

年龄相关性黄斑变性的动物模型研究进展

王彤森^{1,2}, 秦波²

引用:王彤森,秦波. 年龄相关性黄斑变性的动物模型研究进展. 国际眼科杂志 2019;19(4):586-591

基金项目:广东省科技计划项目(No.20170211);深圳市卫生计生系统科研项目(No.SZLY2017027)

作者单位:¹(518061)中国广东省深圳市,深圳大学;²(518040)中国广东省深圳市,暨南大学附属深圳眼科医院 深圳大学视光学院 深圳眼科学重点实验室 深圳眼外伤治疗与干细胞定向分化公共服务平台

作者简介:王彤森,在读硕士研究生,研究方向:眼外伤、眼底病。
通讯作者:秦波,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:眼外伤、眼底病.qinbozf@163.com

收稿日期:2018-10-29 修回日期:2019-02-27

摘要

年龄相关性黄斑变性(ARMD)是当代世界65岁以上人群视力丧失的主要原因。对ARMD有效治疗方法的研究需求促进了多种动物模型的发展。ARMD是一种复杂的异质性疾病,涉及遗传、年龄和环境因素等多种危险因素的相互作用。动物模型重建了ARMD的许多组织学特征,使人们对该疾病潜在病理机制的深入了解成为可能。尽管没有一种模型能复制出人类ARMD的所有表型,但可通过表达ARMD的不同特征,揭示ARMD发展过程中慢性氧化损伤、炎症、免疫失调和脂质代谢的作用。本文将对已报道的多种ARMD动物模型进行综述,通过对各模型优势和局限性的分析,为选取合适的动物模型进行相应研究提供一定的帮助,并提供新的造模思路。

关键词:啮齿动物模型;年龄相关性黄斑变性;动物实验

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.4.13

Progress in animal models of age-related macular degeneration

Tong-Miao Wang^{1,2}, Bo Qin²

Foundation items: Guangdong Science and Technology Plan Project (No.20170211); Shenzhen Health and Family Planning System Research Project (No.SZLY2017027)

¹Shenzhen University, Shenzhen 518061, Guangdong Province, China; ²Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University; College of Optometry of Shenzhen University; Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology; Shenzhen City Public Service Platform of Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Correspondence to: Bo Qin. Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University; College of Optometry of Shenzhen University; Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology; Shenzhen City Public

Service Platform of Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. qinbozf@163.com

Received:2018-10-29 Accepted:2019-02-27

Abstract

• Age related macular degeneration (ARMD) is the leading cause of blindness in people over 65 years of age. The need for research on effective treatments of ARMD has led to the development of multiple animal models. ARMD is a complex process involving interaction of age, genetic and environmental factors. Animal models have reconstructed many of the histological features in ARMD, making it possible to better understand the underlying pathogenesis of the disease. Although no model can replicate all the phenotypes of human ARMD, it can express different characteristics of ARMD, revealing the roles of chronic oxidative damage, inflammation, immune dysregulation and lipid metabolism in the development of ARMD. This article will review the various ARMD animal models that have been reported. By analyzing the advantages and limitations of each model, it will provide some help for the selection of appropriate animal models for ARMD research and provide new modeling ideas.

• **KEYWORDS:** rodent model; age-related macular degeneration; animal experiment

Citation: Wang TM, Qin B. Progress in animal models of age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019; 19(4):586-591

0 引言

年龄相关性黄斑变性(ARMD)是一种异质性疾病,主要表现为黄斑区的色素性改变和视网膜下沉积物,即玻璃膜疣。随病程的进展,ARMD可发展为“干性”(萎缩型),表现为视网膜色素上皮(RPE)、脉络膜毛细血管和光感受器的地图样萎缩,或发展为进展更迅速的“湿性”(渗出型),表现为新生血管从脉络膜侵入并穿透Bruch膜,导致血管渗漏、出血和瘢痕形成^[1]。干性ARMD更为常见,而湿性ARMD脉络膜新血管形成(CNV)是患者严重视力丧失的主要原因。

