710021)中国陕西省西安市,西安医学院基础与转化医学研究所陕西省缺血性心血管疾病重点实验室;³(712046)中国陕西省咸阳市,陕西中医药大学;⁴(710077)中国陕西省西安市,西安医学院第一附属医院眼科

作者简介:邢春涛,男,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:视网膜疾病。

通讯作者:李蓉,女,毕业于第四军医大学,博士,主任医师,教授,眼科主任,五官科教研室主任,宁夏医科大学硕士研究生导师,研究方向:视网膜疾病. rechelrong198222@163.com

收稿日期:2023-03-03 修回日期:2023-06-12

摘要

目的:对小鼠伊文思蓝尾静脉推注联合视网膜铺片的技术进行优化,以提高视网膜铺片染色实验的准确性和可重复性。

方法:C57BL/6 雄性小鼠尾静脉注射 10g/L (1%) 伊文思蓝 0.3mL 后体内分别循环 10、20min,处死后摘取眼球,4%多聚甲醛分别固定 20、40、60min,将不同体内循环时间及不同组织固定时间对于视网膜血管的走形、分布及渗漏的影响进行了优化比较。尾静脉注射失败后,通过腹腔注射 1%伊文思蓝 0.3mL,体内循环 3h,固定 60min 进行补救,观察视网膜血管的走形、分布及渗漏。同时将尾静脉注射后视网膜血管的走形、分布及渗漏与腹腔注射后的结果进行效果比较,确定最佳的体内循环时间以及视网膜铺片的条件。

结果:尾静脉注射后,与体内循环 20min,固定 20 或 40min 条件下视网膜血管情况相比,伊文思蓝体内循环 10min,固定 60min,视网膜血管走行、血管分支清楚,血管渗漏较少。尾静脉注射失败后,腹腔注射补救措施结果显示视网膜血管走行、各级血管形态清晰。腹腔注射伊文思蓝体内循环 3h 与尾静脉注射伊文思蓝体内循环 10min 相比,视网膜血管的走形、分布的效果无明显差别。

结论:优化伊文思蓝尾静脉推注联合视网膜铺片的技术,可提高视网膜铺片染色实验的准确性和可重复性,为相关视网膜血管病变的研究提供借鉴方法。

关键词:视网膜铺片;伊文思蓝;血管造影;眼球固定;静脉注射;腹腔注射

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.7.07

Technique optimization of intravenous or intraperitoneal injection of Evans blue combined with retinal preparations in mice

Chun-Tao Xing^{1,2}, Qi Yu², Lu-Sha Zhang², Jue Li^{2,3}, Hua Guan², Le Wang², Rong Li^{1,2,4}

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81773795); Science and Technology Resources Open Sharing Platform of Shaanxi Province (No.2020PT-003)

¹School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ²Shaanxi Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Diseases, Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China; ³Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi Province, China; ⁴Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China

Correspondence to:Rong Li. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Shaanxi Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Diseases, Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China. rechelrong198222@163.com

Received:2023-03-03 Accepted:2023-06-12

Abstract

• **AIM:** To optimize the technique of intravenous injection of Evans blue and retinal preparations in mice, improving the accuracy and repeatability of staining experiment of retinal preparations.

• **METHODS:** C57BL/6 male mice were intravenously injected with 10g/L (1%) Evans Blue 0.3mL and circulated *in vivo* for 10 or 20min, and the eyes were removed after sacrificed and fixed in 4% paraformaldehyde for 20, 40 or 60min. When failure of intravenous injection, the experiment was remediated by intraperitoneal injection of 1% Evans Blue 0.3mL, circulated *in vivo* for 3h and fixed for 60min to observe morphology, distribution and leakage of the retinal vessels. Besides, we compared the morphology, distribution and leakage of the retinal vessels after intravenous injection with those after

intraperitoneal injection to determine the optimal conditions for *in vivo* circulation time and retinal preparations.

• **RESULTS:** After intravenous injection, compared to the retinal vascular condition under 20min *in vivo* circulation time of Evans blue and 20 or 40min of fixation, with 10min of *in vivo* Evans blue circulation and 60min of fixation, the morphology of retinal vascular was more intact with less retinal vascular leakage, and the vascular branches are clear. When intravenous injection failed, remediated results from intraperitoneal injection showed that the morphology and distribution of retinal vessels were intact. There was no significant difference in morphology, distribution and leakage of the retinal vessels after 3h of intraperitoneal Evans blue circulation compared to 10min intravenous Evans blue circulation.

• **CONCLUSION:** This experiment optimizes the protocol, improves the accuracy and reproducibility of retinal preparations, and provides a reference for the study of related retinal vascular diseases.

