

眼底荧光素血管造影在小鼠氧诱导视网膜病变中的应用评价

李蓉¹, 常远²

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基金项目 (No. 2013JC2-19); 陕西省教育厅自然科学基金项目 (No. 15JK1624); 西安医学院第一附属医院自然科学基金 (No. XYFY2013-04)

作者单位: ¹(710077) 中国陕西省西安市, 西安医学院第一附属医院眼科; ²(710021) 中国陕西省西安市, 西安医学院五官科教研室

作者简介: 李蓉, 毕业于第四军医大学, 眼科学博士, 副主任医师, 讲师, 眼科主任, 研究方向: 视网膜病。

通讯作者: 李蓉. rechelrong198222@163.com

收稿日期: 2015-06-17 **修回日期:** 2015-12-12

Evaluation of fundus fluorescein angiography in mice with oxygen-induced retinopathy

Rong Li¹, Yuan Chang²

Foundation items: Natural Science Foundation of Shaanxi Provincial Science and Technology Office (No. 2013JC2-19); Natural Science Foundation of Shaanxi Provincial Education Department (No. 15JK1624); the Research Foundation of the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University (No. XYFY2013-04)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Rong Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China. rechelrong198222@163.com

Received: 2015-06-17 **Accepted:** 2015-12-12

Abstract

• **AIM:** To investigate avasculopathy-evaluating method using fundus fluorescein angiography (FFA) in mice with oxygen-induced retinopathy (OIR).

• **METHODS:** OIR model was induced by exposure of mice from groups A and B (the retinopathy was known to be more severe in group B than that in group A by previous research) to high oxygen (75%) from postnatal day 7 (P7) to P12 ($n=12$ for each group) and returned to normal environment at P12. On P17, the mice from both groups were randomly assigned to accept FFA or high molecular weight fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-Dextran) perfusion combined with stretched preparation of retina (each method involved 6 pups from each group). The retinal non-perfused areas were quantified and compared by using image analysis software.

• **RESULTS:** FFA combined with image analysis software was able to quantify the retinal non-perfused areas, which was comparable to the results analyzed by FITC-Dextran perfusion combined with stretched preparation of retina. No statistical difference was found between the results obtained by the two methods ($P>0.05$).

• **CONCLUSION:** FFA combined with image quantification analysis can be used in retinalvasculopathy evaluation in mouse OIR model.

• **KEYWORDS:** oxygen-induced retinopathy; fundus fluorescein angiography; vasculopathy; quantification analysis

Citation: Li R, Chang Y. Evaluation of fundus fluorescein angiography in mice with oxygen-induced retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(1):41-44

摘要

目的: 在小鼠氧诱导视网膜病变模型 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 中评价眼底荧光素血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA) 的应用价值。

方法: 将前期实验证实视网膜病变严重程度有明显差异的两组 (B组>A组) 各 12 只新生幼鼠于出生后第 7d 置于 75% 浓度氧环境中, 第 12d 时返回正常空气环境中饲养。第 17d 时将 A 组和 B 组的幼鼠均随机分配, 分别进行 FFA 检查或高分子量 FITC-Dextran 灌注结合视网膜铺片检查, 即每种检查方法纳入两组幼鼠各 6 只, 利用图像分析软件对视网膜无灌注区进行定量分析和比较。

结果: FFA 结合图像分析软件能对视网膜无灌注区进行定量分析, 与 FITC-Dextran 灌注结合视网膜铺片的测量结果有良好的可比性, 两种方法得到的结果无统计学差异 ($P>0.05$)。

结论: FFA 结合图像定量分析在小鼠 OIR 模型的血管病变评价中具有一定的实用价值。

关键词: 氧诱导视网膜病变; 眼底荧光素血管造影; 血管病变; 定量分析

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.1.10

引用: 李蓉, 常远. 眼底荧光素血管造影在小鼠氧诱导视网膜病变中的应用评价. *国际眼科杂志* 2016;16(1):41-44

0 引言

通过对动物品系及吸氧浓度等关键环节的逐步改良, 20 世纪 90 年代由 Smith 等^[1]学者建立的小鼠氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 模型较为稳定, 可重复性好, 已被广泛用于早产儿视网膜病变

