

· 实验研究 ·

改良视网膜墨汁灌注法观察先天性静止性夜盲对视网膜新生血管的影响

宋玫侠 李上 牛超 张作明

450007 郑州,解放军第一五三中心医院眼科(宋玫侠、李上);450003 郑州,河南省立眼科医院
河南省眼科研究所(牛超);710032 西安,第四军医大学航空航天医学系(张作明)

通信作者:宋玫侠,Email:songmeixia888@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.10.006

【摘要】 **背景** 先天性静止性夜盲(CSNB)是一种常见的眼科遗传性疾病。CSNB 较少见到视网膜新生血管,其如何影响视网膜新生血管尚需深入探讨。**目的** 改进视网膜墨汁灌注方法,并用于观察 CSNB 对视网膜新生血管生成的影响。**方法** 选取清洁级 7 日龄 SD 大鼠和 CSNB 大鼠各 18 只,任意选取其中 12 只制作氧诱导视网膜病变(OIR)模型作为 OIR 模型组,其余 6 只作为正常对照组。OIR 模型组 SD 大鼠和 CSNB 大鼠各 9 只按照随机数字表法随机分为体积比 1:1 墨汁灌注组、体积比 2:1 墨汁灌注组和单纯墨汁灌注组,分别灌注体积比 1:1 墨汁灌注液、体积比 2:1 墨汁灌注液和单纯墨汁灌注液各 10 ml。取单侧眼球制作视网膜铺片,取另一侧眼球制作石蜡切片。观察并比较不同体积比墨汁灌注组视网膜血管成像质量。另取 SD 大鼠和 CSNB 大鼠 OIR 组各 3 只幼鼠与正常对照组幼鼠均按照此法灌注体积比 2:1 墨汁灌注液。取各组石蜡切片行组织病理学观察并计数每张切片中突破内界膜细胞核的数量。免疫组织化学法检测视网膜中血管性血友病因子(v-WF)的表达。**结果** 体积比 2:1 墨汁灌注组视网膜铺片中血管网成像质量较体积比 1:1 墨汁灌注组和单纯墨汁灌注组高。组织病理学检查显示,正常对照组大鼠视网膜各层组织结构未见明显异常,SD 大鼠和 CSNB 大鼠均未见突破内界膜的细胞核;OIR 模型组可见大量内皮细胞核突破内界膜,OIR 模型组中 SD 大鼠和 CSNB 大鼠突破内界膜的细胞核数量分别为(23.08±2.99)个/切片和(41.12±9.36)个/切片。CSNB 大鼠突破内界膜的细胞核数量略高于 SD 大鼠,但差异无统计学意义($q=1.70, P=0.50$)。免疫组织化学检查结果显示,SD 大鼠和 CSNB 大鼠突破内界膜的细胞 v-WF 均表达阳性。**结论** 体积比 2:1 墨汁明胶灌注液对大鼠视网膜血管成像质量优于单纯墨汁灌注液,是一种重复性好、操作简单的视网膜铺片方法。高氧可诱导 CSNB 大鼠视网膜新生血管生成。

【关键词】 视网膜新生血管;先天性静止性夜盲;墨汁灌注;视网膜铺片**基金项目:** 国家自然科学基金项目(30872838)

Effect of congenital stationary night blindness on oxygen induced retinal neovascularization by improved Chinese ink perfusion method Song Meixia, Li Shang, Niu Chao, Zhang Zuoming

Department of Ophthalmology, the 153rd Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450007, China (Song MX, Li S); Henan Eye Institute, Henan Eye Hospital, Zhengzhou 450003, China (Niu C); Department of Clinical Aerospace Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China (Zhang ZM)

