

• 早产儿视网膜病变研究 •

代谢性酸中毒诱导新生大鼠视网膜
新生血管的实验研究

陈宜 黎晓新 Jonathan M. Holmes

【摘要】 目的 了解代谢性酸中毒诱导新生大鼠视网膜病变的发展进程,探讨其发生与血管内皮生长因子(VEGF)的关系。**方法** 实验组新生 Sprague-Dawley 大鼠 425 只。从大鼠出生后第 2 天开始按 535 mg/kg 的剂量管饲 NH_4Cl (浓度为 50 mg/ml),每天 2 次,管饲 6 d,然后进入恢复期。另选 150 只新生大鼠未进行管饲,作为对照组。两组大鼠分别于出生后 3、5、8、10、13、20 d 处死。取出双眼进行视网膜铺片和二磷酸腺苷酶染色,对视网膜血管进行评估;用酶联免疫分析法进行 VEGF 的测定。**结果** 实验组鼠在出生后 3、5、8、10、13、20 d 的新生血管(NV)发生率分别为 0%、9%、26%、55%、19%、0%。出生后第 3 天,实验组鼠 VEGF 的蛋白水平 $[(101.1 \pm 14.2) \text{ pg/mg}]$ 比对照组 $[(133.2 \pm 15.9) \text{ pg/mg}]$ 下降($P=0.004$),出生后第 8 天,实验组鼠 VEGF 蛋白水平 $[(98.4 \pm 19.2) \text{ pg/mg}]$ 比对照组 $[(78.1 \pm 8.7) \text{ pg/mg}]$ 升高($P=0.028$);出生后第 5、10、13、20 天,两组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 代谢性酸中毒可能损害了正在发育的视网膜血管而引起新生血管;酸中毒引起的视网膜新生血管与 VEGF 有关。

【关键词】 视网膜病,早产儿/病因学; 酸中毒; 内皮生长因子; 视网膜新生血管;
疾病模型,动物

中图分类号:R774.13 R446

Metabolic-acidosis-induced retinal neovascularization CHEN Yi*, LI Xiao-xin, Jonathan M. Holmes.
*Department of Ophthalmology, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044, China
Corresponding author: CHEN Yi, Email:chenyi88888@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To detect the development of retinal neovascularization (NV) induced by metabolic acidosis in neonatal rats and investigate the relationship between the occurrence of NV and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** A total of 425 newborn Sprague-Dawley rats in experimental group underwent tubal feeding of NH_4Cl (535 mg/kg) with the concentration of (50 mg/ml) (twice per day) from the 2nd day after the birth for 6 days and followed by a period of recovery. Additional 150 neonatal rats were in the control group without the tubal feeding. The rats were executed at the 3rd, 5th, 8th, 10th, 13th, 20th day after birth respectively. The retinal vessels were evaluated through retinal stretched preparation and adenosine diphosphatase (ADPase) staining; VEGF in retina was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** In the experimental group, the incidence of retinal NV at the 3rd, 5th, 8th, 10th, 13th, 20th day after birth was 0%, 9%, 26%, 55%, 19%, and 0% respectively. At the 3rd day, the expression of VEGF protein was lower in experimental group $[(101.1 \pm 14.2) \text{ pg/mg}]$ than that in the control group $[(133.2 \pm 15.9) \text{ pg/mg}]$ ($P=0.004$), while at the 8th day it was higher in experimental group $[(98.4 \pm 19.2) \text{ pg/mg}]$ than that in the control group $[(78.1 \pm 8.7) \text{ pg/mg}]$ ($P=0.028$). There was no significant difference between the two groups at the 5th, 10th, 13th, and 20th day ($P>0.05$). **Conclusions** Metabolic acidosis may induce NV by injuring the developing retinal vessels. Retinal NV induced by acidosis relates to VEGF.