(retinopathy of prematurity, ROP) 的基础研究。OIR 的成模机制是将新生小鼠置入高氧环境,其发育不成熟的视网膜血管发生痉挛收缩、闭塞,在后极部形成无灌注区;返回常氧环境后,视网膜处于相对缺氧状态,引起血管内皮细胞增殖,最终形成病理性新生血管。此新生血管反应可较好地模拟一些视网膜疾病的病理过程,因此,OIR 小鼠模型也成为糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞等缺血性视网膜病变的重要研究平台。

对视网膜病变能够进行定量分析是 OIR 模型成功应用于 ROP 病理机制和治疗方法研究领域的关键。目前对 OIR 视网膜血管病变的观察方法主要包括眼底荧光素血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)、荧光素异硫氰酸葡聚糖(fluorescein isothiocyanate, FITC)-Dextran 灌注联合视网膜铺片、视网膜铺片荧光标记的 Lectin 血管染色等。FFA 是临床观察视网膜血管形态的重要手段,因缺乏定量评价指标,因此在 OIR 模型中的应用相对少于以上另两种方法。本研究探索了 FFA 应用于 OIR 的一种病变定量分析方法,旨在为此类基础实验提供一种新的评价手段。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 由西安医学院动物实验中心提供健康 C57BL/6J 孕鼠。在光照/暗室周期 12h/12h、背景噪音 40 ± 10 db、温度 $20^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ 、自由饮水和进食的条件下饲养。实验动物及条件符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。将 24 只小鼠分为 A 组和 B 组,每组各 12 只,根据前期实验结果^[2],已知 B 组的 OIR 病变比 A 组严重。A 组和 B 组均建立 OIR 模型,将每组的小鼠随机分配接受 FFA 检查或 FITC-Dextran 灌注。

1.1.2 主要试剂和仪器 体式显微镜(德国 Zeiss 公司),激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司),光学显微镜(德国 Leica 公司),FITC-Dextran(分子量为 2 000 000Da,美国 Sigma 公司),共焦激光眼底血管造影仪(德国 Heidelberg 公司)。

1.2 方法

1.2.1 OIR 模型建立 将 C57BL/6J 新生幼鼠及哺乳母鼠于出生后第 7d(P7)置于透明的密闭动物氧箱饲养,箱体内氧分压维持为 $(75\pm 1)\%$,氧气流量控制在 $1.5\text{L}/\text{min}$,期间采用氧气分析仪监测容器内的氧分压。控制室温在 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。正常日光照明,每 2d 打开氧箱更换垫料,加饲料及更换饮用水。出生后第 12d(P12)时取出幼鼠及母鼠置正常空气中饲养 5d。昼夜时间交替维持 12h/12h。

1.2.2 FFA 检查及结果判定 小鼠于 P17 时行 FFA 检查。腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉后散瞳,将 20% 荧光素钠注射液稀释至 2%,腹腔注射 0.15mL 后立即开始计时,3min 时开始用共焦激光眼底血管造影仪记录造影的影像,观察时间不少于注射后 6~8min。尽可能获取全视网膜图像,在拼图状态下由对实验分组不知情的人员利用 Photoshop CS3 软件对视网膜无灌注区的像素进行测量,利用一个采图视野(一个圆的面积)作为基准区像素,设定视网膜无灌注区面积比例=无灌注区像素/基准区像素(具体方法见结果部分)。A、B 两组各选择 6 只小鼠用于统计分析。

