

视网膜新生血管鼠模型的研究进展

徐千惠 综述 陈俊 邵毅 审校

南昌大学第一附属医院眼科, 南昌 330006

通信作者: 邵毅, Email: freebee99@163.com

【摘要】 视网膜新生血管(RNV)起源于视网膜血管,是许多影响视力的眼部疾病的主要病理特征之一,与脉络膜新生血管有着密不可分的联系,随着疾病进展会导致视力损伤等一系列并发症。可以利用激光诱导、手术使小鼠模型产生 RNV、缺血性视网膜病变等病理表现。随着基因工程技术的不断成熟,还研发了多种 RNV 基因工程模型鼠。本文介绍了 RNV 激光诱导静脉阻塞小鼠模型、氧诱导小鼠模型、血管内皮生长因子高表达模型以及双基因敲除小鼠模型等。这些基因工程模型鼠概括了 RNV 在人类中的许多临床表现,不同类型小鼠模型诱导产生 RNV 的机制不同,可以表现出不同类型和病程的 RNV 症状。因此各种不同机制诱导的 RNV 鼠模型在 RNV 的病理研究中起到了一定的作用;给医务人员和相关领域研究者提供有关 RNV 鼠模型的介绍,从而评估此类疾病的新治疗方法,还可以为新型药物提供实验对象,为临床诊断治疗提供基础。

【关键词】 视网膜新生血管; 基因工程; 动物模型; 小鼠

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200211-00064

Advances in rodent models of retinal neovascularization

Xu Qianhui, Chen Jun, Shao Yi

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: Shao Yi, Email: freebee99@163.com

【Abstract】 Retinal neovascularization (RNV) originating from retinal blood vessels is one of the main pathological features of many ocular diseases that affect vision. It is inseparably linked to choroidal neovascularization and can cause a series of complications, for instance, visual impairment as diseases progress. Pathological manifestations such as RNV and ischemic retinopathy can be constructed in mouse models by laser induction and surgery. With the continuous development of genetic engineering technology, genetic engineering has been applied in the establishment of a variety of RNV mouse models. This article introduced the RNV mouse models of laser-induced venous occlusion, oxygen-induced retinopathy, vascular endothelial growth factor high expression, and double gene knockout. These genetically engineered mouse models can have many clinical manifestations of RNV in humans. Mechanisms of inducing RNV in various types of mouse models are different, thus types and the course of RNV symptoms induced can be different. RNV mouse models induced by various mechanisms have played a role in the pathological study of RNV. This reviewed aimed to sort RNV mouse models for medical staff and researchers to evaluate new treatments for the disease, provide experimental objects for new drugs and lay a basis for clinical diagnosis and treatment.

【Key words】 Retinal neovascularization; Genetic engineering; Disease models, animal; Mice

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200211-00064

建立视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)动物模型有助于研究者更加全面深入了解某些疾病,例如糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)和脉络膜新生血管等的生物学特性,同时也可应用于新型治疗方法的测试和新技术的开发^[1]。这些基因工程模型鼠概括了 RNV 在人类中的许多临床表现,但 RNV 的发展时间、病情进展、病变的大小和外观在不同模型鼠中各不相同。本文介绍 RNV 阻塞小鼠模型、RNV 氧诱导模型和 RNV 转基因小鼠模型优缺点以及在临床病理研究上的

前景,以期为医务人员和相关领域研究者提供有关基因工程模型鼠相对全面的介绍,评估这些疾病的新治疗方法,为研究人员进一步阐明 RNV 的生物学特性和病理机制研究提供参考。

1 RNV 概述

近年来 RNV 疾病受到越来越多的关注。RNV 的形成起源于视网膜血管,具有双血供特性。RNV 通常是由于内界膜延伸到玻璃体,在一些情况下,血管向反方向生长进入视网膜下间隙,许多研究已经表明缺血是 RNV 形成的主要原因^[2]。RNV

所致疾病的共同特征是视网膜血管的衰减导致视网膜缺血, DR、ROP、视网膜中央静脉阻塞和视网膜分支静脉阻塞被称为缺血性视网膜病变。

RNV 是由多种病因引发的脉络膜新生血管芽穿越 Bruch 膜并在视网膜色素上皮上、下增生形成的纤维血管组织,常伴有视网膜下的浆液性渗出乃至出血,是导致多种眼底疾病视功能损害的主要原因^[3]。研究显示,RNV 形成过程中涉及多种信号分子表达水平的改变,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、组织蛋白酶 B、碱性成纤维细胞生长因子、白细胞介素 8、肿瘤坏死因子以及单核细胞趋化因子等^[4-7]。