Corresponding author: Song Meixia, Email: songmeixia888@163.com

[Abstract] **Background** Congenital stationary night blindness (CSNB) is a common genetic eye disease. Retinal angiogenesis is rarely obtained in retinal degeneration animal. The effects of CSNB on retinal angiogenesis require further study. **Objective** This study was to improve Chinese ink perfusion technology and to explore the effect of CSNB on oxygen induced neovascularization. **Methods** Eighteen clean 7-day old SD rats and 18 clean 7-day old CSNB rats were included, twelve SD rats and twelve CSNB rats were chosen randomly for oxygen induced retinopathy (OIR) modeling, and served as OIR group, six SD rats and six CSNB rats were chosen as normal control. Nine rats were chosen randomly from both SD rats and CSNB rats in OIR group, respectively. The rats were separated into 1:1 ratio ink group, 2:1 ratio ink group and conventional ink group, which were perfused with 1:1 ratio ink

perfusate, 2:1 ratio ink perfusate and conventional ink, respectively. The unilateral eyes of the rats were prepared for whole-mount retina, the other eyes were performed for paraffin imbedding. The quality of retinal vascular imaging were compared among different ink perfusate groups. The normal control rats, three SD rats in OIR group and three CSNB rats in OIR group were perfused with 2:1 ratio ink perfusate. Histopathology examination was performed on the paraffin section, and the number of nuclei breakthrough the inner limiting membrane were counted. Immunocytochemistry were performed on the paraffin section for detecting the expression of von Willebrand factor (v-WF). **Results** Compared with 1:1 ratio ink perfusion and conventional ink perfusion, 2:1 ratio ink perfusion showed the full vascular net clearly. Histopathology showed that the structure of retina was normal in the normal control group, and there were no endothelial nuclei breakthrough the inner limiting membrane. A large number of endothelial nuclei breakthrough the inner limiting membrane in the OIR group, the number of endothelial nuclei breaking through the inner limiting membrane were $(23.08 \pm 2.99)/\text{slide}$ and $(41.12 \pm 9.36)/\text{slide}$ for SD rats and CSNB rats, respectively. The number of endothelial nuclei breakthrough inner limiting membrane was higher in the CSNB rats than that in the SD rats, with no difference between the two group ($q = 1.70, P = 0.50$). Immunocytochemistry results showed that v-WF was positive expressed in the cells breakthrough inner limiting membrane. **Conclusions** Improved ink perfusion method was an easy-to-use whole-mount retina method with good repeatability. Hyperoxia can induce retinal neovascularization of CSNB rats.

[Key words] Retinal neovascularization; Congenital stationary night blindness; Chinese ink perfusion; Whole-mount retina

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30872838)

先天性静止性夜盲 (congenital stationary night blindness, CSNB) 是一种遗传性、非进展性的眼底疾病,其病理改变主要是视网膜的感光细胞变性,此特征也是 CSNB 患者视力损害的主要原因^[1]。目前,CSNB 的发病机制尚不清楚,临床上尚缺乏有效的治疗手段,因此探讨其发病机制及病理变化尤为重要。视网膜新生血管性疾病是一类常见的致盲眼病,缺血、缺氧是致病的重要原因。相对高氧诱导视网膜新生血管生成是常用的氧诱导视网膜病变 (oxygen induced retinopathy, OIR) 模型的造模方法。有研究显示,视网膜变性可能会抑制视网膜新生血管的形成^[2]。那么,我们推测高氧可能无法诱导 CSNB 大鼠视网膜新生血管生长。在中国,研究者常采用消化法铺片来观察实验动物视网膜血管,视网膜铺片后进行免疫荧光染色联合激光扫描共焦显微镜检查,能直接观察细胞的正常形态和功能^[3],但由于该技术操作复杂、展片难度较大、消化时间不易掌握等原因,常出现消化不良、消化过度、残存视网膜细胞或血管结构显示清晰度欠佳等现象,影响对视网膜微血管的观察^[4]。目前,通过墨汁灌注法观察组织血运已广泛应用于动物脑血管、内脏及眼底的微循环观察^[5-6]。由于传统的单纯墨汁灌注制作视网膜血管铺片不能很好地显示较大的血管,进行观察时背景常有污染,本实验对传统的墨汁灌注方法进行改良,以期建立一种制作简单、便于观察、重复性好的视网膜铺片技术,同时将其应用于 CSNB 大鼠视网膜新生血管的观察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 7 日龄 SD 大鼠和 CSNB 大鼠各 18 只 (第四军医大学航空航天医学系屏障动物实验室提供),雌雄不限。本研究经第四军医大学实验动物伦理委员会批准 [批准号:SCXY (军) 2006-0007],实验动物的喂养和使用均遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂 墨汁 (北京一得阁墨业有限公司);抗鼠单克隆血管性血友病因子 (von Willebrand factor, v-WF) 抗体 (抗体编号:RAB-0070) (福州迈新生物技术开发有限公司);辣根过氧化物酶标记抗鼠二抗 (抗体编号:JHB0620) (上海杰浩生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 不同体积比墨汁灌注液的配制 将 2 g 明胶加入 100 ml 水中,60 °C 水浴加热,玻璃棒搅匀至完全溶解。分别按体积比 1:1 和 2:1 将墨汁加入溶解的明胶液体中,所有灌注液温度均保持在 37 °C,恒温箱密闭放置,备用。