1.2.3 FITC-Dextran 血管灌注及视网膜铺片 经腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉 P17 小鼠,待疼痛

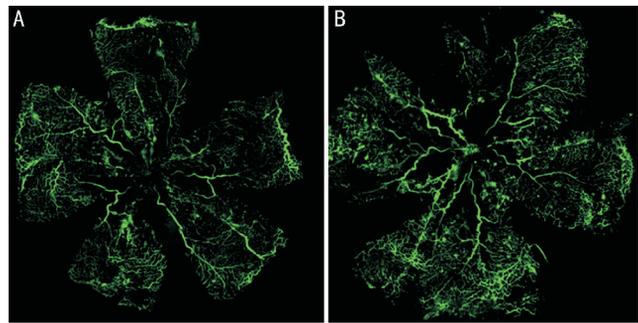


图 1 两组小鼠 FITC-Dextran 灌注、视网膜铺片代表图 A:A 组;B:B 组。

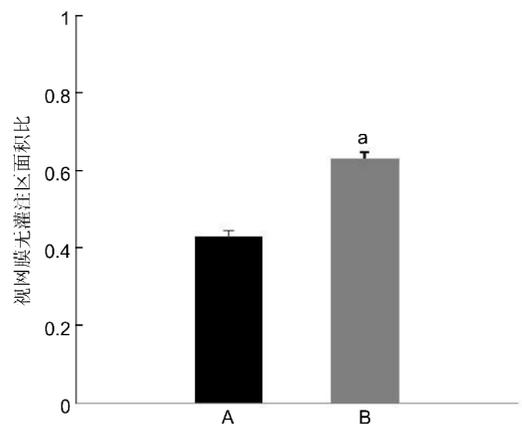


图 2 两组小鼠 FITC-Dextran 灌注、视网膜铺片无灌注区面积统计分析图 ^a $P < 0.05$ vs A 组。

反射消失后固定四肢,眼科剪打开胸腔,暴露心脏,头皮针针头自左心尖插入左心室并推入主动脉,小心剪开右心耳,缓慢推注 0.9% 的生理盐水约 10mL,观察双肺无膨胀,口鼻无出血或水,肝脏等组织逐渐变为白色。灌注分子量 2000000Da 的 FITC-Dextran 1mL (50mg/mL,溶于 PBS 中),肝脏、结膜等组织变为黄绿色为灌注正确。立即摘除眼球,在 4% 多聚甲醛中固定 3h。在体式显微镜下沿角巩膜缘剪下角膜及虹膜组织,娩出晶状体和玻璃体,将视网膜感觉层与色素上皮层分离,去除巩膜,将视网膜感觉层在 PBS 液中漂洗 3 次,清除残存的玻璃体,以视乳头为中心,将杯状视网膜放射状剪为 4 瓣,平铺于载玻片上,滴少量甘油后加盖玻片,激光共聚焦显微镜观察和照相记录。参照 Connor 等^[3]推荐的方法,利用 Photoshop CS3 软件勾画视网膜无血管区及全视网膜的边界,测量无血管区及视网膜总面积(像素),最后计算无血管区面积比例=无血管区像素/视网膜总像素。A、B 两组各选择 6 只小鼠用于统计分析。

统计学分析:实验数据以均数 \pm 标准差表示。用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,两组计量资料比较采用 Student's-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜无灌注区面积——FITC-Dextran 法 FITC-Dextran 灌注、视网膜铺片结合经典的测量和统计分析证实,B 组小鼠在 P17 时,视网膜无灌注区面积比为 0.63 ± 0.02 ,A 组小鼠为 0.43 ± 0.01 ,两组相比,B 组>A 组,差异均有统计学意义($t = 22.17, P < 0.05$,图 1,2)。

