

· 实验研究 ·

糖尿病大鼠血-视网膜屏障功能评估中伊文思蓝灌注视网膜铺片技术的改良和应用

董蒙 陈松 段红涛 王月欣 孔佳慧 李泽东 王昀

【摘要】 背景 伊文思蓝(EB)灌注的大鼠视网膜铺片是实验研究过程中观察血-视网膜屏障(BRB)功能的常用方法,但以往视网膜标本经固定液处理后透光性差,仅能用激光扫描共焦显微镜进行观察,对实验设备要求较高。目的 探讨 EB 灌注糖尿病(DM)大鼠视网膜后在 PBS 中制作透明视网膜标本,并用普通荧光显微镜观察 BRB 功能技术的可行性。方法 应用随机数字表法将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、DM 1 个月组、DM 3 个月组和 DM 6 个月组。将质量分数 2% 链脲佐菌素(STZ)溶于 0.05 mmol/L 枸橼酸缓冲液,以 60 mg/kg 的剂量一次性腹腔内注射建立大鼠 DM 模型,对照组大鼠腹腔内注射等容量枸橼酸缓冲液。分别于造模后 1、3、6 个月按 45 mg/kg 的剂量经大鼠股静脉注射 30 g/L 的 EB 溶液,注射后 15 min 摘除双侧眼球,立即置于 PBS 中完整剥离视网膜,将视网膜放射状切开并平铺于载玻片上,避光晾至完全透明,封片,置于荧光显微镜下观察并拍照。应用 IPP 6.0 软件分析图像,测量 EB 渗漏区面积与视网膜面积的百分比。结果 对照组大鼠视网膜血管形态和走行正常,EB 在波长 546 nm 激发光下呈红色荧光,均匀充盈于血管腔。DM 1 个月组大鼠视网膜背景荧光较对照组大鼠略增强;DM 3 个月组大鼠视网膜背景荧光进一步增强,视网膜血管呈现节段性扩张,可见明显的红色高荧光区;DM 6 个月组大鼠视网膜血管粗细不均,部分走行迂曲,可见片状低灌注区及大量高荧光区。对照组、DM 1 个月组、DM 3 个月组和 DM 6 个月组 EB 渗漏区面积百分比分别为 $(0.05 \pm 0.02)\%$ 、 $(0.27 \pm 0.06)\%$ 、 $(1.17 \pm 0.18)\%$ 和 $(4.77 \pm 0.66)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 795.800, P < 0.001$), 其中 DM 3 个月组和 DM 6 个月组大鼠视网膜 EB 渗漏区面积百分比值明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ($q' = 10.338, 43.475$, 均 $P < 0.001$)。结论 改良的 EB 灌注视网膜铺片技术操作简单, 普通荧光显微镜下即可清晰显示 DM 大鼠的 BRB 结构和动态变化。

【关键词】 视网膜铺片; 糖尿病视网膜病变; 动物模型; Sprague-Dawley 大鼠; 血-视网膜屏障; 伊文思蓝

Modification and application of Evans blue-perfused retinal wholemount method in blood-retinal barrier evaluation of diabetic rats Dong Meng, Chen Song, Duan Hongtao, Wang Yuexin, Kong Jiahui, Li Zedong, Wang Yun. Clinical College of Ophthalmology of Tianjin Medical University, Tianjin Eye Hospital, Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Vision Science, Tianjin Institute of Ophthalmology, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Chen Song, Email: chensong20@hotmail.com

[Abstract] **Background** Retina fixed flat-mount perfused by Evans blue (EB) is a common method for the evaluation of blood-retinal barrier (BRB). However, previous method is inconvenient for some laboratories because the retinal specimen can not be observed by general microscope rather than confocal laser scanning microscope after the fixation. **Objective** This study was to modify the preparing way of flat-mounted retina in order to obtain transparent specimen for the observation of rat retinal vessels and the evaluation of leakage under the ordinary fluorescence microscope. **Methods** Forty male SD rats were divided into the control group, diabetes mellitus (DM) 1-month group, DM 3-month group and DM 6-month group according to the random number table. Streptozotocinum (STZ) of 2% dissolved in 0.05 mmol/L sodium citrate-hydrochloric acid buffer was