• **KEYWORDS:** retinal preparations; Evans blue; angiography; eyeball fixation; intravenous injection; intraperitoneal injection

Citation: Xing CT, Yu Q, Zhang LS, *et al.* Technique optimization of intravenous or intraperitoneal injection of Evans blue combined with retinal preparations in mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(7):1093-1098

0 引言

在眼科研究中,小鼠模型是广泛应用的实验动物之一,常用于研究各种眼部疾病的发病机制以及新型治疗方法的筛选^[1-3]。然而,由于小鼠眼球较小,活体实验很难对其进行视网膜血管观察,因此需要使用其他技术来观察小鼠视网膜血管的变化。常见的小鼠视网膜血管观察技术包括荧光素标记^[4-5]、光学相干断层扫描血管造影^[6-7]、荧光素血管造影^[8-9]等方法,静脉伊文思蓝推注联合视网膜铺片是研究视网膜血管性疾病的常用技术方法^[10-11]。该方法可以清楚地观察到视网膜血管的走形、分布及渗漏情况^[12-13],还能够对无灌注区的视网膜面积进行估算^[14-15],且具有成本低、易操作、高灵敏度等特点。但在视网膜铺片染色过程中,由于伊文思蓝注射后在体内循环时间、小鼠眼球在4%多聚甲醛固定液中的固定时间、视网膜铺片所用的时间等存在差异,加之使用的封片剂种类不同等技术问题,均会对实验结果的分析比较产生影响。因此,为了获得更好的实验结果,本实验中我们对上述问题进行了比较分析,并总结了视网膜铺片染色的实验技巧,优化了实验方案,以期对视网膜血管性疾病的相关研究提供更为准确、可靠的实验技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6 雄性 17 周龄小鼠 30 只,购自西安交通大学实验动物中心。所有动物实验部分均由陕西省缺血性心血管疾病重点实验室伦理委员会审核并批准

(SQXZDSYS202201)。1%伊文思蓝溶液:0.3g 伊文思蓝(Evans blue,美国 Sigma 公司)溶于 30mL 生理盐水中,震荡溶解,过滤,4℃低温避光保存,使用前取适量,且需水浴预热至 37℃ 备用。4%组织固定液(陕西中晖赫彩生物医药公司),抗荧光淬灭剂(索莱宝生物科技有限公司),体视显微镜(SZ2-ILST,日本 OLYMPUS 公司),倒置荧光显微镜(IXT3,日本 OLYMPUS 公司),小鼠尾注静脉显像仪(ZH-XQ,原阳振华教学仪器公司),15°眼科手术穿刺刀(南京易乐医疗器械有限公司),显微弹簧剪、显微有齿镊(瑞沃德生命科技有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 尾静脉注射 将小鼠置于自制小鼠固定器中,肉眼找到小鼠相对较粗的尾静脉,再用小鼠尾注静脉显像仪找到该静脉粗细均匀的部位,用 1mL 注射器(斜面朝上)与尾部呈 15°角穿刺进针,当注射器斜面基本完全没入尾部,将注射器尾部下压,尽量使其与鼠尾平行,同时向前行针,此时会有明显的无阻力感^[16]。当针进入血管约 1/4~1/3 时,推注 1%伊文思蓝溶液 0.3mL,注射后立即可见小鼠通体变为蓝色,尤其是口唇、耳、爪等裸露部位,表明该操作成功。分别于 10min(26 眼)、20min(6 眼)后处死小鼠^[17-18]。当鼠尾静脉注射失败时,给予小鼠腹腔注射 1%伊文思蓝溶液 0.3mL,分别在腹腔注射后 1、2、3h 观察小鼠体表颜色,发现在 3h 小鼠体表颜色与静脉注射 10min 最接近,因此,当尾静脉注射失败时,可以给予小鼠 1%伊文思蓝溶液 0.3mL 腹腔注射后循环 3h 的补救方法(8 眼),见图 1。

1.2.2 视网膜铺片 小鼠处死后立即摘取双侧眼球,去除眼球后部肌肉及结缔组织等眼球附属组织,置于 4%多聚甲醛固定液中进行固定,分别固定 20min(10 眼)、40min(10 眼)、60min(20 眼)后,在体视显微镜下用 15°眼科手术穿刺刀在角巩膜缘处做穿刺口(图 2A),用显微弹簧剪从穿刺口沿角巩膜缘剪开(图 2B),去除角膜、虹膜、晶状体、玻璃体,将眼杯以视神经为中心,放射状均匀剪开,分为 4 部分(图 2C),巩膜面朝上置于载玻片上,剪去视神经及巩膜与视神经移行处,使视网膜与葡萄膜完全脱离,去除巩膜、葡萄膜及视网膜上残留的色素组织,将视网膜平铺于载玻片上,滴 1~2 滴抗荧光淬灭剂,立即盖上盖玻片,置于倒置荧光显微镜下,通过绿色荧光进行拍照。

