

氧诱导视网膜病变动物模型

杨宁 综述 邢怡桥 审校

430060 武汉大学人民医院眼科中心

通信作者:邢怡桥, Email: xing_yiqiao@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.01.013

【摘要】 氧诱导视网膜病变(OIR)模型已在猫、小鼠、大鼠、家兔、犬和斑马鱼等动物上建立,对视网膜新生血管发生机制和治疗的研究起到了重要作用。OIR 动物模型具有模拟人类早产儿视网膜病变(ROP)、增生性糖尿病视网膜病变(PDR)部分病理生理过程的效应,可为人类视网膜新生血管性疾病的防治提供重要依据。随着转基因技术的广泛应用,OIR 动物模型具备了更大的应用价值。尽管如此,这些 OIR 动物模型都不够完美,无法完整体现人类 ROP 的病理生理过程,因此仍需要更加广泛和深入的探索。

【关键词】 氧诱导视网膜病变; 动物模型; 早产儿视网膜病变; 视网膜新生血管

Animal models of oxygen-induced retinopathy Yang Ning, Xing Yiqiao

Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Xing Yiqiao, Email: xing_yiqiao@aliyun.com

【Abstract】 Models of oxygen-induced retinopathy (OIR) have been built on several animals, including kitten, mouse, rat, rabbit, puppy and zebrafish. These models play an important role in studying the mechanisms and treatments of retinal neovascularization, which is partially mimicking the pathological process of retinopathy of prematurity (ROP) and proliferative diabetic retinopathy (PDR). As the extensive application of transgenic technology, animal models of OIR will provide more evidences on investigating the retinal angiogenic diseases. However, none of these OIR models is perfect to simulate human ROP completely, which still needs more comprehensive and profound exploration.

【Key words】 Oxygen-induced retinopathy; Disease model, animal; Retinopathy of prematurity; Retinal neovascularization

视网膜新生血管通常表现为视网膜血管突破内界膜长入玻璃体腔^[1]。病理性视网膜新生血管的主要原因是视网膜缺血缺氧,这一类缺血性视网膜疾病包括早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)、增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)和视网膜中央静脉阻塞(central retinal vein occlusion, CRVO)等^[2-4]。高氧之所以会导致视网膜病变,主要是因为早产儿视网膜血管尚未发育完全,高氧暴露抑制了视网膜正常血管的生长,使得视网膜出现了氧供应不足的无灌注区,诱发新生血管因子的释放,形成病理性新生血管,这一系列的异常均严重影响了视网膜的发育和功能,最终导致视网膜病变^[5]。高氧对血管生长的抑制作用已被广泛用于建立缺血性视网膜病变动物模型,目前氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)动物模型成为研究病理性新生血管的常用实验模型^[6]。OIR 动物模型可以模拟 ROP 以及 PDR 等临床病变,为缺血性视网膜病变的研究及眼部新生血管的治疗提供了重大帮助^[6-7]。1954 年 Ashton 等^[8]成功利用猫成功建立了 OIR 模型,此后又有许多研究在小鼠、大鼠、

家兔、猫、犬和斑马鱼等动物上建立 OIR 模型^[8-12]。本文主要就这些 OIR 动物模型进行综述。

1 小鼠

目前应用最为广泛的 OIR 动物模型是 Smith 等^[9]在 1994 年建立的小鼠 OIR 模型,许多关于眼部新生血管的分子生物学和遗传学的信息均来源于该模型^[13-14]。出生后小鼠的视网膜血管才开始发育,伴随着玻璃体血管的退化,12 日龄(Postnatal day 12, P12)时视网膜浅层血管逐步发育完全^[6,15]。经典 OIR 小鼠模型将 P7C57BL/6J 小鼠置于体积分数 75% O₂ 的高氧环境中饲养 5 d,至 P12 后放回正常氧环境, P17 时发现小鼠视网膜出现明显的新生血管, P25 时新生血管基本退化(图 1)。

自 1994 年 Smith^[9]建立经典 OIR 小鼠模型后, OIR 模型不断地改进和完善, 2009 年 Connor 等^[15]给出了较为完善的 OIR 模型标准化方案,对 OIR 模型进行了质量控制。其要点如下: (1) 小鼠最好来自于 3 窝以上,以避免生物多样性造成的偏倚; 理想化的方案是对照组和实验组的小鼠同时处于造模状态。