RNV 形成是缺血、缺氧性视网膜疾病发展到终末阶段的特征性表现,如增生性 DR 和 ROP^[8]。DR 是糖尿病严重的眼部并发症之一,其血管增生阶段,异常的血液沿视网膜血管进入玻璃体。目前还没有模型能完全概括出糖尿病每个阶段发生的神经和血管变化的病理生理学过程^[9]。其常用的模型为大鼠腹腔内注射链脲佐菌素诱导,利用硝基胍衍生物链脲毒素的致糖尿病作用诱导大鼠发生糖尿病从而研究 DR 的特征^[10]。氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型中常见的用于研究 DR 的是通过激光或光动力诱导 RNV 形成并伴有视网膜静脉阻塞。

此外,随着基因工程技术的不断发展,可以利用分子生物学手段在小鼠体细胞或生殖细胞内实现转基因或目的基因的敲入或敲除,如表达 Kras 并敲除 Smad5 的小鼠以及 Kras 突变和/或 Trp53 突变的小鼠成为胰腺癌研究常用的动物模型^[11]。淀粉样前体蛋白转基因小鼠模型可被用于研究阿尔茨海默病的病理机制^[12]。由此可见,基因工程小鼠模型可以用于探讨特定基因型与疾病表型的关联,极大地丰富了对宿主基因功能和疾病特征的研究。

2 RNV 阻塞模型

通过激光和光动力造成小鼠静脉阻塞已成为 RNV 的有效模型^[13]。小鼠视网膜静脉阻塞引起的微血管改变与临床上视网膜分支静脉阻塞相似,包括静脉扩张、血管迂曲和视网膜血管渗出液。激光和光动力可以诱导视网膜或虹膜内血流减少、视网膜缺血和随后新生血管的形成。根据模型制作时影响视网膜静脉数量的改变,该模型可以是视网膜分支静脉阻塞或中央静脉阻塞模型。

模型制作过程如下:当小鼠麻醉结束后,通过尾静脉注射玫瑰孟加拉染料,或腹腔内注射荧光素钠,并在主要静脉选择激光点。如果激光过弱则不会发生闭塞,而过于强烈则会广泛损害视网膜其他区域或引起静脉出血,因此需要调整适宜的激光参数,实现静脉闭塞。当 RNV 形成发生在单个视网膜或多个视网膜静脉,并用氩激光凝固或光动力方式阻塞后,小鼠可出现视网膜水肿、出血和视网膜静脉闭塞,然后可发现在视网膜缺血区域前后有新生血管形成。

3 RNV 氧诱导模型

OIR 小鼠模型已成为研究缺血引起的病理性血管生成类

疾病的重要模型^[14]。该模型的基本机制为视网膜在早期发育过程中暴露于高氧状态下会导致正常视网膜血管发育的阻滞。当模型动物回到正常体温时,在神经组织有充分营养支持的条件下,模型处于相对缺氧状态同时视网膜缺乏正常的血管系统。而这种不受控制、异常的 RNV 生成与 ROP 一致。此类 OIR 小鼠模型优点在于当暴露在高氧环境下时视网膜周围血管消失^[15],当氧气从室内空气中去除,会导致血管与血管之间的新生血管生长至视网膜中周部无血管区域。尽管 ROP 后期 OIR 小鼠模型未发生视网膜脱离,但这种缺血介导病理性新生血管形成的 OIR 模型对于研究 DR 也十分有用,同时也已经应用到相关抗血管生成的一般研究。此外,小鼠模型的成本和手术时间与其他动物相比是有利的,并且小鼠的视网膜能够相对顺利地发展成病理性血管闭塞和新生血管的合格模型。

4 RNV 转基因小鼠模型

4.1 rho/VEGF 转基因小鼠

有研究者观察由视紫红质启动子驱动的 VEGF 转基因小鼠(rho/VEGF 小鼠)视网膜内和视网膜下新生血管的发育,提出 VEGF 在视网膜光感受器中过度表达,表明新生血管起源于视网膜深毛细血管床,延伸至视网膜下间隙。rho/VEGF 转基因模型可能与视网膜血管瘤增生患者的疾病实体更密切相关^[8]。

4.2 rho/rTA-TRE/VEGF 或 IRBP/rTA-TRE/VEGF 转基因小鼠

使用反向四环素置换激活子(reverse tetracycline replacement activator, rTA)诱导启动子系统,与视网膜紫质蛋白或视网膜受体结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)启动子耦联来控制 VEGF 转基因表达在视网膜中开始的时间。在有多西环素的情况下,成年转基因小鼠的 VEGF 表达很少。在小鼠体内添加多西环素后,VEGF 表达明显增多,表达范围更广,并显示与更广泛的新生血管形成有关。