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.006

基金项目:天津市科技计划项目(13ZCZDSY01500)

作者单位:300020 天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科医院 天津市眼科学与视觉科学重点实验室 天津市眼科研究所

通信作者:陈松,Email:chensong20@hotmail.com

intraperitoneally injected in SD rats to establish DM models, and the equal volume of solvent was injected in the same way in the control rats. One month, three months and six months after injection, EB of 30 g/L was injected via rat femoral vein in the dose of 45 mg/kg. Fifteen minutes after injection of EB, the rats were sacrificed and the retinas were isolated and cut radially to prepare the flat-mounted retinas in PBS immediately and then were dried till the specimens were transparent. The specimens were examined under the fluorescence microscope. The percentage of EB leakage was quantitatively calculated by IPP 6.0 software. All procedures were performed following approval of the institutional animal care and use committee of Tianjin Medical University. **Results** The retina morphology was normal in the control group, and EB filled the vessels, exhibiting the red fluorescence under the fluorescence microscope. Compared with the control group, retinal background fluorescence was enhanced slightly in the DM 1-month group, and focal leakage of the EB from capillaries and focal dilated vessels were found in the DM 3-month group, further, vascular caliber inequality, retinal hypoperfusion area and a larger number of hyperfluorescence areas were seen in the DM 6-month group. The percentage of leakage area was $(0.05 \pm 0.02)\%$, $(0.27 \pm 0.06)\%$, $(1.17 \pm 0.18)\%$ and $(4.77 \pm 0.66)\%$ in the control group, DM 1-month group, DM 3-month group and DM 6-month group, respectively, showing a significant difference among the four groups ($F = 795.800, P < 0.001$), and the leakage area was obviously larger in the DM 3-month group and DM 6-month group than that in the control group ($q' = 10.338, q' = 43.475$, both at $P < 0.001$). **Conclusions** Modified EB-perfused retinal wholemount method is easy and helpful for clear visualization of retinal vessel leakage induced by BRB breakdown in the diabetic rats under the common fluorescence microscope.

[Key words] Retinal wholemount; Diabetic retinopathy; Disease model, animal; Rats, Sprague-Dawley; Blood-retinal barrier; Evans blue

伊文思蓝(Evans blue, EB)静脉注射后能与血浆白蛋白以10:1的比例紧密结合,当血管通透性增加时,EB-蛋白质复合物通过血管壁渗漏到周围组织,是一种较理想的示踪剂^[1]。EB灌注视网膜铺片是观察血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)功能的常用方法,已用于多种类型实验动物模型的评价,如糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)动物模型、视网膜缺血-再灌注损伤动物模型和实验性自身免疫性葡萄膜炎动物模型等^[2-5]。大鼠视网膜组织是实验研究的常用标本,经多聚甲醛或其他固定液固定后便于平铺,但固定液可导致视网膜神经上皮细胞变性,使视网膜组织变厚及透光性下降,仅能通过激光扫描共焦显微镜进行观察^[2-4],但并非所有实验室都具备激光扫描共焦显微镜。研究发现,将含体积分数95%O₂和体积分数5%CO₂混合气体通入人工脑脊液后视网膜完整地被分离^[6-7]。本研究中在上述研究技术的基础上,尝试在等渗PBS中分离和制备灌注EB的透明视网膜铺片,并探讨其在普通荧光显微镜下进行形态学观察的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8周龄SPF级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠40只,体质量180~200g,购自中国军事医学科学院动物中心。大鼠饲养于温度18~22℃、相对

