

## · 论著摘要 ·

## 视网膜静脉阻塞家兔模型的建立

何晓健 李毓敏

【关键词】 视网膜静脉阻塞; 疾病模型, 动物

【中图分类号】 R776.4

视网膜静脉阻塞(RVO)是眼科常见视网膜血管病变,发病机制尚未完全明了,目前尚无有效的治疗方法。RVO 动物模型的建立是其病理和治疗转归研究的基础,本研究的目的是建立一个 RVO 家兔模型,为今后研究 RVO 发病机制和治疗实验奠定基础。

## 1 材料和方法

选用健康成年有色家兔(由浙江省医学科学院实验动物中心提供),雌雄不限,体重 2.5~3.0 kg。随机分成正常对照组(2 只眼)和 RVO 模型组(12 只眼)。RVO 模型组再根据 RVO 后不同时间(1、2、4 周)随机分成 3 组,每组 4 只眼,每只眼取鼻、颞侧 2 个电凝点。

造模前充分散瞳,采用氯氨酮间断推注及异丙酚静脉维持全身麻醉,于颞上角巩膜后 2 mm 用 20 g 巩膜穿刺刀做一巩膜切口。放置角膜接触镜,插入眼内电凝探针,根据手术前荧光眼底血管造影(FFA)结果和手术中压迫血管壁判定视网膜动静脉,电凝视盘两侧的视网膜静脉。电凝血管从视盘边缘开始约 2/3 个视盘直径(DD)长度,能量 6~8%,直至血流中断,血管壁完全消失呈灰白色。手术前及手术后各个观察时间点采用眼底镜、眼底照相、FFA 观察视网膜及其血管的变化。

分别于观察期结束后空气栓塞处死并立即摘除眼球,在距视盘 2 DD 处做垂直于视网膜血管的全层取材制成光学显微镜标本。在 RVO 模型 2 周组中随机取 1 只兔眼,摘除眼球后切除鼻颞两侧距视乳头 3 DD 血管处的全层视网膜组织制成电子显微镜标本,其余部分处理同其他兔眼。

## 2 结果

正常家兔眼底视盘位于黄斑中心之上,两旁和有髓神经纤维束相连。视网膜血管从视盘两旁向外放射,分布于有髓神经纤维分布的区域。其中动脉从视盘中心穿出,静脉从视盘边缘进入,可为一支或两支。荧光素钠注射后约 5 s 时出现背景荧光和视盘充盈,6~7 s 静脉出现层流,9 s 静脉完全充盈。光学显微镜下视网膜各层次结构整齐,视网膜血管位于视网膜表面或神经节细胞浅层,颗粒层细胞排列紧密。

经玻璃体眼内电凝视网膜静脉后即刻~24 h,眼底镜下见

基金项目:浙江省科技计划项目(2003C33003)  
作者单位:310003 杭州,浙江大学医学院附属第一医院眼科(何晓健,现在杭州市第一人民医院眼科)  
通讯作者:李毓敏,Email: Liyumin77@hotmail.com

电凝静脉闭锁,受阻静脉直至终末小静脉明显迂曲扩张。阻塞后 2~3 d 静脉阻塞区小片出血沿血管分布呈火焰状,视网膜严重水肿。阻塞后 1 周电凝静脉两侧出现侧支血管芽,阻塞区火焰状出血缓慢吸收。FFA 造影动脉充盈在 8 s 后,静脉则至 9 s 后才显充盈,动脉管径相对变窄或闭塞,出现末梢血管瘤样扩张及毛细血管荧光素无灌注。光学显微镜检查显示细胞层次结构混乱,内层视网膜淤血、水肿,血管内皮细胞壁损伤,伴有神经纤维层空泡。阻塞 2 周后电凝血管隐约再通或侧支循环形成,阻塞区出血完全吸收,毛细血管无灌注面积减少。光学显微镜检查显示视网膜出血、水肿吸收。电子显微镜检查结果显示线粒体肿胀、空泡、嵴消失。

## 3 讨论

迄今为止,文献报道的阻塞血管的方法各有不同:血管结扎模型<sup>[1]</sup>损伤较大,现已经基本不用;凝血酶静脉滴注法<sup>[2]</sup>和玻璃体注入内皮素-1<sup>[3]</sup>虽可造成暂时的完全性视网膜血管阻塞,但形成的血栓具有不确定性,并可造成其他部位的栓塞;激光光凝法<sup>[4]</sup>是目前较常用的方法,我们在预实验时曾用该方法建模,研究发现阻塞血管极易再通而需多次补充光凝,而较高的能量和较长激光时间对视网膜色素上皮细胞和感光细胞可造成严重的热损伤<sup>[5]</sup>,激光光凝血管壁受损引发的玻璃体积血可影响眼底观察;近年来有人采用光化学法建立 RVO 模型<sup>[6]</sup>,该模型可以用较小的激光能量阻塞血管,静脉内血栓形成机制与临床较相似,但需要特殊的仪器设备及孟加拉红等光敏剂,价格相对昂贵。

为此我们在实验中探索了经玻璃体眼内电凝法建立 RVO 模型,结果显示该方法制备的实验性 RVO 模型,可以出现明显的视网膜静脉迂曲,血流停滞,视网膜水肿和火焰状出血,后期有毛细血管无灌注产生,其形态学和组织病理学改变与人相近。

然而,实验性 RVO 后 1 周在阻塞区两侧出现侧支血管芽,视网膜病变通常在 2 周缓解。这可能是实验动物原为健康血管床,具有迅速产生侧支循环进行代偿修复的潜能。当然这些早期的毛细血管性通道在大分支 RVO 时并不能有效缓解微循环障碍。在 RVO 后 2 周,电子显微镜观察仍有线粒体肿胀、空泡、嵴消失现象。Genevois 等<sup>[4]</sup>认为这种状态可以持续到阻塞后 1 个月,只有形成管径较粗、高血流、低阻力的侧支通道才起到有效的引流作用。因此,用 RVO 模型评估疗效时应考虑侧支循环