【Key words】 Retinopathy of prematurity/etiology; Acidosis; Endothelial growth factors;
Retinal neovascularization; Disease models, animal

酸中毒是早产儿视网膜病变(ROP)的高危因素已有报道^[1,2],且已有用不同的方法引起酸中毒诱导新生大鼠视网膜新生血管^[3-5]。但视网膜新生血管随时间的发展变化尚不清楚,因此,本研究选择多个时间点

观察了解视网膜病变的发生和发展情况,并鉴于血管内皮生长因子(VEGF)在新生血管发生中的重要作用^[6-9],探讨了 VEGF 在酸中毒引起视网膜新生血管动物模型中的变化规律。

1 材料和方法

1.1 模型的建立和分组

作者单位:100044 北京大学人民医院眼科中心(陈宜、黎晓新);美国纽约医学中心眼科(Jonathan M. Holmes)

通讯作者:陈宜,Email:chenyi88888@vip.sina.com

研究用新生 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (美国 Charles River 公司) 425 只, 雌雄不限, 出生体重为 6.0~7.0 g, 为酸中毒组。大鼠出生 24 h 内再分为 17 组, 每 25 只为一组, 与 1 只母鼠一起饲养。从出生第 2 天开始按 535 mg/kg 的剂量管饲 NH_4Cl (浓度为 50 mg/ml), 每天 2 次, 管饲 6 d, 然后进入恢复期 0~12 d。分别在出生后 3、5、8、10、13、20 d 处死所有存活大鼠。另外选取未进行管饲的新生大鼠共 150 只, 分为 6 组作为对照组, 每组各 25 只大鼠, 分别在出生后 3、5、8、10、13、20 d 处死动物。

1.2 视网膜血管的分析

处死动物后取出右眼, 用 10% 福尔马林溶液固定。去除角膜、晶状体, 分离视网膜平铺。进行二磷酸腺苷 (ADP) 酶染色^[6]。将染色后的视网膜铺片在光学显微镜下进行评估。评估时加入同年龄的正常大鼠视网膜铺片, 并采用盲法由一位经验丰富的评估员评估。把整个视网膜分成 12 个钟点, 检查几个钟点上是否有新生血管, 钟点数表示新生血管的严重程度^[1]。

1.3 视网膜血管化程度的测定

ADP 酶染色后的视网膜铺片用 Leaf45 扫描仪 (加拿大 CreoSeritex 公司) 获取数码图像。利用 Analyze 图像分析软件 (美国梅约医学中心) 分析视网膜血管化的面积占总面积的百分比。

1.4 VEGF 的测定

处死动物后取出左眼, 在磷酸缓冲液 (PBS) 中快速去除角膜、晶状体, 分离视网膜, -70℃ 冰箱冷冻。每组随机取出对侧眼发生新生血管和没有发生新生血管的视网膜共 6~15 个, 分别组织匀浆, 采用细胞溶解缓冲液提取蛋白, 用二金鸡钠酸 (BCA) 蛋白分析试剂 (美国 Pierce 公司) 对蛋白定量。酶联免疫分析 (ELISA) 法测定 VEGF 含量 (美国 R&D System 公司)。

1.5 统计学分析

酸中毒组和对照组新生血管发生率采用卡方检验。酸中毒组中, 相邻两组的新生血管发生率采用卡方检验。酸中毒组和对照组的视网膜血管化面积占总面积的百分比和血管内皮生长因子数据以均值±标准差表示, 采用 SPSS11.0 统计软件进行独立样本 *t* 检验进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物存活情况

在出生后第 3、5、8、10、13、20 天, 酸中毒组大鼠存活的数目分别为 50、36、37、30、62、29 只, 存活率分别

为 100%、72%、50%、40%、50%、58%; 对照组大鼠存活的数目分别为 24、20、20、18、18、17 只, 存活率分别为 97%、80%、80%、72%、72%、68%。

2.2 新生血管的发生率

酸中毒组总的新生血管发生率为 17%, 对照组无一发生新生血管。两组新生血管发生率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 22.17, P = 0.0000$)。酸中毒组在第 3、5、8、10、13、20 天新生血管的发生率分别为 0%、9%、26%、55%、19%、0%。第 10 天, 视网膜新生血管达到高峰 (图 1、2)。并与相邻两天的新生血管发生率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.83, P = 0.03; \chi^2 = 9.84, P = 0.002$)。第 3、5 天之间新生血管发生率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.19, P = 0.14$)。第 5、8 天之间, 第 13、20 天