湿度40%~70%、12 h昼夜交替的环境中。实验动物的喂养和使用遵循天津医科大学动物保护与使用委员会规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、EB(美国Sigma公司);PBS(0.01 mmol/L, pH 7.4)(北京中杉金桥生物技术有限公司);枸橼酸缓冲液(0.05 mmol/L, pH 4.5)(天津市北方天医化学试剂厂);质量分数0.09%生理盐水(中国大冢制药有限公司);体积分数50%甘油缓冲液($V_{\text{甘油}} : V_{\text{PBS}} = 1:1$)。血糖仪(美国Roche公司);手术显微镜(美国Carl Zeiss公司);眼科显微手术器械(苏州六六视觉科技股份有限公司);直径60 mm培养皿(美国Corning Costar公司);载玻片(江苏世泰实验器材有限公司);荧光显微镜(日本Nikon公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型建立 按随机数字表法将40只SD大鼠随机分为对照组、糖尿病(diabetes mellitus, DM)1个月组、DM3个月组和DM6个月组。将质量分数2%STZ溶液(STZ溶于0.05 mmol/L枸橼酸缓冲液)以60 mg/kg的剂量一次性腹腔内注射建立大鼠DM模型。注射后3 d,取尾静脉血检测血糖水平,血糖水平≥20 mmol/L为造模成功。对照组大鼠以同样的方法注射等容量枸橼酸缓冲液。分别于造模后1、3、6个月在各组大鼠腹腔内注射体积分数10%水合氯醛进行麻醉,将大鼠固定于实验台,剪开左侧腹股沟部皮

肤,暴露左侧股静脉,1 min 内经股静脉按 45 mg/kg 剂量注射质量浓度为 30 g/L EB 溶液(EB 溶于 0.09% 生理盐水),大鼠全身即刻变蓝时表明灌注成功,15 min 后过量麻醉法处死大鼠,摘除双侧眼球,立即制备视网膜铺片。

1.2.2 大鼠视网膜铺片 在手术显微镜下将眼球沿角巩膜缘环形切开,去除角膜、虹膜、晶状体和玻璃体,用 PBS 冲洗眼杯,置于盛有干净 PBS 的培养皿中。用巩膜隧道刀钝性分离视网膜,待完全松解后,用手术刀片切断视神经。将完整剥离的视网膜在 PBS 中行均匀放射状切开并分为 4 个象限,平铺于培养皿底部的载玻片上,展平后将载玻片捞出,发现视网膜呈半透明状。将标本避光晾至完全透明,50% 甘油缓冲液封片。

1.2.3 EB 渗漏区面积的观察及测量 用波长为 546 nm 的滤光片在荧光显微镜下观察视网膜血管分布及 EB 渗漏情况,并在相同激发光强度、相同曝光时间等参数下拍照。EB 在波长 546 nm 激发光下呈红色荧光。参照文献[8]的方法,每张视网膜铺片中任意选取 1 个象限,拍摄 100 倍视网膜铺片荧光显微镜像,将其导入 IPP 6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司)进行分析,灰度值为 230~255 的区域即为渗漏区。剔除该区域内含正常血管充盈的强荧光区域,将渗漏区面积及该视野视网膜面积导出至 Excel 表格中,两者之比表示渗漏区面积百分比。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件(IBM SPSS Statistics)进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用完全随机分组单因素干预四水平实验设计,对照组、DM 1 个月组、DM 3 个月组和 DM 6 个月组大鼠视网膜 EB 渗漏区面积百分比的总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett t 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠视网膜铺片中的血管形态

对照组大鼠视网膜血管形态和走行正常,EB 的红色荧光均匀充盈于血管腔,各级分支血管清晰可见。在低荧光背景下,对照组大鼠视网膜浅层大血管走行平直,边缘锐利清晰,无 EB 渗漏(图 1A)。在相同位置和相同放大倍数下,对照组大鼠视网膜深层毛细血管网充盈良好(图 1B)。DM 1 个月组大鼠视网膜血管形态与对照组大鼠相比未见明显异常,但视网膜背景荧光较对照组大鼠稍增强,可见散在 EB 渗漏点(图 1C)。DM 3 个月组大鼠视网膜背景荧光进一步增强,

视网膜血管呈节段性扩张,可见明显的 EB 渗漏,形成高荧光区(图 1D)。DM 6 个月组大鼠视网膜血管粗细不均,走行迂曲,视网膜可见片状低灌注区,毛细血管出现广泛渗漏,管壁结构模糊不清(图 1E)。