1.2.3 渗漏点计数 使用 Image J 软件计数每高倍视野下(HPF)视网膜荧光渗漏,其中片状渗漏仅记录 1 次。

统计学分析:采用 SPSS17.0 软件进行分析,使用 GraphPad Prism 软件进行绘图。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析比较多组间差异,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尾静脉注射与腹腔注射对比 当鼠尾静脉注射伊文思蓝溶液成功后,可见小鼠口唇爪等皮肤裸露部位即刻明显变蓝,此为伊文思蓝注射成功的标志。当鼠尾静脉注射失败时,给予小鼠 1%伊文思蓝溶液 0.3mL 腹腔注射循环 3h 后,小鼠的外观颜色对比无明显区别(图 3),且运用此

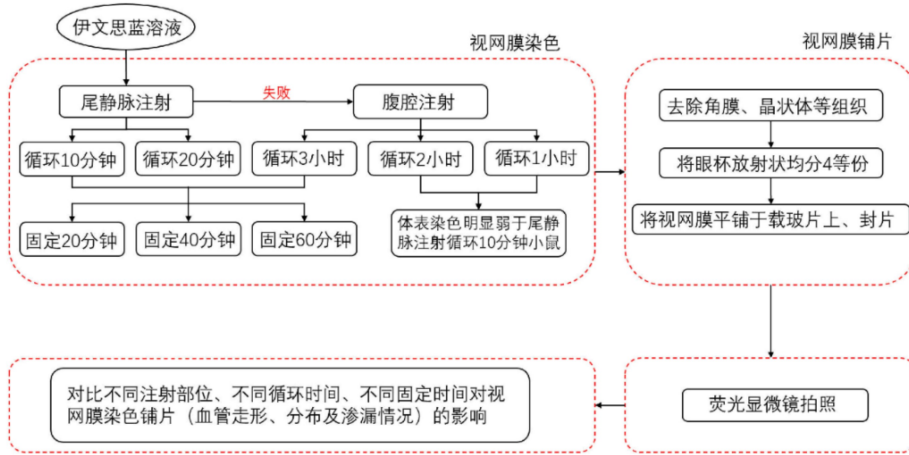


图1 实验流程图。

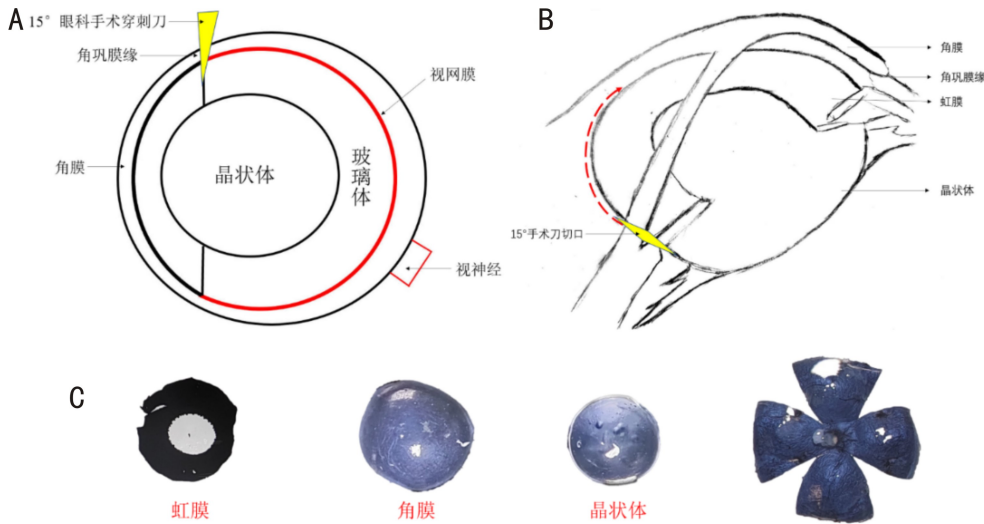


图2 视网膜剥离过程示意图 A:在体视显微镜下用15°眼科手术穿刺刀在角膜缘处做穿刺口;B:用显微弹簧剪从穿刺口沿角膜缘剪开;C:剥离的眼组织。

两种伊文思蓝注射方法制作的视网膜铺片,在荧光显微镜下观察可见血管走形及显影清晰程度无明显区别(图4)。

2.2 伊文思蓝体内循环时间的影响 当尾静脉注射伊文思蓝成功后,体内循环10min与20min相比,循环10min取材时,视网膜荧光拍照:血管外组织无荧光着色,血管与周围组织荧光对比明显,血管形态、走形清晰(图5A、D)。循环20min取材时,视网膜荧光拍照:血管外组织明显着色,血管与周围组织荧光对比不强烈,血管形态、走形欠清晰(图5B、E)。若尾静脉注射伊文思蓝失败后,要立即进行腹腔注射进行补救,若尾静脉注射失败后与腹腔注射间隔时间过长或过夜,视网膜组织会出现过染(图5C、F)。