4.3 VEGF165 高表达小鼠模型

VEGF165(hVEGF)过度表达转基因小鼠模型可表现为轻度到重度 RNV 形成。这些转基因小鼠模型通过显微注射含有 hVEGF 基因的 DNA 结构,随后 hVEGF 基因被截断的小鼠视网膜紫质启动子驱动。低 hVEGF 的转基因系表现出轻度改变,如荧光素渗漏、小动脉瘤和静脉曲张;高 hVEGF 的转基因系表现出严重表型和广泛的新生血管形成、出血以及视网膜脱离^[16]。

4.4 *Nrl*^{-/-}*Grk1*^{-/-} 双基因敲除小鼠

Nrl^{-/-}*Grk1*^{-/-} 双基因敲除小鼠是从 G 蛋白耦联受体信息传导通路着手研究, G 蛋白耦联受体激酶(G protein-coupled receptor kinase 1, Grk1)参与视锥细胞的失活和正常复苏,神经视网膜亮氨酸拉链基因敲除的小鼠(*Nrl*^{-/-})视网膜在生物化学中被称为“全视锥细胞型”。研究显示缺乏 Grk1 将导致与年龄和光线相关的锥体细胞营养不良。在 1 月龄小鼠的视网膜全层可观察到新生血管形成,而这些均为炎症通路介导^[17]。

5 小结与展望

视网膜周围新生血管的 2 种类型是脉络膜新生血管以及 RNV, RNV 起源于视网膜循环,延伸至玻璃体后、玻璃体面或是

进入玻璃体,由于血管生成细胞因子扩散到玻璃体,RNV 通常会以一种更为随意、迅速的方式增长。RNV 是由视网膜大面积毛细血管闭塞、慢性缺血引起,与 VEGF 的生成和释放有关。新生血管可起自视盘表面及视网膜小静脉,沿视网膜表面生长,在有玻璃体粘连的部位可长入玻璃体内,并含有数量不等的纤维组织。在小鼠模型中,诱导缺血的方法有缺氧、激光、炎症和辐射。RNV 小鼠模型可以通过激光光凝或光动力疗法阻断视网膜静脉,诱导 RNV 和视网膜静脉阻塞。其他小鼠模型包括过表达 VEGF 转基因小鼠模型以及炎症相关模型。本文介绍了经尾静脉注射玫瑰孟加拉染料或腹腔内注射荧光素钠,通过激光实现静脉闭塞从而在缺血区域形成新生血管的 RNV 阻塞小鼠模型;通过制造高氧状态使小鼠正常视网膜血管发育阻滞,从而诱导 RNV 形成的氧诱导 RNV 小鼠模型;还介绍了一系列基因工程小鼠模型,包括 VEGF 转基因表达促进新生血管形成的诱导 RNV 小鼠模型、VEGF165 高表达诱导 RNV 小鼠模型以及 *Nrl^{-/-}Grk1^{-/-}* 双基因敲除影响视锥细胞发育的诱导 RNV 小鼠模型。因此在 RNV 主要致病因素和治疗方式的研究过程中发现小鼠模型有良好的特征,更易于量化和重现,因此对小鼠模型研究更为普遍。

成功的 RNV 模型关键在于以不同方式诱导视网膜发生缺血等病理表现,缺血在 RNV 的发育中起着重要作用。RNV 小鼠模型建成的要点是在于寻找各种不同的方式使视网膜缺血,减少血流量,进而通过病理生理机制产生 RNV。通过研究模型小鼠的视网膜更有利于详细研究病理血管的生长情况。由于视网膜血管系统在出生后发育,血管的形成和退化都可以在严格控制的环境下进行研究。大量使用小鼠视网膜的研究强调了使用出生后小鼠视网膜的各种活体模型的重要性,以及对我们理解一些威胁视力的疾病背后的血管生成病理机制有重要贡献。RNV 小鼠模型对生物机制、转基因和基因敲除模型的研究也有一定作用,对于药物开发研究人员来说,RNV 的动物模型提供了药物实验的基础。