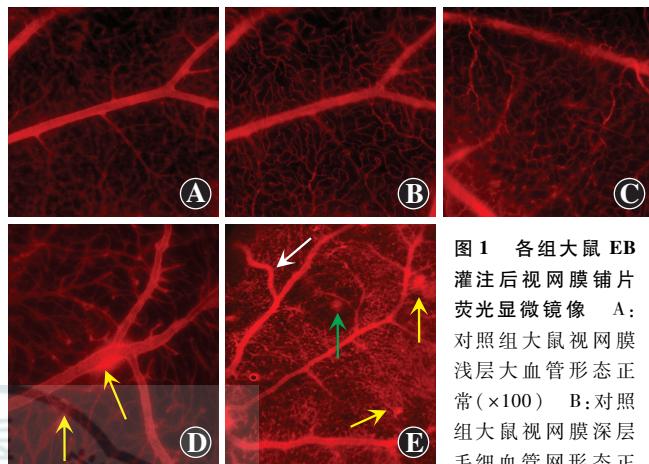


图 1 各组大鼠 EB 灌注后视网膜铺片 荧光显微镜像 A: 对照组大鼠视网膜浅层大血管形态正常($\times 100$) B: 对照组大鼠视网膜深层毛细血管网形态正常($\times 100$) C: DM 1 个月组大鼠视网膜血管形态接近正常,但视网膜背景荧光略增强($\times 100$) D: DM 3 个月组大鼠视网膜血管旁出现明显 EB 渗漏区(黄箭头)($\times 100$) E: DM 6 个月组大鼠视网膜血管病变明显,血管粗细不均,走行迂曲(白箭头),可见片状低灌注区域(绿箭头),毛细血管出现广泛渗漏(黄箭头),结构模糊不清($\times 40$)

2.2 大鼠视网膜 EB 渗漏区面积百分比的比较

对照组、DM 1 个月、DM 3 个月和 DM 6 个月组 EB 渗漏区面积百分比分别为 $(0.05 \pm 0.02)\%$ 、 $(0.27 \pm 0.06)\%$ 、 $(1.17 \pm 0.18)\%$ 和 $(4.77 \pm 0.66)\%$,显示随着 DM 大鼠造模时间的延长,视网膜渗漏区面积百分比逐渐增加,组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 795.800, P < 0.001$),其中 DM 1 个月组大鼠视网膜 EB 渗漏区面积百分比与对照组比较差异无统计学意义 ($q' = 2.104, P = 0.109$),DM 3 个月组、DM 6 个月组大鼠视网膜 EB 渗漏区面积百分比明显高于对照组,差异有统计学意义 ($q' = 10.338, P < 0.001; q' = 43.475, P < 0.001$)(图 2)。

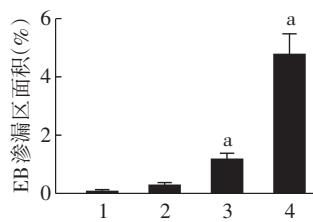


图 2 各组大鼠视网膜 EB 渗漏区面积的定量比较 1:对照组 2:DM 1 个月组 3:DM 3 个月组 4:DM 6 个月组 $F = 795.800, P < 0.001$. 与对照组比较,^a $P < 0.01$ (单因素方差分析,Dunnett t 检验) EB:伊文思蓝

3 讨论

DR、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞及葡萄膜炎等眼部疾病均存在 BRB 功能障碍,导致视网膜和脉络膜血管渗漏^[9],其实验研究中常用 EB 灌注视

网膜铺片技术探讨视网膜血管的病理改变。既往报道的 EB 灌注视网膜铺片技术是采用组织固定液对视网膜标本进行固定, 固定后大鼠视网膜标本不透明, 且对视网膜观察设备要求较高^[2-4]。本研究中对此技术进行改良, 去除了用固定液固定视网膜标本这个步骤, 将标本置于等渗 PBS 中, 剥离视网膜后直接进行视网膜铺片, 获得透明标本, 从而能够在普通荧光显微镜下直接观察, 并能通过微调焦距观察视网膜各层血管。改良后的 EB 灌注视网膜铺片技术可清晰显示对照组和 DM 视网膜血管形态以及 EB 渗漏情况, 与激光扫描共焦显微镜下的形态一致^[2-3]。此外, 该方法观察到 DM 6 个月组的大鼠视网膜上有片状低灌注区域, 与白细胞瘀滞导致该区域视网膜血液循环障碍有关^[10]。本研究中将拍摄的照片导入 IPP 6.0 软件中测量 EB 渗漏区占视网膜面积的百分比, 发现 DM 组大鼠视网膜 EB 渗漏区均大于对照组, 且随着时间的延长渗漏区面积逐渐增加, 与李艳等^[11]的研究结果吻合。本研究中的实验方法简便易行, 图像清晰、可靠, 但操作中应注意:(1)全身麻醉后的大鼠应置于温暖环境中, 以免体温降低影响血液循环。(2)灌注后 EB 在大鼠体内循环需要一定的时间, 才能从受损血管中渗出。(3)制作标本时要尽量完全清除玻璃体, 以免影响视网膜的展平, 尤其是与视网膜黏着紧密的部分。(4)铺片时动作应轻柔, 避免损伤视网膜。(5)铺片后尽快置于荧光显微镜下观察并拍照, 由于视网膜组织未经固定, 标本中血管形态仅可维持一定时间, 时间过长组织会溶解。本研究中观察到 EB 灌注后 4 h 视网膜血管结构开始模糊不清, 因此尽量在铺片后 1~2 h 进行观察和照相。