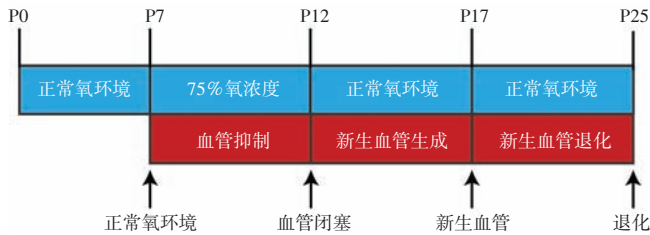


图 1 小鼠 OIR 流程图 P7 小鼠置于 75% O₂ 的密闭氧箱中饲养,高氧暴露抑制了小鼠正常视网膜血管的发育,导致中央区血管闭塞,P12 时置于正常氧环境中继续饲养,此时小鼠视网膜处于缺血缺氧状态,诱发新生血管形成,P17 时新生血管形成达到高峰,然后开始退化,P25 时新生血管基本退化完全

(2) 由于高氧毒性对哺乳的母鼠造成影响,因此可采取母鼠交替喂养的方式,避免母鼠死亡、停止哺乳和食仔等情况的发生。
(3) 一笼小鼠在 10 只以上时,可能出现小鼠生长受限和新生血管表型异常的情况,因此,P17 时,应该选择体质量在 6 g 以上的小鼠进行实验。

该模型的主要优势在于小鼠的遗传学背景明晰,通过转基因技术可以直接研究不同基因与病理性新生血管的关系,其他的优势还包括表型的重复性高,模型稳定性和一致性高,成本相对较低,而且新生血管的面积可以进行定量分析等^[5,13,15]。小鼠视网膜新生血管的定量分析目前主要采用病理切片苏木精-伊红染色,计数突破内界膜的新生血管内皮细胞核(图 2),以及全视网膜铺片免疫荧光染色,定量分析新生血管团簇的面积(图 3)。该小鼠 OIR 模型的缺点在于高氧主要抑制了视网膜中央血管的发育,而不是周围血管,该特点与 ROP 的新生血管形成存在差异^[16];而且 OIR 小鼠模型也未能发现后期视网膜脱离。尽管如此,该模型已能较好地模拟缺血性新生血管形成^[13]。因此小鼠 OIR 模型在抗新生血管药物治疗的研究中发挥重要作用^[13,17]。



图 2 OIR 小鼠视网膜病理切片 (HE ×200, 标尺 = 50 μm) P17 时小鼠视网膜出现突破内界膜的新生血管内皮细胞核(黑色箭头),采用定量方法可对新生血管的程度进行分析

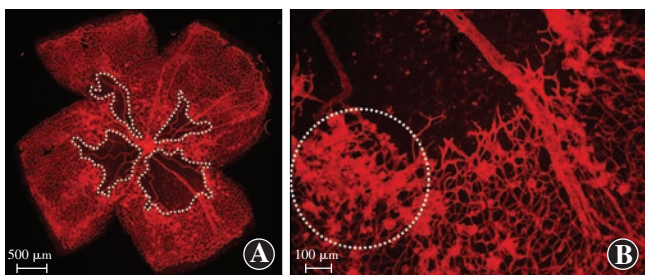


图 3 小鼠全视网膜铺片荧光染色 (Isolectin B4) P17 小鼠视网膜中央区可见大面积无灌注区形成,无灌注区和血管区之间形成大量新生血管簇,呈强荧光染色 A: ×40, 标尺 = 500 μm B: ×100, 标尺 = 100 μm

2 大鼠

与小鼠 OIR 模型持续暴露于高氧环境不同,大鼠 OIR 模型采用的是高氧-低氧循环交替暴露的方式^[18-19]。大鼠 OIR 模型的优势在于新生血管表型与人类 ROP 相似,主要是其周边血管生长受到高氧抑制,脱离高氧环境后,视网膜新生血管的形成主要出现在视网膜中周部的血管区和无血管区的交界处^[20]。尽管小鼠 OIR 模型视网膜新生血管也出现在血管区和无血管区交界处,但是主要是中央区的视网膜血管发生闭塞^[15]。