不同 RNV 小鼠模型的形成机制不同,诱导得到的小鼠模型也展现不同的 RNV 病理形态和产生机制。在未来的研究中,研究者在选取动物模型前应当充分了解 RNV 形成的机制,根据测试的假设,以及可用资金和实验方向来选择最合适的小鼠模型。使用不同类型模型鼠有助于我们了解视网膜血管生成性病变的一些最明显特征以及后续临床应用治疗的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐晓玮,黎彪,邵毅. 脉络膜新生血管基因工程小鼠模型研究[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(9): 1488-1491. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2019. 9. 09.
Xu XW, Li B, Shao Y. Study on choroidal neovascularization genetically engineered mice model[J]. Int Eye Sci, 2019, 19(9): 1488-1491. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2019. 9. 09.
- [2] 冯宇梁,李杰,刘中男. 视网膜脉络膜新生血管性疾病机制及治疗研究进展[J]. 西部医学, 2016, 28(9): 1328-1332. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2016. 09. 038.
Feng YL, Li J, Liu JN. Advances in research of retinal and choroidal neovascularization diseases[J]. Med J West China, 2016, 28(9): 1328-1332. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2016. 09. 038.
- [3] 罗琰君,徐国兴. 视网膜新生血管抑制因子的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2017, 17(9): 1663-1666. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2017. 9. 14.
Luo YJ, Xu GX. Research advance of retinal neovascularization inhibitory factor[J]. Int Eye Sci, 2017, 17(9): 1663-1666. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2017. 9. 14.
- [4] 王永瑞,孔丽,王文娟,等. 组织蛋白酶 B 与血管内皮生长因子影响高氧诱导小鼠视网膜新生血管形成的实验研究[J]. 中华眼科医学杂志: 电子版, 2019, 9(2): 90-95. DOI: 10. 3877/cma. j. issn. 2095-2007. 2019. 02. 005.
Wang YR, Kong L, Wang WJ, et al. Effects of cathepsin B and vascular endothelial growth factor on the retinal neovascularization induced by hyperoxia in mice[J]. Chin J Ophthalmol Med (Electronic Edition), 2019, 9(2): 90-95. DOI: 10. 3877/cma. j. issn. 2095-2007. 2019. 02. 005.
- [5] 王文娟,周国宏. 组织蛋白酶 B 和血管内皮生长因子在高氧诱导的视网膜新生血管中的作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(10): 873-877. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 10. 003.
Wang WJ, Zhou GH. Effect of Cathepsin B and vascular endothelial growth factor on the retinal neovascularization induced by hyperoxia[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(10): 873-877. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 10. 003.
- [6] Rezzola S, Belleri M, Gariano G, et al. *In vitro* and *ex vivo* retina angiogenesis assays[J]. Angiogenesis, 2014, 17(3): 429-442. DOI: 10. 1007/s10456-013-9398-x.
- [7] Rivera JC, Holm M, Austeng D, et al. Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies[J/OL]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 165 [2022-03-20]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28830469/. DOI: 10. 1186/s12974-017-0943-1.
- [8] Rubio RC, Adamis AP. Ocular angiogenesis: vascular endothelial growth factor and other factors[J]. Dev Ophthalmol, 2016, 55: 28-37. DOI: 10. 1159/000431129.
- [9] Olivares AM, Althoff K, Chen GF, et al. Animal models of diabetic retinopathy[J/OL]. Curr Diab Rep, 2017, 17(10): 93 [2022-03-20]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28836097/. DOI: 10. 1007/s11892-017-0913-0.
- [10] Sosula L, Beaumont P, Hollows FC, et al. Dilatation and endothelial proliferation of retinal capillaries in streptozotocin-diabetic rats; quantitative electron microscopy[J]. Invest Ophthalmol, 1972, 11(11): 926-935.
- [11] 王佑恒. 基因工程小鼠疾病模型的研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(91): 184-185. DOI: 10. 3877/j. issn. 2095-8242. 2018. 91. 133.
- [12] 尹芳,龚盛强,李富周,等. 阿尔茨海默病基因工程模型鼠的研究现状[J]. 医学综述, 2018, 24(2): 241-247, 253. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2018. 02. 007.
Yin F, Gong SQ, Li FZ, et al. Current status of genetic engineering mouse models of Alzheimer's disease[J]. Med Recapitul, 2018, 24(2): 241-247, 253. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2018. 02. 007.
- [13] Geng W, Qin F, Ren J, et al. Mini-peptide RPL41 attenuated retinal neovascularization by inducing degradation of ATF4 in oxygen-induced retinopathy mice[J]. Exp Cell Res, 2018, 369(2): 243-250. DOI: 10. 1016/j. yexcr. 2018. 05. 027.
- [14] 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.
- [15] Liyanage SE, Fantin A, Villacampa P, et al. Myeloid-derived vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor are dispensable for ocular neovascularization—brief report[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(1): 19-24. DOI: 10. 1161/ATVBAHA. 115. 306681.
- [16] Lai CM, Dunlop SA, May LA, et al. Generation of transgenic mice with mild and severe retinal neovascularisation[J]. Br J Ophthalmol, 2005, 89(7): 911-916. DOI: 10. 1136/bjo. 2004. 059089.
- [17] Yetemian RM, Brown BM, Craft CM. Neovascularization, enhanced inflammatory response, and age-related cone dystrophy in the *Nrl^{-/-}Grk1^{-/-}* mouse retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(12): 6196-6206. DOI: 10. 1167/iovs. 10-5452.

(收稿日期:2022-04-11 修回日期:2022-08-23)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