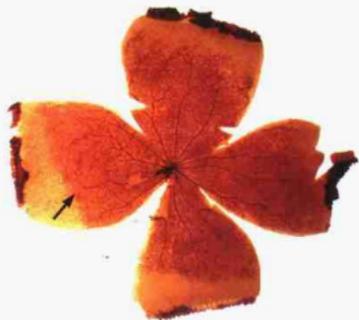


图1 酸中毒组第10天视网膜ADP酶染色铺片彩色像。新生血管发生在血管区与无血管区交界处(黑箭) ADP酶染色。
Fig.1 Photochrome of ADP staining of retinal stretched preparation of a 10-day old rat in the acidosis group. Neovascularization between vascular and avascular area (black arrow) ADPase staining

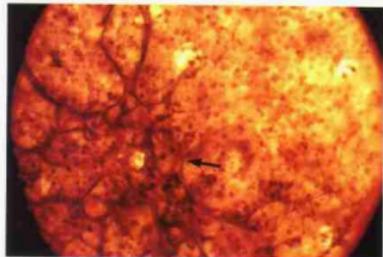


图2 酸中毒组第10天视网膜ADP染色铺片彩色像, 可见视网膜新生血管(黑箭) ADP酶染色 $\times 25$ 。
Fig.2 Photochrome of ADP staining of retinal stretched preparation of a 10-day-old rat in the acidosis group. Neovascularization (black arrow) ADPase staining $\times 25$

之间差异有统计学意义($\psi_2 = 4.36, P = 0.04; \psi_2 = 5.49, P = 0.02$)。到第 20 天新生血管自发消退。

2.3 新生血管的严重程度

酸中毒组大鼠中最严重的新生血管钟点数为 6, 出现在出生后第 10 天。第 5 天最严重的钟点数为 1, 第 8 天为 3, 第 13 天为 4。在第 10 天严重新生血管最多(表 1)。

表 1 出生后各天酸中毒组大鼠各钟点位出现视网膜的新生血管情况

出生后 天数(d)	总眼数 (只)	各钟点位出现新生血管的眼数(只)						
		6点 钟位	5点 钟位	4点 钟位	3点 钟位	2点 钟位	1点 钟位	0点 钟位
3	50	0	0	0	0	0	0	50
5	36	0	0	0	0	1	2	33
8	37	0	0	0	1	3	6	27
10	30	1	0	1	3	5	6	14
13	62	0	0	0	1	4	8	49
20	29	0	0	0	0	0	0	29

2.4 视网膜血管化程度

新生大鼠出生时视网膜血管没有发育完全,随着时间的延长,视网膜血管从中央不断向周边生长,第 20 天,酸中毒组和对照组大鼠的视网膜完全血管化。在第 5、8、10 天,酸中毒组视网膜血管化的面积占视网膜的总面积的百分比小于对照组,差异有统计学意义($t = 6.17, 6.85, 5.33; P$ 均 $= 0.00$)。在第 3、13、20 天差异无统计学意义($t = 0.34, 1.18, 0.08; P = 0.73, 0.24, 0.94$)(表 2)。

2.5 VEGF 的含量

出生后第 3 天,酸中毒组大鼠视网膜 VEGF 的蛋白水平 $[(101.1 \pm 14.2) \text{ pg/mg}]$ 比对照组 $[(133.2 \pm 15.9) \text{ pg/mg}]$ 下降,差异有统计学意义($P = 0.004$);出生后第 8 天,酸中毒组大鼠 VEGF 的蛋白水平 $[(98.4 \pm 19.2) \text{ pg/mg}]$ 比对照组 $[(78.1 \pm 8.7)$