早期报道的 OIR 大鼠模型由于稳定性和一致性欠缺而未被应用^[21-22]。而 Penn 等^[23] 在新生大鼠上成功建立了较为稳定的 OIR 模型,该模型采用持续性的高氧暴露,可获得实质性的血管抑制效果,但是新生血管形成作用并不稳定。出生后大鼠采用每 24 小时体积分数 80% 与 40% 氧循环交替暴露的方案,14 日龄时回到正常氧环境,虽然导致的视网膜血管闭塞减少,但约 62% 的大鼠视网膜产生了新生血管^[24-26]。这些报道也说明除了无灌注区形成外,还有其他因素诱发了新生血管的形成,并对氧体积分数越高则新生血管越多的观点提出了质疑。随后 Penn 等^[24] 又采用了 50% 与 10% 氧交替暴露的方案,有趣的是,该方案对血管生长阻碍的抑制作用更加明显,新生血管发生率更高,且新生血管程度更重。

尽管不同的给氧方案造成的新生血管存在差异,但是其结果均与人类 ROP 的新生血管形成较为相似。合适的氧暴露方案可以造成视网膜浅表血管和深层血管的发育延缓,从而出现周边无血管区,回到正常氧环境后,无灌注区和血管区之间可形成新生血管簇,报道显示一些实验方案中可能出现小部分视网膜发生视网膜脱离的情况^[18,25-26]。大鼠 OIR 模型亦被用于眼部新生血管的分子生物学基础研究和抗新生血管药物的临床前期研究^[27]。

3 家兔

Ashton^[28] 将家兔放在 80% ~ 90% 的氧环境下饲养 96 h,发现家兔视网膜血管经历完全闭塞、部分闭塞、回退的过程^[29]。该模型的特点是高氧暴露导致了家兔视网膜神经元的损伤^[29]。尽管血管退化后新生血管的正常化并不完全,家兔 OIR 模型也未能发现视网膜脱离现象^[8]。由于 OIR 家兔模型很难成功诱发新生血管形成,目前该模型的应用很少,而其主要的研究价值在于模拟高氧导致视网膜血管关闭之后出现视网膜水肿的情况^[29-30]。

4 猫

新生猫的视网膜发育水平相当于 28 周的胎儿,猫的视网膜血管于出生后 3 周左右才发育完全,类似于人类早产儿出生后视网膜未发育成熟的状态,因此可用来模拟 ROP 的疾病过程^[11,31]。

Ashton 等^[8] 在 1954 年报道了新生猫 OIR 模型,这也是最早的 OIR 动物模型之一,之后也被不少研究应用。该模型将新

生猫暴露于 70% ~ 80% 的氧环境中 96 h, 然后回到正常氧环境中, 猫视网膜血管的变化主要分为 3 个阶段, 首先是高氧导致血管的关闭和闭塞, 然后是低氧诱发的新生血管形成, 最后是在细胞和分子作用机制下血管的正常化和缺氧的解除^[32]。尽管 OIR 猫模型也无法诱发出视网膜脱离现象, 但是后期猫视网膜血管的完整性和结构并不能完全恢复正常, 新生血管的退化需要持续几个月的时间。而高氧暴露后将猫放置于低氧环境 (<21% O₂) 中, 所导致的视网膜病变更加严重, 进一步说明低氧在缺血性视网膜病变中的作用^[33]。

将新生猫暴露于高氧环境中, 导致较大血管的生长抑制和毛细血管的闭塞萎缩。回到正常氧环境后, 视网膜处于缺血缺氧状态, 导致内层视网膜缺氧细胞释放血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等促新生血管因子, 从而导致异常的视网膜内新生血管和玻璃体腔新生血管的形成^[34]。该模型的缺点在于猫不宜大批量饲养, 繁殖周期长, 难度大, 成本较高, 且该模型无视网膜动静脉旁路形成, 与人类 ROP 急性期的病变有一定差异^[33], 故其动物实验的应用受到限制, 目前较少用于科研领域。

5 犬

幼犬的视网膜血管发育与人类的视网膜血管发育有诸多类似之处。与猫不同, 犬的视网膜在出生时发育成熟度更高, 并且出生后的发育更快^[35]。McLeod 等^[11]建立犬 OIR 模型, 发现极高氧体积分数暴露 1 h 后即出现视网膜毛细血管抑制, 24 h 达到高峰, 动静脉于 3 d 后发生关闭, 犬视网膜对高氧的反应性与猫较类似。另一项研究将新生犬暴露于 95% ~ 100% 的氧环境下 4 d, 然后放回正常氧环境, 犬视网膜出现视网膜褶皱折叠和玻璃体内新生血管膜形成, 并认为犬 OIR 模型是研究人类视网膜病变的最佳模型之一, 因其诱发视网膜瘢痕和视网膜脱离的概率较高^[36]。不过, 犬也有自发性视网膜脱离和遗传性视网膜褶皱的情况出现, 而且, ROP 患儿发生视网膜脱离的比例也较低^[37]。