准确的疾病动物模型可极大地帮助研发新疗法。目前已成功建立了多种ARMD动物模型,并已揭示该疾病潜在的多种重要病理学机制。尽管许多模型模拟出了ARMD的一些重要病理特征,但尚无一种模型能复制其所有表型。啮齿类动物模型的优势在于成本低、实验周期短、遗传操作相对容易。本文旨在提供关于ARMD啮齿

类动物模型的全面和最新报道。

1 干性黄斑变性的啮齿动物模型

1.1 补体因子途径 补体因子 H (CFH) 基因的多态性与 ARMD 风险增加有关^[2]。CFH 是 Bruch 膜 (BM) 中补体旁路途径中重要的抑制剂,其不同氧化还原形式在预防 ARMD 中具有双重作用^[3]。其他补体因子(如因子 B、C2、C3)的多态性也与 ARMD 发生发展过程中的保护性或易感性有关^[4]。

1.1.1 Cfh^{-/-}小鼠 CFH 在旁路途径中起重要的调节作用,其功能缺失将导致旁路途径失调,从而使全身 C3 水平降低、肾小球基底膜中 C3 沉积,最终导致膜增生性肾小球肾炎 (MPGN) II 型。同时,这些患者的眼底表现出类似 ARMD 的黄斑玻璃膜疣^[5]。经基因工程改造的缺乏 CFH 的小鼠也会出现 MPGN 及类似于 ARMD 的视网膜异常^[6]。这些动物两岁时出现视力下降、与视杆细胞有关的 ERG a-和 b-波反应降低、视网膜下自发荧光增加、视网膜内补体沉积和光感受器外节解体。

1.1.2 转基因 CFH Y402H 小鼠 为进一步阐明 CFH 突变导致 ARMD 的机制,构建了人 ApoE 启动子调控下表达 Y402H 多态性的转基因小鼠品系^[7]。ApoE 基因编码用于脂质转运的载脂蛋白 E。该动物模型 1 岁时眼底较野生型或 Cfh^{-/-}小鼠相比,出现的玻璃膜疣样沉积物更多。免疫组织化学显示视网膜下小胶质细胞和巨噬细胞数量增加,电子显微镜显示 Bruch 膜增厚、基底膜 C3d 沉积。与 Cfh^{-/-}小鼠相比,转基因 CFH Y402H 小鼠未出现光感受器萎缩,可能由于 CFH 蛋白存在部分功能活性,阻止旁路途径进一步失调。

1.1.3 过表达 C3 转基因小鼠 补体因子 C3 通过整合来自 3 个不同激活途径的信号在补体激活中起关键作用。用表达 C3 的腺病毒转染的小鼠在 CMV 启动子的调节下高表达 C3^[8]。病毒注射区域附近可观察到 ARMD 的几种特征,包括 RPE 的破坏、补体的沉积和光感受器外节的萎缩。该模型可用于评估补体在视网膜病理学中的作用以及研发与补体激活相关的视网膜疾病的抗补体疗法。然而,与注射 GFP 载体的动物相比,C3 过表达动物视网膜脱离的发生率增加,这可能与腺病毒本身对病理特征的影响有关。

1.1.4 C3a 和 C5a 受体^{-/-}小鼠 已在玻璃膜疣中发现补体成分 C3 和 C5。它们除了具有调理和形成膜攻击复合物的作用外,还可通过激活内源性受体引发其他生物效应。缺乏 C3a 或 C5a 受体的小鼠在激光诱导形成的 CNV 模型(下文描述)中具有损伤更小、VEGF 表达水平降低、白细胞募集受损的特点^[9]。

1.1.5 5XFAD 小鼠 5XFAD 小鼠是一种阿尔茨海默病 (AD) 的动物模型,具有 5 个家族性 AD 突变。老年 5XFAD 小鼠出现血-视网膜屏障破坏与 A β 积累,表现出与干性 ARMD 一致的超微结构变化,包括 RPE 顶端微绒毛丧失、Bruch 膜增厚、基底层状和线性沉积物、脂褐素颗粒的积累^[10]。另外,A β 是玻璃膜疣的组成成分,是补体系统的已知激活剂^[11]。5XFAD 小鼠可用于研究 A β 相关病理学并开发新的治疗方法。