1.2.2 实验动物分组及处理 任意选取 SD 大鼠和 CSNB 大鼠各 12 只,制作 OIR 模型。将 7 日龄幼鼠与母鼠共同暴露于含氧体积分数 (80 ± 2)% 环境中持续饲养至出生后第 12 天,回到正常氧环境条件饲养至出生后第 17 天,作为 OIR 模型组。另选取 SD 大鼠和 CSNB 大鼠各 6 只,置于正常空气环境中饲养至出生

后第 17 天,作为正常对照组。

1.2.3 不同体积比明胶墨汁灌注及标本制备 参照文献[7]中的墨汁灌注显色方法,并在其基础上进行改进。取 18 日龄 OIR 模型组大鼠采用乙醚深度麻醉处死,迅速暴露胸腔,将灌注针头插入升主动脉,结扎腹主动脉,灌注 37 °C 的 4 g/L 多聚甲醛 10 ml,见流出的液体透明无混浊,其中 SD 大鼠和 CSNB 大鼠各任意选取 9 只幼鼠按照随机数字表法随机分为体积比 1:1 墨汁灌注组、体积比 2:1 墨汁灌注组和单纯墨汁灌注组,分别灌注体积比 1:1 墨汁灌注液、体积比 2:1 墨汁灌注液和单纯墨汁灌注液各 10 ml。灌注在 3 min 内均速完成。待所有灌注液推注完后迅速摘出双侧眼球,于 4 g/L 多聚甲醛中 4 °C 固定 24 h;解剖显微镜下去除一侧眼球眼前节,保留完整的视网膜,以视盘为中心呈放射状切成 4 片,平铺于经多聚赖氨酸处理的载玻片上,体积分数 50% 甘油封片后备用;取另一侧眼球去除眼前节及玻璃体、脉络膜等组织制作成眼杯,进行常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋,矢状位 4 μm 厚连续切片,常规苏木精-伊红染色,每 2 张切片间隔 30 μm,每只眼取 20 张切片,计数血管内皮细胞核,参照文献[8]的方法统计每张切片突破视网膜内界膜的内皮细胞核数,组织切片选取时应避开视盘周围。SD 大鼠和 CSNB 大鼠 OIR 组各任意选取 3 只幼鼠与正常对照组大鼠均按照此法灌注体积比 2:1 墨汁灌注液。取单侧眼球制作视网膜铺片,取另一侧眼球制作石蜡切片。

1.2.4 免疫组织化学染色观察 各组大鼠视网膜中 v-WF 的表达分布 实验组抽取 6 张未经染色的石蜡切片,胃蛋白酶消化抗原修复,滴加抗鼠 v-WF (1:100),37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;滴加即用型抗鼠二抗室温孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;常规苏木素染核,封片。PBS 替代一抗作为阴性对照。细胞质染成棕黄色为 v-WF 表达阳性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量数据经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。OIR 模型组 SD 大鼠和 CSNB 大鼠突破内界膜

的内皮细胞数量比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同体积比墨汁灌注组大鼠视网膜血管成像比较

OIR 模型 SD 大鼠和 CSNB 大鼠体积比 1:1 墨汁灌注组视网膜铺片中周边小血管网显示不清晰,与背景组织的对比不明显(图 1A, B);体积比 2:1 墨汁灌注组视网膜铺片中整个视野无墨汁渗漏黑染,血管网与周边组织对比明显,易于观察(图 1C, D);单纯墨汁灌注组视网膜铺片中可见墨汁渗漏、黑染,大血管充填不充分,中央与周边血管显示不均匀(图 1E, F)。体积比 2:1 墨汁灌注液具有较好的血管成像作用。正常对照 SD 大鼠和 CSNB 大鼠经体积比 2:1 墨汁灌注后视网膜血管网结构显示清晰,形态正常,血管显示均匀(图 1G, H)。