McLeod 等^[38]利用犬 OIR 模型, 发现血管内皮生长因子受体 2 (VEGF receptor 2, VEGFR2) 与正常初始发育的视网膜血管关联性较弱, 而在高氧诱发的视网膜新生血管中呈现强表达。抗 VEGFR2 抗体治疗对于正常血管的生长不存在影响, 而对新生血管的抑制效果明显^[38]。该研究也为抗新生血管药物, 如阿柏西普 (Aflibercept) 的临床应用提供了依据^[39]。

6 斑马鱼

过去数十年, 斑马鱼常被作为脊椎动物模型研究人类疾病, 其优势在于实验操作简便, 给药方便, 以及顺从性好等, 其次, 斑马鱼在基因筛查和转基因技术应用方面也很成熟^[40-42]。

Cao 等^[43]在 2008 年报道了一个很有趣的视网膜新生血管模型, 该模型采用了成年斑马鱼, 并且通过低氧诱导的方式实现。造

模的具体方法是将氮气直接灌入密闭的水缸中。成年的斑马鱼首先放在正常氧分压的水中, 72 h 后逐步将氧饱和度降至 10%, 3 ~ 15 d 维持该低氧条件, 在第 12 天时发现视网膜新生血管达到最高水平^[13]。该模型的特点是直接采用低氧条件诱发斑马鱼视网膜新生血管形成, 并且通过口服抗新生血管药物证实 VEGF 在低氧诱发的新生血管中的作用^[12]。最近 Wu 等^[44]也报道了利用斑马鱼胚胎制作低氧诱发的视网膜新生血管模型, 该模型也被认为可以较好地模拟 ROP。

斑马鱼模型的优势和特点在于^[12, 43-44]: (1) 与人类视网膜病变有着高度相关性, 斑马鱼与人类视网膜血管有共通之处。(2) 简单快速的实验操作。(3) 设备成本低。(4) 可采用口服给药的方式进行抗新生血管药物的研究。(5) 更容易获得伦理学上的批准。(6) 可以研究病理性血管的形成及其分子生物学机制, 尤其可以模拟成年动物的视网膜病变。

7 展望

OIR 模型不但能较好地模拟人类 ROP, 也有越来越多的研究利用 OIR 模型模拟 PDR 的特殊病理变化, 因为 PDR 的病理过程与 OIR 具有共通之处。简言之, PDR 发生过程中, 视网膜微血管损伤导致视网膜缺氧, 血管异常患者阶段出现不成熟的血管长入玻璃体腔, 引起出血和纤维血管膜形成并可能牵拉视网膜^[6]。

虽然 OIR 动物模型已经研究了很多年, 并在小鼠、大鼠、家兔、猫、犬、斑马鱼等动物上建立 (表 1)。然而, 这些模型都不完美, 猫和小鼠的血管抑制区域和新生血管形式与人类并不一致, 且不发生视网膜脱离, 但小鼠稳定的遗传背景使其在转基因技术的研究中发挥重要作用。大鼠的新生血管形成与人类 ROP 最为接近, 但其表型与小鼠相比较难控制, 且遗传学背景没有小鼠明晰。家兔 OIR 模型诱发新生血管的成功率较低, 目前已较少应用。犬的视网膜血管发育虽然与人类有类似之处, 但其成本高, 难以大批量建模, 应用转基因技术也限制了犬 OIR 模型的应用。斑马鱼低氧诱导模型是近些年的新发现, 但其并非哺乳类动物模型。而且, 多数 OIR 动物模型采用的高氧体积分数与临床应用并不完全符合。此外, OIR 动物模型还需要更多安全性和有效性的研究, 并在更大型的动物身上建立重复性较高的模型。未来抗新生血管治疗的方向应该是选择性地抑制病理性新生血管形成, 而不影响正常血管的生长, 这对视网膜新生血管性疾病的治疗, 尤其是 ROP 的治疗非常关键。因此, OIR 动物模型的建立和视网膜新生血管的发生机制和治疗还需要更加广泛和深入的研究。