1.2 趋化因子 趋化因子是一组介导白细胞迁移的小分子量蛋白,既可促进炎症进展,又可维持内环境稳态,根据

其半胱氨酸残基分为 4 个家族:CXC、CX3C、CC 和 C^[12]。已用这些配体/受体的基因敲除小鼠创建了具有 ARMD 特征的多种动物模型。趋化因子受体是 G 蛋白耦连受体,可介导不同第二信使的信号传导使炎症细胞靶向募集。特别是 CCL2/CCR2 和 CX3CL1/CX3CR1 配体/受体对,分别通过影响巨噬细胞和小胶质细胞的趋化聚集作用参与 ARMD 的发生。

1.2.1 Ccl2^{-/-}和 Ccr2^{-/-}小鼠 Ccl2 也称单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1),介导单核细胞与血管的结合使组织外渗^[13]。氧化应激可上调 RPE 细胞 Ccl2 的表达。已发现缺乏 CC-配体 (Ccl2^{-/-}) 或受体 (Ccr2^{-/-}) 的小鼠具有 ARMD 的特征。这些动物在 9mo 后出现视网膜下玻璃膜疣样聚集、Bruch 膜增厚、自发荧光和脂褐素颗粒增加、光感受器功能障碍和 CNV^[14]。这说明吞噬清除的功能失调可能在 ARMD 中发挥关键作用。该模型对激光诱导形成 CNV 不敏感。

1.2.2 Cx3cr1^{-/-}小鼠 配体 CX3CL1 在视网膜内皮细胞、Muller 和神经节细胞中高表达,其受体 Cx3cr1 仅在视网膜小胶质细胞表达。两个独立的 Cx3cr1 缺陷小鼠的研究实验^[15-16] 都发现了与 ARMD 一致的改变。Cx3cr1^{-/-}小鼠 12mo 时出现玻璃膜疣样沉积物,这些沉积物由视网膜下充满脂质的小胶质细胞积聚而成。与野生型相比,Cx3cr1^{-/-}小鼠 18mo 时视网膜显著变薄(40%)。视网膜小胶质细胞 CX3CL1 功能的缺乏使其从视网膜中流出障碍,从而导致视网膜下沉积物的形成。

1.2.3 Ccl2^{-/-}Cx3cr1^{-/-}双基因敲除小鼠 单基因敲除小鼠直到老龄(分别为 16mo 和 18mo)才表现出 ARMD 的一些特征,且表型不完全。为明确 Ccl2 和 Cx3cr1 丢失是否具有协同效应,建立了 Ccl2^{-/-}Cx3cr1^{-/-}双基因敲除小鼠模型^[17]。与单基因敲除模型相比,联合 Ccl2^{-/-}Cx3cr1^{-/-}小鼠早在 6wk 即出现视网膜变化,并随着年龄增长逐渐增大,为研究提供了更便利的模型。免疫染色显示 Bruch 膜、RPE 和脉络膜毛细血管的补体水平增加^[18]。此外,双基因敲除小鼠出现 Bruch 膜局部增厚、A2E 水平增加、小胶质细胞浸润和光感受器萎缩。老龄动物中可观察到萎缩区和脉络膜视网膜瘢痕。约 15% 的模型眼中 CNV 最早出现在第 12wk。

1.3 氧化损伤模型 许多证据表明,氧化损伤可能在 ARMD 的发展中起作用。视网膜由于高代谢需求、高浓度的可氧化多不饱和脂肪酸及光敏分子(如视紫红质或脂褐素)的存在而特别容易受到氧化损伤^[19]。