2.2 视网膜无灌注区面积——FFA 法 采用上述自创的评估方法,对 FFA 的图像进行软件处理分析,证实 B 组

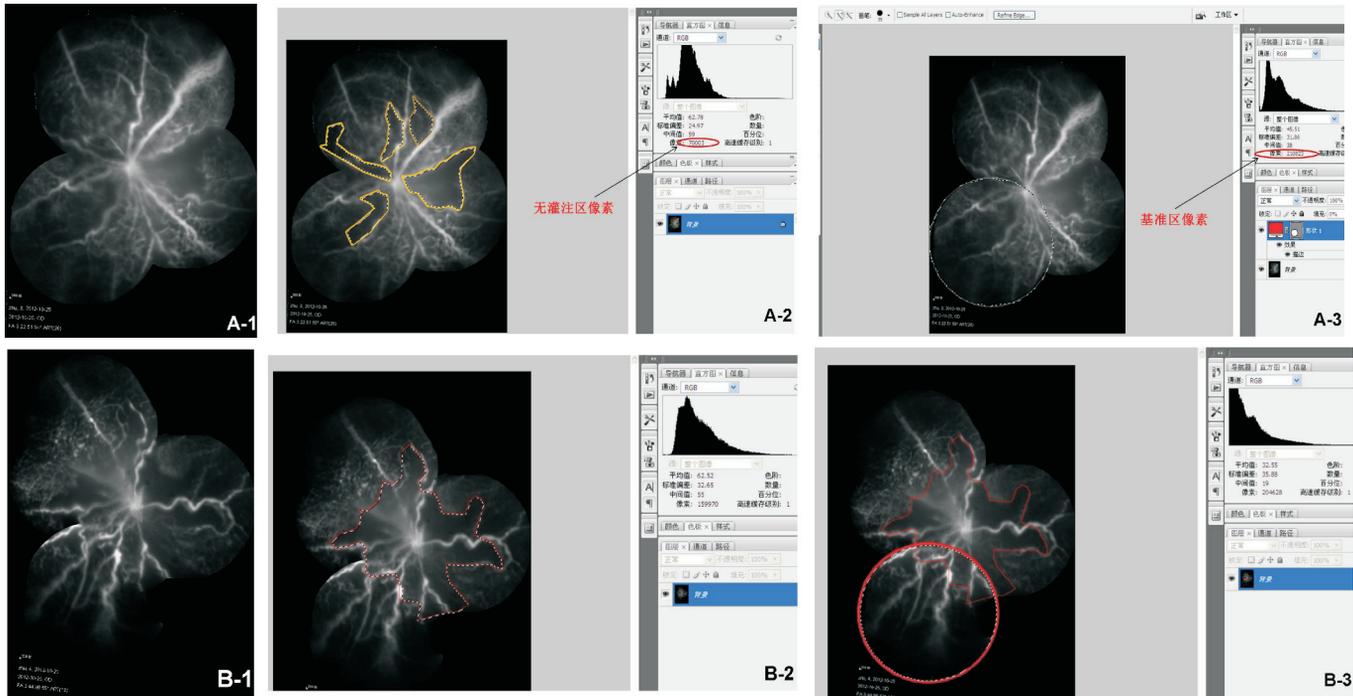


图3 两组小鼠 FFA 法视网膜无灌注区面积比较 A1:A 组视网膜代表图;A2,A3:A 组测量步骤;B1:B 组视网膜代表图;B2,B3:B 组测量步骤。

小鼠在 P17 时,视网膜无灌注区面积比为 0.65 ± 0.02 ,A 组小鼠为 0.42 ± 0.03 ,两组相比,B 组 > A 组,差异均有统计学意义 ($t = 15.30, P < 0.05$,图 3,4),统计结果与 FITC-Dextran 灌注、视网膜铺片的分析结果趋于一致。

2.3 FITC-Dextran 法与 FFA 法之间的比较 对采用两种实验方法获得的 A 组的视网膜无灌注区面积的结果进行统计学比较,组间差异无统计学意义 ($t = -1.70, P > 0.05$);同样,对两种方法获得的 B 组测量结果进行比较,组间差异也无统计学意义 ($t = 0.61, P > 0.05$)。提示 FFA 结合图像分析软件对视网膜无灌注区的定量分析结果与 FITC-Dextran 灌注结合视网膜铺片的测量结果有良好的可比性。

3 讨论

FFA 是将能产生荧光效应的染料快速注入血管,同时应用加有滤色片的眼底镜或眼底照相机进行观察或照像的一种检查法。由于染料随血流运行时可动态地勾勒出血管的形态,加上荧光现象,提高了血管的对比度和可见性,使一些细微的血管变化得以辨认,而且利用荧光眼底照相机连续拍照,使眼底检查结果更客观、准确和动态,从而为眼底病的临床诊断、疗效观察、预后评价以及探讨发病机制等提供有价值的依据。近年来,FFA 在 ROP 的筛查中也得到应用。婴幼儿眼底照相系统 RetCam 辅助 FFA 检查可发现间接检眼镜不能发现的一些细微的血管病理学改变,如毛细血管扩张、无灌注区大小和新生血管渗漏情况等。因此,FFA 是更为客观地评价 ROP 疾病分期和分区的方法。另外,在 FFA 上还可以清晰地观察到病变的消退,对于判断 ROP 的预后也十分重要^[4-5]。

在 OIR 动物模型中,FFA 具有很高的应用价值。它可以在活体状态下观察到扩张和迂曲的视网膜血管以及无灌注区,对视网膜血管病变可进行动态观察^[6-7]。但是,由于对周边视网膜观察困难、眼底照相技术要求较高