表 1 OIR 动物模型

动物	哺乳动物	成年	常用氧体积分数	模型成功率	定量方法	发生机制	视网膜脱离
小鼠	是	否	75%	接近 100%	切片/铺片	缺血	否
大鼠	是	否	50%/10% 交替	接近 100%	切片/铺片	缺血-再灌注	是
家兔	是	否	80% ~ 90%	未知	切片/铺片	缺血	否
猫	是	否	70% ~ 80%	接近 100%	切片/铺片	缺血	否
犬	是	否	95% ~ 100%	接近 100%	切片/铺片	缺血	是
斑马鱼	否	是	10% 氧饱和度	接近 100%	切片/铺片	缺血	否

参考文献

- [1] Yamaguchi M, Nakao S, Arita R, et al. Vascular normalization by ROCK inhibitor; therapeutic potential of ripasudil (K-115) eye drop in retinal angiogenesis and hypoxia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(4): 2264–2276. DOI: 10.1167/iov.15-17411.
- [2] Kabesha TB, Kabesha D, Maloba V, et al. Results of trabeculectomy with anti-VEGF therapy in the treatment of neovascular glaucoma secondary to retinal vein occlusion (report of 21 cases followed at Bukavu Eye Clinic from January 1 to December 31st, 2015) [J]. *J Fr Ophthalmol*, 2017, 40(1): 17–21. DOI: 10.1016/j.jfo.2016.08.009.
- [3] Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, et al. Characteristics of retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy imaged by optical coherence tomography angiography [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(14): 6247–6255. DOI: 10.1167/iov.16-20210.
- [4] Gao S, Li C, Zhu Y, et al. PEDF mediates pathological neovascularization by regulating macrophage recruitment and polarization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42846 [2017-02-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5314378/>. DOI: 10.1038/srep42846.
- [5] Cheng G, Tian K, Zhang L, et al. S100A4 gene silencing in oxygen-induced ischemic retinopathy inhibits retinal neovascularization via down-regulation of CREB expression [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254(1): 97–108. DOI: 10.1007/s00417-015-3158-0.
- [6] Kim CB, D'Amore PA, Connor KM. Revisiting the mouse model of oxygen-induced retinopathy [J]. *Eye Brain*, 2016, 8: 67–79. DOI: 10.2147/EB.S94447.
- [7] Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(6): 500–519. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2010.05.003.
- [8] Ashton N, Ward B, Serpell G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia [J]. *Br J Ophthalmol*, 1954, 38(7): 397–432.
- [9] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101–111.
- [10] Ricci B. Oxygen-induced retinopathy in the rat model [J]. *Doc Ophthalmol*, 1990, 74(3): 171–177.
- [11] McLeod DS, Brownstein R, Luttly GA. Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(2): 300–311.
- [12] Cao Z, Jensen LD, Rouhi P, et al. Hypoxia-induced retinopathy model in adult zebrafish [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(12): 1903–1910. DOI: 10.1038/nprot.2010.149.
- [13] Wang F, Bai Y, Yu W, et al. Anti-angiogenic effect of KH902 on retinal neovascularization [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 251(9): 2131–2139. DOI: 10.1007/s00417-013-2392-6.
- [14] Liang X, Zhou H, Ding Y, et al. TMP prevents retinal neovascularization and imparts neuroprotection in an oxygen-induced retinopathy model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(4): 2157–2169. DOI: 10.1167/iov.11-9315.
- [15] Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(11): 1565–1573. DOI: 10.1038/nprot.2009.187.
- [16] Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander D, et al. Ocular models of angiogenesis [J]. *Methods Enzymol*, 2008, 444: 115–158. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)02806-1.
- [17] Rabinowitz R, Priel A, Rosner M, et al. Avastin treatment reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity [J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37(7): 624–629. DOI: 10.3109/02713683.2012.669003.
- [18] Soetikno BT, Yi J, Shah R, et al. Inner retinal oxygen metabolism in the 50/10 oxygen-induced retinopathy model [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16752 [2015-01-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649746/>. DOI: 10.1038/srep16752.
- [19] Katargina LA, Chesnokova NB, Beznos OV, et al. Melatonin as a new promising agent for the treatment and prevention of retinopathy of prematurity [J]. *Vestn Ophthalmol*, 2016, 132(6): 59–63.
- [20] Madan A, Penn JS. Animal models of oxygen-induced retinopathy [J]. *Front Biosci*, 2003, 8: 1030–1043.
- [21] Patz A. Oxygen studies in retrolental fibroplasia. IV [J]. *Am J Ophthalmol*, 1954, 38(3): 291–308.