1.3.1 用羧乙基吡咯加合蛋白进行免疫 二十二碳六烯酸 (DHA, 视网膜中最常见的脂肪酸之一) 的氧化可形成羧乙基吡咯 (CEP) 加合蛋白。这些修饰蛋白存在于玻璃膜疣中,ARMD 眼组织中血浆 CEP 加合蛋白水平更高,且存在抗 CEP 抗体^[20]。为验证氧化损伤产生的 CEP 与 ARMD 炎症的因果关系,Hollyfield 等用 CEP 加合的小鼠血清蛋白免疫小鼠模型,并将动物分为两组:短期组接受 3mo 强免疫应激,长期组接受 1a 弱免疫应激^[21]。结果两组都出现了抗 CEP 抗体。短期组 3mo 时出现 Bruch 膜补体 C3d 的沉积、RPE 下沉积物、RPE 肿胀和裂解、巨噬细胞的侵袭和光感受器的固缩。长期组 Bruch 膜增厚 3~5 倍。病理改变的严重程度与 CEP 特异性抗体水平相关。

两组小鼠皆未观察到新血管形成,证明该模型仅适用于干性 ARMD,对湿性 ARMD 不适用。该模型的一个优点是不需要基因操作或极端光照条件。

1.3.2 血浆铜蓝蛋白/亚铁氧化酶双基因敲除小鼠模型

铁是氧化应激的有效产生者,其体内水平随衰老而增加。铜蓝蛋白是一种铁氧化酶,介导铁的胞外运输。患有铜蓝蛋白血症的人因缺乏功能性铜蓝蛋白会出现玻璃膜疣和视网膜色素性改变^[22]。缺乏血浆铜蓝蛋白的小鼠仅表现出轻微的视网膜变化,可能由于第二种铁氧化酶-亚铁氧化酶弥补部分损失^[23]。为分析铁超负荷对 ARMD 病理过程的潜在影响,建立了缺乏血浆铜蓝蛋白和亚铁氧化酶的小鼠模型。这些动物在 6~9mo 后,局部中周视网膜出现了 RPE 肥大和色素减退、视网膜下沉积物、光感受器萎缩和视网膜下新生血管形成。第 12mo 时小鼠表现出巨噬细胞浸润、局部区域高自发荧光和补体沉积^[24]。该模型的局限性在于大多数双基因敲除动物早期死于运动相关疾病,这限制了对衰老小鼠长期效应的研究。

1.3.3 SOD1^{-/-}小鼠

超氧化物歧化酶(SOD)是一种强抗氧化剂,有三种表达形式,其中 SOD1 在视网膜含量最高,主要位于细胞质。SOD1^{-/-}小鼠 7mo 前的视网膜与野生型无差别。7mo 后,其 RPE 和 Bruch 膜间出现黄色玻璃膜疣样沉积物,用玻璃膜疣的生物标志物染色后证明其包括:玻连蛋白、羧甲基赖氨酸和组织抑制剂金属蛋白酶 3 (TIMP3)^[25]。有证据表明,RPE 的氧化损伤、Bruch 的增厚以及光照暴露以剂量依赖方式加速玻璃膜疣的出现。大约 10% 的 SOD1^{-/-}小鼠通过眼底检查或组织学证实 CNV 的存在^[26]。SOD1^{-/-}小鼠是研究活性氧物种介导的视网膜变性较好的模型系统。

1.3.4 SOD2^{-/-}和 SOD2 敲低小鼠

SOD2 基因的多态性与 ARMD 发病风险增加有关。然而,SOD2^{-/-}小鼠出生后很快死于扩张型心肌病的缺点限制了它们作为 ARMD 模型的应用。少数存活至 3wk 的动物视网膜组织表现为内层视网膜变薄和线粒体功能障碍^[27]。为研究 SOD2 对视网膜功能的影响,Justilien 等创建了一种小鼠模型,其视网膜和 RPE 被腺病毒转染可表达降解 SOD2 的核酶。这些小鼠出现氧化损伤标志物的增加,组织学显示 Bruch 膜增厚、RPE 变性、自发荧光增加、A2E 水平升高和光感受器萎缩。然而,该模型中未观察到 CNV 的出现^[28]。