2.2 各组大鼠视网膜组织病理学观察

组织病理学检查显示,正常对照组中 SD 大鼠和 CSNB 大鼠视网膜各层组织结构均未见明显异常,无新生血管形成,未见突破内界膜的细胞核;OIR 模型组 SD 大鼠和 CSNB 大鼠视网膜组织表面凹凸不平,可见大量内皮细胞核突破内界膜,许多新生血管芽形成,位于视网膜前及浅层,玻璃体有出血或新生血管长入,但视网膜各层的基本结构尚完整(图 2)。OIR 模型组 SD 大鼠和 CSNB 大鼠突破视网膜内界膜的细胞核数

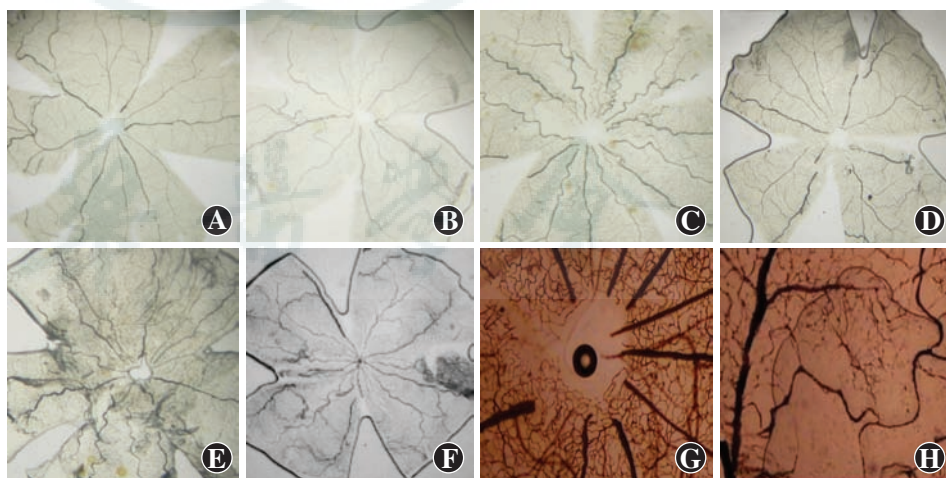


图 1 光学显微镜下观察不同体积比墨汁灌注后大鼠视网膜血管成像 OIR 模型体积比 1:1 墨汁灌注组 SD 大鼠和 CSNB 大鼠周边小血管网均显示不清晰,与背景组织的对比不明显;体积比 2:1 墨汁灌注组视野无墨汁渗漏、黑染,血管网与周边组织对比明显;单纯墨汁灌注组可见墨汁渗漏、黑染,大血管充填不充分,中央与周边血管显示不均匀。正常对照组 SD 大鼠和 CSNB 大鼠经体积比 2:1 墨汁灌注后视网膜血管网结构清晰,形态正常,血管显示均匀 A:OIR 模型体积比 1:1 墨汁灌注组 SD 大鼠($\times 40$) B:OIR 模型体积比 1:1 墨汁灌注组 CSNB 大鼠($\times 40$) C:OIR 模型体积比 2:1 墨汁灌注组 SD 大鼠($\times 40$) D:OIR 模型体积比 2:1 墨汁灌注组 CSNB 大鼠($\times 40$) E:OIR 模型单纯墨汁灌注组 SD 大鼠($\times 40$) F:OIR 模型单纯墨汁灌注组 CSNB 大鼠($\times 40$) G:正常对照 SD 大鼠经体积比 2:1 墨汁灌注后($\times 400$) H:正常对照 CSNB 大鼠经体积比 2:1 墨汁灌注后($\times 400$)