本研究中改良的 EB 灌注视网膜铺片技术简化了固定视网膜的步骤, 直接进行视网膜铺片, 此外通过普通荧光显微镜即可对标本进行观察, 降低了对设备的要求, 同时可获得清晰的大鼠视网膜血管形态图像, 适用于各类 BRB 功能障碍的大鼠视网膜血管渗漏的形

态学观察。

参考文献

- [1] Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42 (3): 789–794.
- [2] Leal EC, Martins J, Voabil P, et al. Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes [J]. Diabetes, 2010, 59 (10): 2637–2645. doi:10.2337/db09-1421.
- [3] Fan Y, Liu K, Wang Q, et al. Exendin-4 alleviates retinal vascular leakage by protecting the blood-retinal barrier and reducing retinal vascular permeability in diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. Exp Eye Res, 2014, 127: 104–116. doi:10.1016/j.exer.2014.05.004.
- [4] Danesh-Meyer HV, Kerr NM, Zhang J, et al. Connexin43 mimetic peptide reduces vascular leak and retinal ganglion cell death following retinal ischaemia [J]. Brain, 2012, 135 (Pt 2): 506–520. doi:10.1093/brain/awr338.
- [5] Xu H, Forrester JV, Liversidge J, et al. Leukocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (1): 226–234. doi:10.1167/iovs.01-1202.
- [6] Zhou ZJ. Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina [J]. J Neurosci, 1998, 18 (11): 4155–4165.
- [7] Zhou ZJ, Zhao D. Coordinated transitions in neurotransmitter systems for the initiation and propagation of spontaneous retinal waves [J]. J Neurosci, 2000, 20 (17): 6570–6577.
- [8] Anand-Apte B, Ebrahem Q, Cutler A, et al. Betacellulin induces increased retinal vascular permeability in mice [J/OL]. PLoS One, 2010, 5 (10): e13444 [2015-03-09]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013444>. doi:10.1371/journal.pone.0013444.
- [9] Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions [J]. Prog Retin Eye Res, 2013, 34: 19–48. doi:10.1016/j.preteyres.2013.02.001.
- [10] Leal EC, Manivannan A, Hosoya K, et al. Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48 (11): 5257–5265. doi:10.1167/iovs.07-0112.
- [11] 李艳, 李筱荣, 刘巨平, 等. 糖尿病大鼠视网膜屏障损伤观察 [J]. 中华眼底病杂志, 2007, 23 (4): 289–290.

(收稿日期:2015-04-23)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

· 病例报告 ·

双眼对称性视网膜有髓神经纤维伴高度近视一例

孙则红 王志学 赵俊华 李菁

患者,女,15岁,因自幼双眼视力差伴斜视和眼球震颤,于

2011年8月19日在沧州市中心医院眼科就诊。患者体格检查未见异常。无遗传病家族史。眼部检查:双眼视力0.05,不能矫正,复方托吡卡胺扩瞳后验光,双眼屈光度均为-14.25 D;眼球水平震颤;双眼内斜视(图1)。眼底:双眼视盘边界不清,周围可见放射状白色光泽区,边缘呈羽毛状,沿视神经纤维走行,

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.007

作者单位:061001 河北省沧州市,沧州市中心医院眼科
通讯作者:王志学,Email:wangzhixue5@163.com