2.3 组织固定时间的影响 4%多聚甲醛固定小鼠眼球20、40、60min对比,固定60min^[19]时小鼠视网膜与葡萄膜脱离更加完全,可以减少因不完全脱离进行操作造成的视网膜损伤。固定20min时,荧光显微镜下可见视网膜血管形态模糊不清,荧光渗漏明显(图6A);高倍镜下可见,血管走形不连续,背景荧光不均匀,无法形成很好的观察(图6D)。固定40min时,低倍镜下可见视网膜血管形态明显清晰,虽仍存在荧光渗漏,但明显减少(图6B);高倍镜下可见血管走形清晰、连续,背景荧光偶见不均匀(图6E)。固定60min时,低倍镜下可见视网膜血管形态

十分清晰(图6C);高倍镜下可见血管走形清晰连续,背景荧光均匀,偶见荧光渗漏,可以清晰明确地进行观察(图6F),组织固定20min进行操作时,视网膜出现荧光渗漏个数明显高于固定40、60min(图7)。

3 讨论

视网膜石蜡切片HE染色及视网膜铺片是研究视网膜血管性疾病的常用技术方法^[10,20]。伊文思蓝注射联合视网膜铺片是研究视网膜血管形态和血管渗漏的常用方法^[21-22],该方法能够清晰显示视网膜内整体的血管走形、形态及渗漏情况。通过查阅文献发现小鼠体内伊文思蓝溶液不同的注入方式、不同的体内循环时间,以及不同的组织固定时间均可影响视网膜铺片染色实验的准确性和可重复性,不利于研究者进行实验。故本研究对当前伊文思蓝注射联合视网膜铺片技术进行了系统地归纳总结以及优化。我们采用尾静脉注射的方式注入小鼠体内1%伊文思蓝溶液0.3mL,与之前文献报道的心脏灌注法、上腔静脉穿刺灌注法相比优势在于以下3个方面:(1)小鼠不需要进行麻醉,绝对避免了因麻醉造成的意外事件^[23-24]。(2)尾静脉注射与心脏灌注及上腔静脉灌注相比,小鼠尾静脉注射不需要打开小鼠胸腔或者颈部皮肤,直接通过尾静脉进行注射,明显减少操作时间,操作更加