- [22] Ashton N, Blach R. Studies on developing retinal vessels. VIII. effect of oxygen on the retinal vessels of the ratling [J]. *Br J Ophthalmol*, 1961, 45(5): 321–340.
- [23] Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(3): 576–585.
- [24] Penn JS, Henry MM, Wall PT, et al. The range of PaO₂ variation determines the severity of oxygen-induced retinopathy in newborn rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36(10): 2063–2070.
- [25] Penn JS, Thum LA, Naash MI. Oxygen-induced retinopathy in the rat. Vitamins C and E as potential therapies [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33(6): 1836–1845.
- [26] Penn JS, Tolman BL, Henry MM. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(9): 3429–3435.
- [27] Saito Y, Uppal A, Byfield G, et al. Activated NAD(P)H oxidase from supplemental oxygen induces neovascularization independent of VEGF in retinopathy of prematurity model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(4): 1591–1598. DOI: 10.1167/iov.07-1356.
- [28] Ashton N. Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina [J]. *Ophthalmologica*, 1970, 160(1): 54–71.
- [29] Tian XM, Wang R, Zhang BK, et al. Impact of Lycium Barbarum Polysaccharide and Danshensu on vascular endothelial growth factor in the process of retinal neovascularization of rabbit [J]. *Int J Ophthalmol*, 2013, 6(1): 59–61. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2013.01.12.
- [30] Ashton N, Graymore C, Pedler C. Studies on developing retinal vessels. V. Mechanism of vaso-obliteration; a preliminary report [J]. *Br J Ophthalmol*, 1957, 41(8): 449–460.
- [31] Chan-Ling TL, Halasz P, Stone J. Development of retinal vasculature in the cat; processes and mechanisms [J]. *Curr Eye Res*, 1990, 9(5): 459–478.
- [32] Chan-Ling T, Tout S, Holländer H, et al. Vascular changes and their mechanisms in the feline model of retinopathy of prematurity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33(7): 2128–2147.
- [33] Phelps DL, Rosenbaum AL. Effects of marginal hypoxemia on recovery from oxygen-induced retinopathy in the kitten model [J]. *Pediatrics*, 1984, 73(1): 1–6.
- [34] Stone J, Itin A, Alon T, et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(7 Pt 1): 4738–4747.
- [35] Flower RW, McLeod DS, Luttly GA, et al. Postnatal retinal vascular development of the puppy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985, 26(7): 957–968.
- [36] McLeod DS, D'Anna SA, Luttly GA. Clinical and histopathologic features of canine oxygen-induced proliferative retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(10): 1918–1932.
- [37] Flower RW. A mechanism for oxygen damage to the immature retinal vasculature [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1984, 169: 671–687.
- [38] McLeod DS, Taomoto M, Cao J, et al. Localization of VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1) and effects of blocking it in oxygen-induced retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(2): 474–482.
- [39] Julien S, Biesemeier A, Taubitz T, et al. Different effects of intravitreally injected ranibizumab and aflibercept on retinal and choroidal tissues of monkey eyes [J]. *Br J Ophthalmol*, 2014, 98(6): 813–825. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2013-304019.
- [40] Lawson ND, Wolfe SA. Forward and reverse genetic approaches for the analysis of vertebrate development in the zebrafish [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 48–64. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.06.007.
- [41] Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 695–701. DOI: 10.1038/nbt1398.
- [42] Funfak A, Brösing A, Brand M, et al. Micro fluid segment technique for screening and development studies on Danio rerio embryos [J]. *Lab Chip*, 2007, 7(9): 1132–1138. DOI: 10.1039/b701116d.
- [43] Cao R, Jensen LD, Söll I, et al. Hypoxia-induced retinal angiogenesis in zebrafish as a model to study retinopathy [J/OL]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2748 [2015-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18648503>. DOI: 10.1371/journal.pone.0002748.
- [44] Wu YC, Chang CY, Kao A, et al. Hypoxia-induced retinal neovascularization in zebrafish embryos: a potential model of retinopathy of prematurity [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126750 [2015-01-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25978439>. DOI: 10.1371/journal.pone.0126750.

(收稿日期: 2017-05-04 修回日期: 2017-11-30)

(本文编辑: 杜娟)