分别为 (23.08 ± 2.99) 个/切片和 (41.12 ± 9.36) 个/切片, 差异无统计学意义 ($q = 1.70, P = 0.50$)。

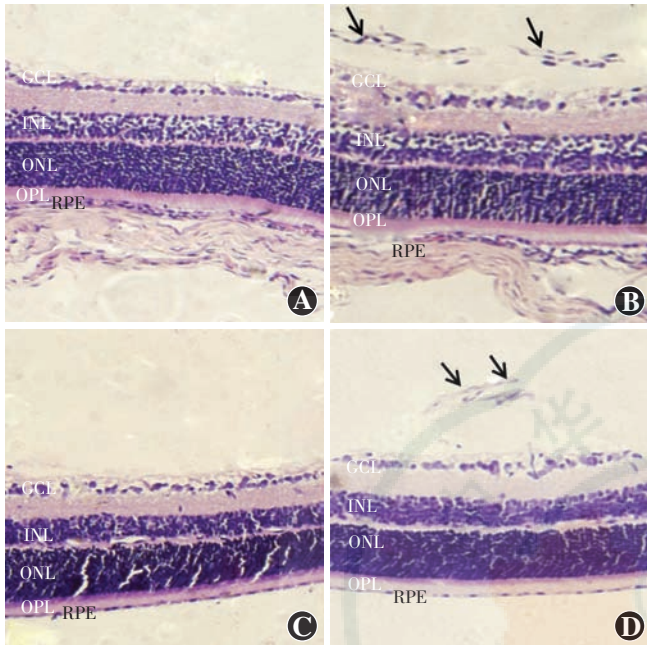


图 2 各组大鼠视网膜组织切片组织病理学观察 (HE $\times 400$) A: 正常对照组 SD 大鼠视网膜各层组织结构正常, 无新生血管形成 B: OIR 模型组 SD 大鼠可见大量内皮细胞核突破内界膜 (箭头), 许多新生血管芽形成 C: 正常对照组 CSNB 大鼠视网膜各层组织无新生血管形成 D: OIR 模型组 CSNB 大鼠可见大量内皮细胞核突破内界膜 (箭头) GCL: 神经节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层; OPL: 外丛状层; RPE: 视网膜色素上皮

2.3 OIR 模型组不同品系大鼠视网膜中 v-WF 的表达分布

免疫组织化学检查结果显示, SD 大鼠和 CSNB 大鼠突破内界膜的细胞均 v-WF 表达阳性 (图 3)。

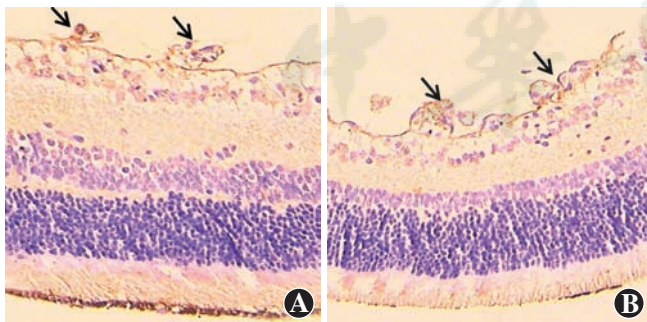


图 3 不同品系 OIR 模型大鼠视网膜中 v-WF 表达 ($\times 400$) A: SD 大鼠视网膜免疫组织化学染色 B: CSNB 大鼠视网膜免疫组织化学染色 SD 大鼠和 CSNB 大鼠突破内界膜的细胞均为 v-WF 表达阳性 (箭头)

3 讨论

明胶作为一种动物蛋白, 其在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上极易溶解, 而在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下则凝固成胶冻状, 染料与明胶混合

后可一起凝固在血管中, 是理想的组织学血管填充剂。本研究中选择适宜温度, 在一定体积比的明胶水溶液中加入墨汁制成灌注液进行心脏灌注, 相比于单纯墨汁灌注液, 其制备铺片取得了较好的血管成像效果。本研究根据实验动物的体温及明胶的理化特性, 灌注液温度选择 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ [9]。在灌注时保持该温度, 对血管壁不会造成损害, 明胶也能顺利注入视网膜血管中。取出眼球后立即冷冻, 明胶凝固, 墨汁即被固定在血管中, 且对组织学染色无影响。本研究中先清除了视网膜血管内全部血液, 再灌注明胶墨汁, 视网膜的大小血管网均充填充分, 制作成铺片后未见墨汁渗漏, 光学显微镜下血管与周边组织对比明显, 在后续实验进行染色漂洗时不褪色, 血管成像效果好。本研究中比较了不同体积比墨汁灌注液的血管成像效果, 发现体积比为 2:1 的墨汁灌注液做心脏灌注时, 视网膜铺片各级血管显示充分, 且新生毛细血管的结构非常清晰。通过对铺片技术的改进, 有效地克服了以往单纯墨汁灌注方法显示视网膜血管不足的缺点。