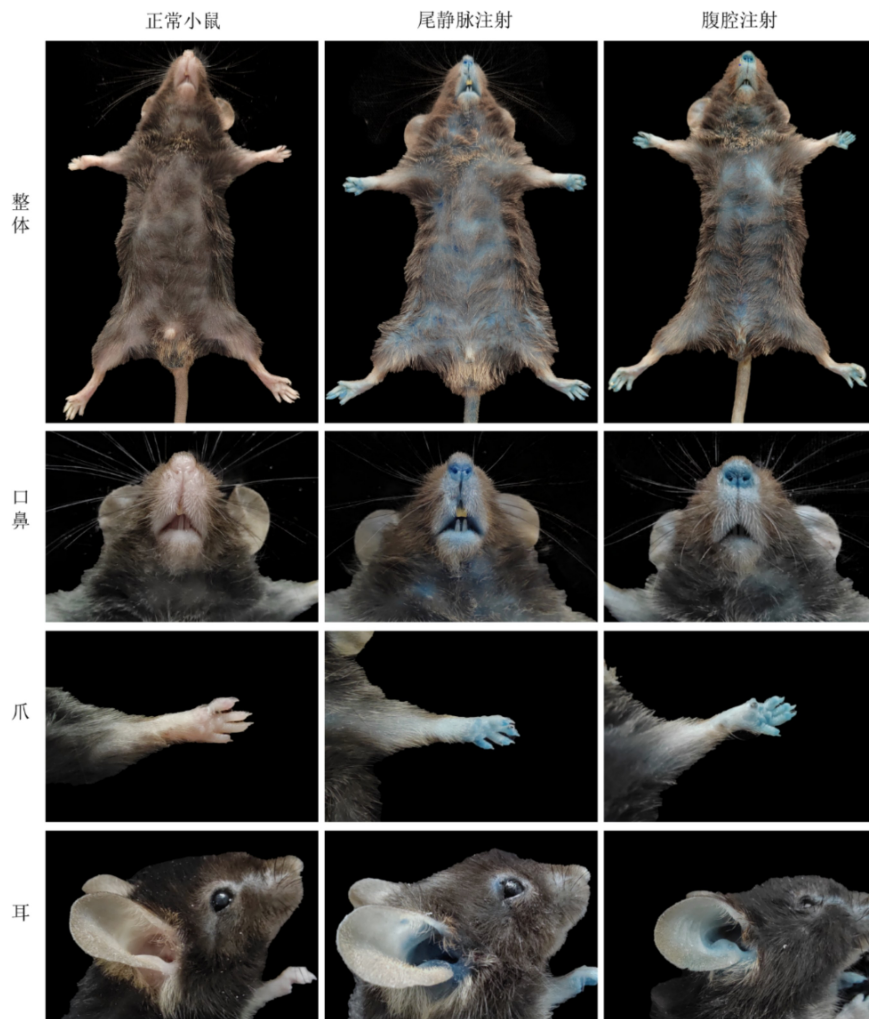


图3 正常小鼠、伊文思蓝尾静脉注射、伊文思蓝腹腔注射三者体表颜色对比 尾静脉注射及腹腔注射伊文思蓝后小鼠口鼻、爪、耳变蓝,且两者外观无明显区别。

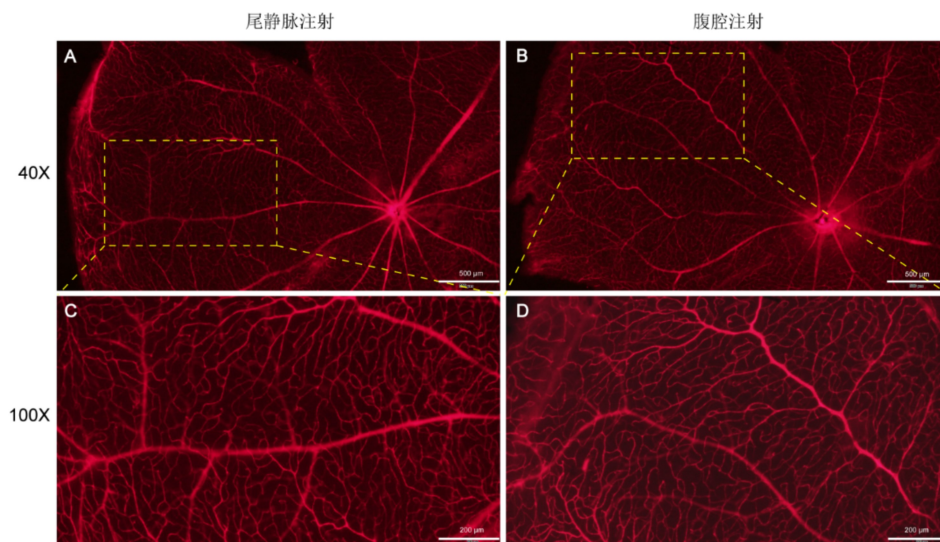


图4 伊文思蓝尾静脉注射与腹腔注射两者视网膜成像对比 血管走行及显影清晰程度无明显区别。A、B:500 μ m;C、D:200 μ m。

简便。(3)若尾静脉注射失败,可以通过立即进行腹腔注射来补救实验。通过分析本实验结果发现,腹腔注射方法虽然简单易操作,但是需要体内循环3h才能与尾静脉注射体内循环10min体表染色程度相近,其时间成本过高,大大延长实验时间。文献显示通过上腔静脉推注2%伊文思蓝,体内循环5min^[10],视网膜血管形态清晰。由于伊文思蓝有一定毒性以及参考伊文思蓝使用说明,本实验通

过尾静脉注射1%伊文思蓝溶液观察视网膜血管形态,结果显示1%伊文思蓝溶液体内循环10min时,视网膜血管形态清晰,视网膜血管外组织无荧光着色,血管与周围组织对比更加明显。由于组织固定时间^[25]及环境温度^[26]均可影响眼球固定效果,通过查阅文献我们分别观察了眼球固定20、40、60min对实验结果的影响,对比发现,室温16 $^{\circ}$ C条件下,眼球固定20min时,视网膜与葡萄膜黏连较