$\text{pg/mg}]$ 升高,差异有统计学意义($P = 0.028$)。在第 5、10、13 和 20 天,两组差异无统计学意义($t = 1.28, 2.04, 0.13, 1.27; P = 0.23, 0.07, 0.90, 0.23$)(表 3)。

3 讨论

本实验动物模型中,大鼠的视网膜新生血管发生在视网膜血管区与无血管区的交界处,类似于人类 ROP 中新生血管的发生部位^[11]。我们发现新生 SD 大鼠经历酸中毒后视网膜的血管化程度落后于对照组,说明酸中毒可以抑制或损害发育中的血管;同时发现新生 SD 大鼠经历酸中毒 3、6 d 后,并不需要恢复期就产生了新生血管,这与临床上观察到有的婴儿在酸中毒期间就发生 ROP 是一致的。每天 2 次的 NH_4Cl 管饲可能会存在 2 次剂量之间有一定的 pH 值恢复,但我们以前的研究发现这种 pH 值的波动很小^[3]。

虽然没有恢复期也可以产生新生血管,但最多的新生血管是在恢复 2 d 后产生的。这与我们原先的假设是符合的,即酸中毒可能损害了正在发育中的血管。虽然在酸中毒早期可以激发产生新生血管,但还是需要一定的恢复期达到最多的新生血管。

在酸中毒引起的新生血管模型中,在 20 d 时新生血管自发消退。自发消退被认为是 ROP 动物模型的缺点,但这与在婴儿上发生的 ROP 是类似的^[12]。尤其本模型中的新生血管在形态上与人类的视网膜新生血管非常类似,而且在临床上至少 70% 的 3 期 ROP 患儿自发消退^[12]。对这个模型中新生血管随时间的发展变化的研究,有助于利用这个模型进行抗新生血管药物的研究。为选择药物的应用时间和评估视网膜新生血管的时间作参考。对于新生血管自发消退的机理研究可为开发抗新生血管的新药物提供思路。

本实验中,动物的存活率不是 100%,而且随着时间的延长,存活率下降。这种情况很难控制,因为动物

表 2 各组大鼠出生后各时间点视网膜血管化的面积占视网膜总面积的百分比($\bar{x} \pm s$)(%)

组别	大鼠出生后各时间点(d)					
	3	5	8	10	13	20
酸中毒组(%) (n)	34.24 ± 6.87(50)	45.40 ± 5.77*(36)	68.28 ± 9.09*(37)	79.83 ± 6.20*(30)	96.20 ± 2.9(62)	99.01 ± 1.45(29)
对照组(%) (n)	34.80 ± 5.81(24)	54.36 ± 3.96 (20)	86.11 ± 9.92 (20)	88.84 ± 4.63(18)	97.03 ± 1.30(18)	99.04 ± 1.02(17)

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$ (第 5、8、10 天, $t = 6.17, 6.85, 5.33; P$ 均 $= 0.00$)

表 3 各组大鼠出生后不同时间的 VEGF 含量($\bar{x} \pm s$)(pg/mg)

组别	大鼠出生后各时间点(d)					
	3	5	8	10	13	20
酸中毒组(n)	101.05 ± 14.17*(6)	112.86 ± 20.74(7)	98.26 ± 19.20*(11)	77.07 ± 24.10(15)	86.37 ± 12.30(12)	68.66 ± 5.31(6)
对照组(n)	133.18 ± 15.90 (6)	128.73 ± 24.13(6)	78.06 ± 8.70 (6)	98.42 ± 12.43(6)	87.10 ± 7.79(6)	73.49 ± 7.69(6)

注: * 与对照组比较, 第 3 天 $t = 3.69, P = 0.004$; 第 5 天 $t = 2.42, P = 0.03$

死亡后组织很快发生自溶,所以对死亡的大鼠不能进行视网膜血管的评估。但是这并不影响我们的实验结果,即视网膜新生血管的产生不需要恢复期。

VEGF 是调节新生血管生长的非常重要的生长因子。以往的研究发现在高浓度氧环境中,它是下调的,而在相对低氧的环境中,它上调从而引起了新生血管^[6-9]。我们在本研究中发现,在酸中毒早期,VEGF 是下调的,而在恢复期,最多的新生血管出现之前,VEGF 上升。这与 VEGF 在高浓度氧引起的视网膜病变的情况类似,说明 VEGF 同样在酸中毒引起的视网膜新生血管中起重要的作用。酸中毒调节 VEGF 的详细机制有待于进一步的研究。