CSNB 患者自幼发病, 部分患者表现为夜盲, 因其矫正视力正常或低, 易误诊为高度近视或弱视 [10]。CSNB 患者的临床特征缺乏特异性, 诊治方面难度较大, 确诊时多数病例为晚期, 直接对 CSNB 患者进行研究受限, 而基因诱导产生的 CSNB 动物模型与临床差异较大; 自发突变 CSNB 动物模型更接近临床, 更适合对 CSNB 病理机制的研究。本研究中所用 CSNB 大鼠是自然界存在的、自发的、遗传性视网膜动物模型, 是一种新型实验研究模型 [11]。美国 Jackson 实验室筛选出不同背景的遗传性动物模型有近百种 [12], 而中国少有报道自主产权动物。遗传方式的不同, CSNB 在临床表现上也有差异, 但都是以视杆系统损伤为特点。近年来, 对 CSNB 的分子遗传学研究较多, 而对其视网膜新生血管方面的报道罕见。视网膜新生血管见于多种眼底疾病, 在缺血、缺氧的病理条件下导致新生血管形成 [13]。在临床上, 新生血管可造成视力严重损害, 甚至致盲。既往研究认为, 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 和光感受器细胞损伤直接影响实验动物视网膜新生血管的形成 [2], 由此可以推断, CSNB 大鼠难以诱导出新生血管。在本实验中, OIR 模型组 CSNB 大鼠诱导出典型的视网膜新生血管, 虽然每张切片计数突破视网膜内界膜的细胞核数的平均值略高于 SD 大鼠模型组, 但差异无统计学意义。视网膜组织切片见突破内界膜的内皮细胞核, 免疫组织化学内皮细胞染色阳性, 进一步证实了诱导新生血管成功。RP 患者的临床检查及模式动物实验已经证实, RP 的

体内血液组分及眼底血流有异常变化,眼底变化主要为视网膜、脉络膜血流明显减少^[2]。

大量研究证实,视网膜缺氧时释放的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在视网膜新生血管形成过程中具有重要作用,VEGF 的表达受多种因素的调节,其中组织的缺血、缺氧最为重要^[14]。正常眼球 VEGF 是由视网膜色素上皮层产生的,RP 视网膜、脉络膜的血管萎缩,色素上皮层变性可能导致 VEGF 的低表达。视杆细胞的高氧消耗使视网膜缺氧,视杆细胞的变性凋亡使视网膜出现高氧状态,会抑制视网膜新生血管的形成。CSNB 与 RP 均属于遗传性视网膜退行性疾病,临床特点相似,均有夜盲、视野异常,眼底表现也难以区分,甚至有共同的致病基因,但是成年 CSNB 大鼠视网膜组织结构无明显改变,即没有明显的视杆细胞数量减少,但视杆细胞的功能发生了退化^[15]。尽管如此,依据本实验的结果,光感受器细胞变性和视网膜新生血管化的关系仍有争议。本实验应用的 CSNB 大鼠亦是一种视网膜退行性变模式大鼠,与文献报道的 SD 大鼠的血清生物化学指标存在差异^[16],这些差异提示我们血液参数的异常是否与发病有关,仍有待进一步研究。