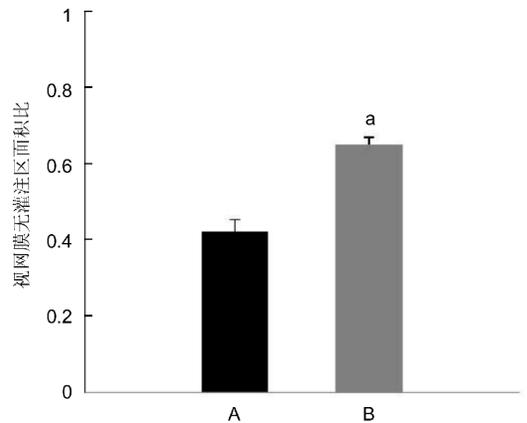


图4 两组小鼠 FFA 法视网膜无灌注区面积统计分析图 ^a $P < 0.05$ vs A 组。

和缺乏精准的定量标准等,在基础研究中 FFA 有被 FITC-Dextran 灌注^[8]和 Lectin 视网膜血管染色取代的趋势。虽然目前这些观察和检测方法在 OIR 模型中使用广泛,然而它们也存在一些不足与局限性。例如,FITC-Dextran 灌注需要多次练习,初学者容易因操作失误或不当造成视网膜血管的灌注不良,从而造成无灌注区的假阴性染色结果;同时灌注染料 FITC-Dextran 也十分昂贵,视网膜铺片需要牺牲大量动物,因此,实验所需动物样本量较大时,一些经费不足的实验室难以承受。Lectin 血管染色是对视网膜表面的所有血管组织进行染色,在我们以往的实验中发现 Lectin 染色的视网膜无血管区面积较 FITC-Dextran 灌注小,且新生血管团的数量也有所增加,表明在染色过程中 Lectin 对已经闭塞的血管及新生血管团的假阳性染色较多,且染色背景较强,结果可信度稍差。

在小鼠的 OIR 模型中,视网膜血管无灌注区集中于视盘周围,新生血管主要集中于无灌注区周围。在小鼠出

生后17d时,视网膜无灌注区及新生血管面积达到最大化^[1,3]。我们应用FFA对小鼠OIR进行观察,采用广角镜头可以完全捕获视网膜中心的无灌注区。运用软件拼图后测量无灌注区像素,利用无灌注区像素与一个造影采图视野的像素的比值就可以计算出无灌注区面积的相对大小。即使每只小鼠或者一只小鼠不同发育阶段的视网膜大小不同,有时不能获得整个视网膜的图像,采用上述方法,我们也可以准确计算出视网膜血管无灌注区的相对面积,从而对不同组别的实验结果进行比较。

在本研究中,A和B两组小鼠的FFA中视网膜无灌注区面积统计结果与FITC-Dextran取得的结果趋于一致,说明在OIR模型中应用这两种血管灌注方法均较为可靠。两种方法间的微小差异可能与小鼠的个体差异、实验操作不同等有关。从伦理学和经济学角度上讲,减少使用实验动物的数量很有必要。FFA能够在活体上进行观察和测量,所用荧光素钠价格相对低廉,不仅能动态观察每只动物的视网膜血管变化情况,减少个体差异带来的实验误差,还能节省实验费用。因此,在有条件的单位应用FFA结合图像定量分析对OIR病变进行评估也是一种行之有效的办法。

参考文献

- 1 Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen - induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(1):101-111
- 2 Li R, Huang T, Zhu T. Inhibitory effect of discoidin domain receptor 2 (DDR2) on oxygen-induced retinopathy in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014[Epub ahead of print]
- 3 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. *Nat Protoc* 2009;4(11):1565-1573
- 4 Ng EY, Lanigan B, O'Keefe M. Fundus fluorescein angiography in the screening for and management of retinopathy of prematurity. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2006;43(2):85-90
- 5 Purcaro V, Baldascino A, Papacci P, et al. Fluorescein angiography and retinal vascular development in premature infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(Suppl 3):53-56
- 6 McLeod DS, D'Anna SA, Luttly GA. Clinical and histopathologic features of canine oxygen - induced proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(10):1918-1932
- 7 Penn JS, Johnson BD. Fluorescein angiography as a means of assessing retinal vascular pathology in oxygen-exposed newborn rats. *Curr Eye Res* 1993;12(6):561-570
- 8 D'Amato R, Wesolowski E, Smith LE. Microscopic visualization of the retina by angiography with high - molecular - weight fluorescein - labeled dextrans in the mouse. *Microvasc Res* 1993;46(2):135-142