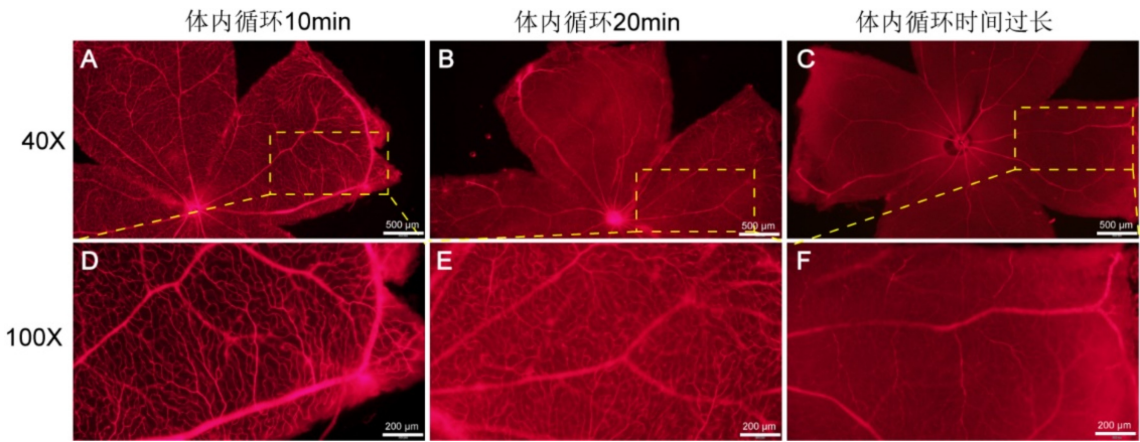


图5 伊文思蓝体内循环时间的影响 A:血管外组织无荧光着色,血管与周围组织荧光对比清晰;B:血管外组织明显着色,血管与周围组织荧光对比不明显;C:背景荧光过强,仅能看到大血管走形;D:血管形态、走形清晰;E:血管形态模糊,走形观察不清晰;F:背景荧光过强,血管网形态模糊,血管与周围组织无法形成对比。

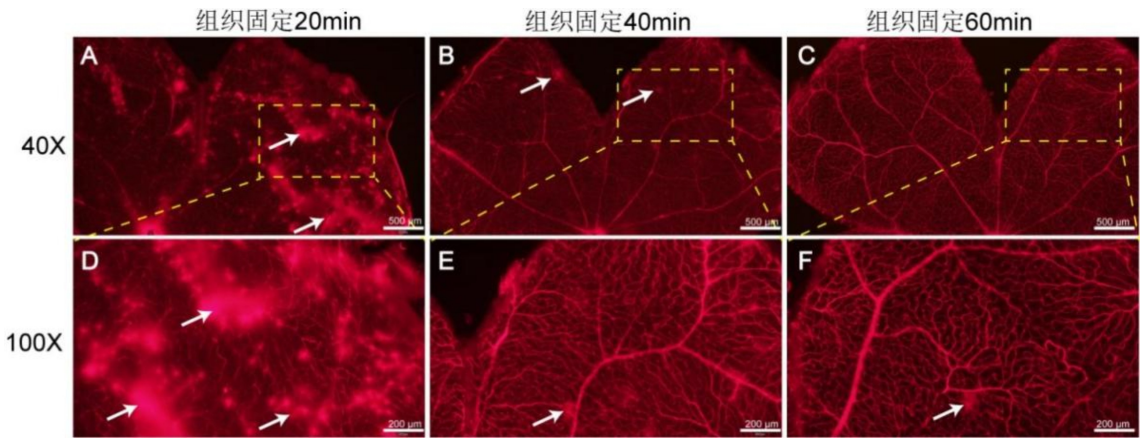


图6 组织固定时间的影响 A:血管走形模糊不清,荧光渗漏明显;B:血管走形可以观察,仍存在少量荧光渗漏;C:血管走形清晰,无荧光遮挡;D:血管形态模糊,背景荧光形成遮挡;E:血管形态较为清晰、连续,背景荧光偶见遮挡;F:血管形态清晰连续,背景荧光均匀。白箭头示荧光渗漏。

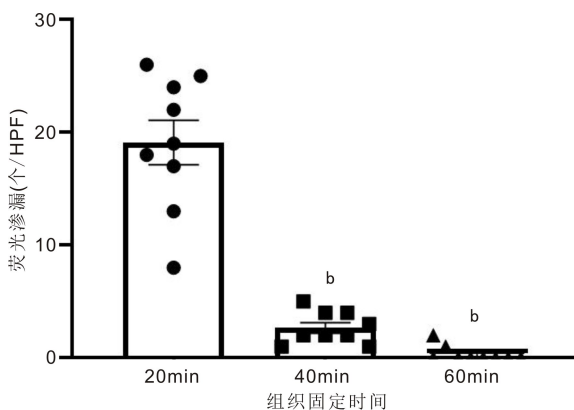


图7 组织固定 20、40、60min 视网膜荧光渗漏的差异 ^b $P < 0.01$ vs 组织固定 20min。

为紧密,在剥离时会对视网膜组织造成较大面积的损伤,严重影响实验结果;固定 40min 时,视网膜与葡萄膜存在少量黏连,且黏连紧密程度明显降低,剥离黏连处时仍存在损伤视网膜的风险;固定 60min 时,视网膜近乎完全脱离,减少因视网膜与葡萄膜黏连紧密,剥离视网膜组织造成的组织损伤。本研究为清晰地观察视网膜血管形态和血管渗漏提供了一种简便的、稳定的、重复性高的操作技术。