的建立可缓解视网膜缺血和缺氧状态。

相比而言,采用经玻璃体内电凝法建立 RVO 模型是一种新的尝试。虽然是侵入性手术,但血管定位准确,即时即可判定,血栓形成较可靠,是一种可行的方法。我们选用家兔为造模动物主要是考虑其眼球较大及手术、FFA 摄影条件稳定,如果选择猪、狗或灵长类的猕猴造模,由于其视网膜血供系统和人类较接近,相信结果会更令人满意。

#### 4 参考文献

1 Hayreh SS, van Heuven WA, Hayreh MS. Experimental retinal vascular occlusion. I. Pathogenesis of central retinal vein occlusion. Arch Ophthalmol, 1978, 96:311-323.

2 Tamura M. Neovascularization in experimental retinal venous obstruction in rabbits. Jpn J Ophthalmol, 2001, 45:144-150.  
3 Takei K, Sato T, Nonoyama T, et al. A new model of transient complete obstruction of retinal vessels induced by endothelin-1 injection into the posterior vitreous body in rabbits. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1993, 231:476-481.  
4 Genevois O, Paques M, Simonutti M, et al. Microvascular remodeling after occlusion-recanalization of a branch retinal vein in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45:594-600.  
5 周正中,王玲,王康孙. 视网膜静脉阻塞的动物模型. 中国实用眼科杂志, 2003;447-451.  
6 Larsson J, Carlsson J, Olsson SB. Ultrasound enhanced thrombolysis in experimental retinal vein occlusion in the rabbit. Br J Ophthalmol, 1998, 82:1438-1440.

(收稿日期:2004-12-16)

(本文编辑:朱敏)

## 白细胞介素-1 $\beta$ 促人视网膜色素上皮细胞分泌 细胞间黏附分子和整合素 $\beta_1$

万华 邝国平 郭丽花 姜德咏

【关键词】 白细胞介素 1; 色素上皮,眼; 细胞粘着分子; 抗原,CD29

中图分类号:R774.1 R446-39

增生性玻璃体视网膜病变(PVR)的病程进展与细胞粘附、移行和增生的能力密切相关。细胞黏附分子(CAMs)中的整合素  $\beta_1$  和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)介导了细胞-基质及细胞-细胞间的相互作用,调节细胞的移行、分化和增生,与 PVR 相关性较大。我们选择二者作为研究对象,检测它们在炎症因子白细胞介素(IL)-1 $\beta$  作用下视网膜色素上皮(RPE)细胞中的表达情况,旨在探讨 CAMs 在 PVR 炎症过度修复病理过程中的作用及炎症因子 IL-1 $\beta$ 、CAMs 在 PVR 发病机制中的相互关系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

从意外死亡的健康成年男性获得 3 个供体眼球分离培养,获得人 RPE 细胞进行原代培养,传代及鉴定;取 3~6 代细胞进行实验。IL-1 $\beta$  购自深圳晶美公司,整合素  $\beta_1$  mRNA 原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司,双抗体夹心法酶联免疫检测人 ICAM-1 试剂盒购自深圳晶美公司。

#### 1.2 实验方法

收集 RPE 细胞,以  $5 \times 10^4$  个/ml 的细胞密度接种,常规培养 24 h,细胞铺满孔底近融合时,换为无血清培养基同步,继续孵育 24 h,分别加入终浓度为 0(对照组)、50、100、200、400、800 U/ml 的 IL-1 $\beta$ ,于 24、48 h 两个时间点收集上清液,其中 100 U/ml 组另设三孔于 12 h 收集上清液,以离心半径 2.5 cm、

1 000 r/min 离心 5 min,  $-20^\circ\text{C}$  保存待测。细胞用多聚甲醛固定后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,晾干备用。

整合素 DNA-mRNA 原位杂具体操作步骤参照试剂盒说明书,显色后在光学显微镜下观察并进行计算机图像分析。ICAM-1 酶联免疫吸附试验(ELISA)具体操作步骤参照试剂盒说明书,显色后在酶标仪 450 nm 处测吸光度[A,旧称光密度(OD)]值,绘制标准曲线,算出待测标本的浓度;以上实验每组设 3 个平行孔,重复 3 次,各种指标检测取平均值。行原位杂交标本计算机图像分析,将图像输入计算机,采用 BioMass99 分析系统对图像进行彩色分割,半二值化处理,测定每幅图像的阳性面积、平均 A 值及积分 A 值。阳性面积表示阳性反应区域大小,平均 A 值表示各点的阳性反应程度,积分 A 值为视野中各阳性部位的平均 A 值与面积乘积的和。每张标本取 5 个点分析,取平均值。

#### 1.3 统计学方法

所有数据均用 SPSS for Windows(10.0)软件包建立数据库,两组样本之间的比较采用 *t* 检验,多组均数的比较采用方差分析和 *q* 检验。

### 2 结果

原代培养的人 RPE 细胞呈卵圆形或多角形,核大透明,细胞浆内充满黑色素粒,传 3 代色素基本消失。免疫细胞化学染色结果显示,RPE 细胞细胞浆内呈特异性棕褐色网状阳性染色。

加入 IL-1 $\beta$ (0~800 U/ml)后 24、48 h,检测 RPE 细胞中整

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二医院眼科(万华,现在广州空军医院)

通讯作者:万华,Email: drwan32@hotmail.com