总之,本研究明确了在代谢性酸中毒引起的视网膜新生血管动物模型中,视网膜血管化的程度和新生血管随时间的发展而变化,为利用这个模型进行其他机理和治疗研究提供了基础。同时,我们发现随时间变化,VEGF 早期下降,随后升高,说明在此模型中,VEGF 同样起着非常重要的作用。

4 参考文献

- 1 Prederville A, Suchulenburg WE. Clinical factors associated with retinopathy of prematurity. Arch Dis Child. 1988;63:522-527.
- 2 Bigan AW, Brown DF, Reynolds JD, et al. Risk factors associated with retrolental fibroplasias. Ophthalmology. 1984;

- 91:1504-1511.
- 3 Holmes JM, Zhang S, Leske DA, et al. Metabolic acidosis-induced retinopathy in the neonatal rat. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999, 40:804-809.
- 4 Zhang S, Leske DA, Lanier WL, et al. Preretinal neovascularization in the neonatal rat associated with acetazolamide-induced systemic acidosis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001, 42: 1066-1071.
- 5 Holmes JM, Zhang S, Leske DA, et al. Carbon dioxide-induced retinopathy in the neonatal rat. Cur Eye Res. 1998, 17: 608-616.
- 6 Pierce EA, Avery RL, Foley ED, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92:905-909.
- 7 Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. Arch Ophthalmol. 1996, 114:1219-1228.
- 8 Alon T, Hemo I, Itin A, et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. Nat med, 1995, 1:1024-1028.
- 9 Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, et al. Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. Arch Ophthalmol, 1996, 114: 1210-1217.
- 10 Luty GA, McLeod DS. A new technique for visualization of human retinal vasculature. Arch Ophthalmol, 1992, 110: 267-276.
- 11 Zhang S, Leske DA, Holmes JM. Neovascularization grading methods in a rat model of retinopathy of prematurity. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 887-889.
- 12 Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Snellen visual acuity and structural outcome at 5 and 6 months years after randomization. Arch Ophthalmol, 1996, 114:417-424.

(收稿日期:2005-03-31)

(本文编辑:朱敏)

· 药品与器械信息 ·

眼科手术用全氟萘烷(重水)

产品性状:无色透明澄清液体

适应证:用于眼科玻璃体视网膜疾病

规格:每瓶 5 ml 储存:常温避光

灭菌有效期:3 年

产品注册号:国药管械(准字 2002 第 322093)

生产商:上海市华捷视医疗设备有限公司

国内经销商:上海和兴医疗器械有限公司

地址:上海淮安路 717 号(静安都市工业园区)

邮政编码:200041 电话:021-62778801

传真:021-62778802

眼底血管病变的口服药物——递法明

法国进口的递法明,主要成分为欧洲越桔花青苷(VMA)和β胡萝卜素,临床应用于增加静脉张力及起到保护血管的作用。国内的研究实验数据证明:此药能促进胶原合成,降低血管通透性并有利于保护视力。口服递法明每日 3 次,每次 1 片,服药时间为 6 个月,有效率为 88%。国外的临床实验数据证明服用递法明每日 4 片,连续服用 20 天,可以改善老年性黄斑变性患者的视力,有效率为 85.7%。递法明还能促进视紫红质合成,纠正因眼生理过程功能缺陷引起的视觉障碍。本品是纯天然药物,无任何毒副作用。进口药品注册证号:X19990409。

中国总经销:四川圣奥医药有限公司 地址:四川省成都市营门口路民光商厦 738 室 邮政编码:610036

联系电话:028-87648711 传真:028-87650251 Email:eyeke@exehe.com

眼科部联系电话:0755-25977791 传真:0755-25977060