将实验中的技巧与心得进行总结与分析:(1)尾静脉注射 1%伊文思蓝 0.3mL 成功后,要严格把控 10min 的循环时间,及时处死小鼠进行眼球固定,循环时间过长,会出现血管周边组织着色。(2)尾静脉注射伊文思蓝失败后,立即进行腹腔注射进行补救,腹腔注射 1%伊文思蓝 0.3mL 循环 3h 与尾静脉注射 1%伊文思蓝 0.3mL 循环 10min 相比,体表染色程度相近且荧光显微镜下视网膜血管形态、走形、血管周边组织着色情况大致相同。如若尾静脉注射失败后间隔较长时间再进行腹腔注射,视网膜组织会出现过染,将无法对视网膜血管进行观察。(3)眼球在进行 4%多聚甲醛固定前,要先剪除眼外肌及筋膜等组织,充分暴露眼球外壁,确保眼球可以充分固定。小鼠眼球固定时,在室温 16℃ 情况下,以 50~60min 为宜,此时视网膜与葡萄膜基本完全脱离,可以有效避免实验者手动脱离对于视网膜造成的损伤。室温不同,固定的时间应当适当延长或缩短。(4)眼杯制作成功后,要观察切缘是否残存视网膜移行部位,因移行部位是视网膜与葡萄膜结合紧密部位,因此在最大程度保存视网膜组织的同时,尽量将视网膜移行部位剪除干净,避免在铺片过程中牵扯视网膜组织。(5)视神经处同样是视网膜与周围组织黏连紧密处,此处尽量将视神经平齐视网膜剪除,降低视网膜黏连程度,同时保证视网膜组织及视盘的完整性。(6)将眼杯

以视盘为中心,放射状剪开4处,剪开深度以眼杯边缘至视盘总长的2/3为宜,过于接近视盘,操作时容易造成视网膜组织撕裂损伤,剪开过于接近眼杯边缘,容易造成视网膜边缘卷曲,不易展片。(7)切忌先将视网膜剥离,再转移至载玻片上进行铺片。单纯视网膜很难在载玻片上展片成功,且在转移过程中极易损伤视网膜组织。应将整个眼杯转移至载玻片上进行展片。(8)将剪好的眼杯在载玻片上进行展片时,应将视网膜面朝下,滴1~2滴无菌PBS溶液或生理盐水可防止视网膜组织干裂,同时有助于展片的顺利进行。(9)封片前用吸水纸吸取多余水分,滴1~2滴抗荧光淬灭剂,立即盖上盖玻片并进行荧光显微镜下拍照,时间过长视网膜组织会发生固缩。

小鼠伊文思蓝静脉推注联合视网膜铺片技术是一种用于研究小鼠视网膜血管结构和功能的方法^[27-28]。该方法的优点包括可以同时观察视网膜血管的形态及渗漏情况,并且能够研究视网膜血管性疾病相关病理变化和发展动态。另外,和其他检测方法相比,静脉推注技术不需要特殊设备和操作技能,其操作简单,成本低廉^[29-30]。

参考文献

- 1 Beli E, Yan YQ, Moldovan L, et al. Restructuring of the gut microbiome by intermittent fasting prevents retinopathy and prolongs survival in db/db mice. *Diabetes* 2018;67(9):1867-1879
- 2 Doustar J, Rentsendorj A, Torbati T, et al. Parallels between retinal and brain pathology and response to immunotherapy in old, late-stage Alzheimer's disease mouse models. *Aging Cell* 2020;19(11):e13246
- 3 Xia F, Ha Y, Shi SZ, et al. Early alterations of neurovascular unit in the retina in mouse models of tauopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2021;9(1):51
- 4 Alex AF, Alnawaiseh M, Heiduschka P, et al. Retinal fundus imaging in mouse models of retinal diseases. *Methods Mol Biol* 2019;1834:253-283
- 5 Shi H, Wang XR, Bi MC, et al. Comparison of three fluorescence labeling and tracking methods of endothelial progenitor cells in laser-injured retina. *Int J Ophthalmol* 2018;11(4):580-588
- 6 Duggan E, Smith CA, Hooper ML, et al. Colocalization of optical coherence tomography angiography with histology in the mouse retina. *Microvasc Res* 2020;132:104055
- 7 Smith CA, Hooper ML, Chauhan BC. Optical coherence tomography angiography in mice: quantitative analysis after experimental models of retinal damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60(5):1556-1565
- 8 Kim AJ, Chang JY, Shi LH, et al. The effects of metformin on obesity-induced dysfunctional retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(1):106-118
- 9 Song WY, Zhou LB, Yi J. Volumetric fluorescein angiography (vFA) by oblique scanning laser ophthalmoscopy in mouse retina at 200 B-scans per second. *Biomed Opt Exp* 2019;10(9):4907-4918