本研究以 CSNB 大鼠动物模型来研究新生血管生成情况,为探索两类疾病的发病机制及诊断和治疗等后续研究提供了研究基础。

参考文献

- [1] 王凤羽,王艳丽,杨洋,等. 一个先天性静止性夜盲症家系致病基因的突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2012,29(2):145-148. DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2012.02.006.
Wang FY, Wang YL, Yang Y, et al. Mutation analysis of pathogenic genes in a Henan family affected with congenital stationary night blindness[J]. Chin J Med Genet, 2012, 29(2): 145-148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2012.02.006.
- [2] Lahdenranta J, Pasqualini R, Schlingemann RO, et al. An anti-angiogenic state in mice and humans with retinal photoreceptor cell degeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(18): 10368-10373. DOI:10.1073/pnas.181329198.
- [3] 崔彦,许迅,顾青. 改良的视网膜血管消化铺片联合共聚焦显微镜观察——视网膜血管的三维检查方法[J]. 眼科,2006,15(2):138-141.
Cui Y, Xu X, Gu Q. Modified retinal vascular digest preparations combined with laser scanning confocal microscope—a three-dimensional examination method for retinal vessels[J]. Ophthalmol Chin, 2006, 15(2): 138-141.
- [4] Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE[J]. Ophthalmology, 2012, 119(4): 789-801. DOI:10.1016/j.ophtha.2011.12.039.
- [5] Watanabe T, Arai H. Leakage test during mitral valve repair[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 62(11): 645-650. DOI: 10.1007/s11748-014-0465-z.
- [6] Rampazzo A, Kutz JE, Kaufman C, et al. A cadaver study of the feasibility of multidigit allotransplantation for reconstruction of the metacarpal hand[J]. Plast Reconstr Surg, 2015, 136(3): 531-540. DOI:10.1097/PRS.0000000000001559.
- [7] Huang S, Liang J, Yam GH, et al. Comparison of dextran perfusion and GSI-B4 isolectin staining in a mouse model of oxygen-induced retinopathy[J]. Eye Sci, 2015, 30(2): 70-74. DOI:10.3969/j.issn.1000-4432.2015.02.006.
- [8] 史少阳,张媛,李迅,等. Dll4、Notch1 在大鼠氧诱导性视网膜病变模型中的表达[J]. 眼科新进展,2013,33(10):938-941.
Shi SY, Zhang Y, Li X, et al. Expression of Dll4 and Notch1 on oxygen-induced retinopathy in rats[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2013, 33(10): 938-941.
- [9] 时书勤,崔占军,鄢明超,等. Reelin 调节小鼠喙端迁移流发育的形态学观察[J]. 解剖学报,2015,46(4):433-442. DOI:10.16098/j.issn.0529-1356.2015.04.001.
Shi SQ, Cui ZJ, Yan MC, et al. Morphological study of Reelin regulation on the development of rostral migratory stream in the mouse[J]. Acta Anatomica Sinica, 2015, 46(4): 433-442. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2015.04.001.
- [10] 李蕙,刘丽英,徐海燕,等. 先天性静止性夜盲患者的临床特征[J]. 中华医学杂志,2012,92(39):2756-2759. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2012.39.006.
Li H, Liu LY, Xu HY, et al. Clinical features of congenital stationary night blindness[J]. Natl Med J China, 2012, 92(39): 2756-2759. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2012.39.006.
- [11] Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Genes and mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa [J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 5(10): a017129 [2016-06-20]. <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/10/a017129>. long. DOI: 10.1101/cshperspect.a017129.
- [12] Chang B, Hurd R, Wang J, et al. Survey of common eye diseases in laboratory mouse strains[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(7): 4974-4981. DOI:10.1167/iovs.13-12289.
- [13] 底煜,张铁欧,杨颢,等. CCN1 在氧诱导小鼠视网膜新生血管形成中的表达及意义[J]. 国际眼科杂志,2014,14(12):2131-2134. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.06.
Di Y, Zhang YO, Yang Y, et al. Expression and significance of CCN1 in oxygen-induced retinal neovascularization of mice[J]. Int Eye Sci, 2014, 14(12): 2131-2134. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.06.
- [14] Arden GB, Sivaprasad S. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy[J]. Curr Diabetes Rev, 2011, 7(5): 291-304.
- [15] Zhang Z, Gu Y, Li L, et al. A potential spontaneous rat model of X-linked congenital stationary night blindness[J]. Doc Ophthalmol, 2003, 107(1): 53-57.
- [16] An J, Zhang L, Jiao B, et al. *Cacnalf* gene decreased contractility of skeletal muscle in rat model with congenital stationary night blindness[J]. Gene, 2015, 562(2): 210-219. DOI:10.1016/j.gene.2015.02.073.

(收稿日期:2017-05-12)

(本文编辑:刘艳 张宇)