- 10 孟丽娜,刘廷,董晓光.小鼠血管灌注造影视网膜铺片操作技术及技巧探讨. *眼科新进展* 2009;29(9):663-666
- 11 Shi KP, Li YT, Huang CX, et al. Evans blue staining to detect deep blood vessels in peripheral retina for observing retinal pathology in early-stage diabetic rats. *Int J Ophthalmol* 2021;14(10):1501-1507
- 12 陈秋卢. TREM-1和VEGF在糖尿病视网膜病变病程进展中的相互作用. 青岛大学 2021
- 13 杨林. LMT-28靶向调控gp130/STAT3信号通路对早期糖尿病视网膜病变的干预作用及机制研究. 南昌大学 2022
- 14 李蓉,姚国敏,王小娣.改良视网膜铺片联合免疫荧光染色技术在氧诱导视网膜病变模型中的应用. *中华实验眼科杂志* 2016;34(12):1077-1080
- 15 杨千惠. α -MSH对视网膜血管渗漏和新生血管作用研究. 天津医科大学 2018
- 16 胡娜,邓诗瑜,许珍珍,等.一种简单易行的小鼠尾静脉注射方法和验证方法. *农垦医学* 2019;41(1):89-91
- 17 卢今,张颖,潘学营,等.2020版美国兽医协会动物安乐死指南解析. *实验动物与比较医学* 2021;41(3):195-206
- 18 Newsome JT, Clemmons EA, Fitzhugh DC, et al. Compassion fatigue, euthanasia stress, and their management in laboratory animal research. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2019;58(3):289-292
- 19 刘子赫,贾宁,贾瑞华,等.不同固定方法处理小鼠视网膜免疫荧光染色的效果比较. *现代生物医学进展* 2019;19(11):2066-2071,2024
- 20 李瑞萍,孙仪征,范文娟,等.小鼠视网膜剥离及铺片改良应用于电生理学的研究. *河南大学学报(医学版)* 2016;35(3):189-191
- 21 张富文,段俊国,赵凌,等.芪灯明目胶囊对高血糖大鼠血视网膜屏障影响的研究. *国际眼科杂志* 2013;13(6):1077-1080
- 22 陈茜,王菁,魏伟.五苓散对糖尿病视网膜病变大鼠血-视网膜屏障的保护作用. *国际眼科杂志* 2019;19(2):204-208
- 23 鹿双双,荣蓉,师晓萌,等.小鼠滴鼻剂量与麻醉方法国内近年文献分析. *实验动物与比较医学* 2018;38(6):455-458
- 24 邹芦,戴天娥,卢晓,等.替来他明/唑拉西洋联合右美托咪定对BALB/c小鼠麻醉效果观察. *实验动物与比较医学* 2019;39(4):310-313
- 25 王鸿,周晟,代鹏.5种固定液对淋巴结冷冻切片HE及免疫组化染色效果的影响. *临床与实验病理学杂志* 2020;36(8):987-989
- 26 邱鑫罡.固定液配方及固定时间对脏器重量、尺寸及固定效果的影响研究. 华中科技大学 2019
- 27 王亚娜,张磊. PEDF对氧诱导视网膜病变小鼠视网膜MCP-1表达的影响. *国际眼科杂志* 2019;19(1):21-25
- 28 陈珍,俞颂平,李俊,等.七叶皂苷钠对糖尿病模型大鼠血-视网膜屏障损伤的保护作用及机制研究. *浙江中西医结合杂志* 2019;29(7):530-533,613
- 29 刘月白,李昌平.小鼠尾静脉注射新方法. *现代医学* 2018;46(3):294-297
- 30 温军业,范晓燕,何东伟,等. C57BL/6小鼠尾静脉四种穿刺方法的比较. *中国比较医学杂志* 2018;28(5):105-108