1.3.5 吸烟/氢醌

香烟烟雾中含有许多促氧化剂,如一氧化氮、一氧化碳和氢醌。吸烟是 ARMD 最重要的可预防性风险因素^[29]。已经在若干动物模型中研究了香烟烟雾诱导或加重 ARMD 的作用,以及蓝光和高脂肪饮食的氧化附加风险。Espinosa-Heidmann 等发现暴露于整支香烟烟雾或食物中添加氢醌的小鼠表现出基底层状沉积物、Bruch 膜弥漫性增厚和脉络膜毛细血管内皮肥大,提示烟雾相关氧化剂可能是脉络膜毛细血管和 RPE 的另一种氧化损伤刺激物,这可解释吸烟与早期 ARMD 之间的关联^[30]。饮食中添加氢醌的野生型小鼠 RPE 和脉络膜中 Ccl2 的表达降低,且促血管生成的 VEGF 与抗血管生成的 PEDF 比例增加^[31]。该研究表明,氢醌可通过改变血管生长因子的平衡进一步增加 CNV 的风险。

1.4 脂质/葡萄糖代谢

长期以来人们怀疑脂质和葡萄糖代谢在 ARMD 的发展中起作用。随着年龄的增长,脂质

和胆固醇会沉积于 Bruch 膜进而干扰 RPE 和脉络膜毛细血管间代谢物的运输,导致基底层状和线样沉积物的形成^[32]。此外,载脂蛋白的基因多态性通过参与介导脂质运输与 ARMD 的发病风险有关^[33]。下面将详细描述用于探索脂质代谢与 ARMD 之间关系的一些动物模型。

1.4.1 高血糖指数饮食模型

低血糖指数(GI)饮食与降低 ARMD 发生和发展有关。已发现晚期糖基化终产物(AGEs)是玻璃膜疣的组成组分。Uchiki 等试图确定 GI 升高饮食是否会导致动物模型中 ARMD 病变的发展^[34]。与高 GI 饮食相比,低 GI 饮食的衰老动物基底层状沉积物更少、更小,且保留更多 RPE 基底皱褶,且视网膜 AGEs 水平更低。高 GI 饮食可能由于增加了视网膜中毒性 AGEs 的沉积,加速了小鼠与年龄相关视网膜病变的出现,高 GI 喂养的 C57BL/6 小鼠可用于模拟 ARMD 的早期阶段并用于药品研发。

1.4.2 ApoE^{-/-}小鼠

ApoE 的小鼠表现出非常高的循环胆固醇水平。8mo 时组织学检查显示 Bruch 膜增厚及电致发光颗粒和膜结合物的存在,该物质与 ARMD 中的基底线性沉积物具有相似的超微结构^[35]。

1.4.3 APOEe2/e4 转基因小鼠

为了模拟和研究人类中观察到的各种 APOE 等位基因,用人类 APOE 等位基因(即 e2、e3、e4)替代小鼠 APOE 制造出转基因动物。高脂肪饮食 16mo 以上的 APOEe2 和 APOEe4 小鼠出现 Bruch 膜增厚、RPE 下沉积物及 RPE 萎缩。极端情况下,APOE4 小鼠会出现明显的脉络膜新生血管形成。饲喂高脂肪胆固醇饮食的转基因 APOEe4 小鼠出现人玻璃膜疣组分淀粉样蛋白 β (A β) 的累积。在这些动物全身使用 A β 40 和 A β 42 抗体可起到视觉保护作用,这表明 A β 参与 ARMD 的发病过程^[36]。与 APOEe2 相比,人类 APOEe4 基因在 ARMD 发病中起到相对保护性作用,而在小鼠中的作用似乎是相反的^[36-37]。目前尚不清楚不同物种间存在这种差异的原因。

1.4.4 APOB100 转基因小鼠+高脂肪饮食

载脂蛋白 B100(APOB100)是低密度脂蛋白(LDL)的主要载脂蛋白。Bruch 膜中的脂蛋白颗粒含有 APOB100。为研究 APOB100 在 ARMD 脂蛋白沉积物中的作用,一些研究小组建立了表达人型 APOB100 的小鼠。饲喂高脂肪饮食并暴露于蓝绿光的年轻 APOB100 小鼠出现了基底层状沉积物。老龄 APOB100 小鼠饲喂正常饮食后出现 Bruch 膜增厚、RPE 基底折叠消失及基底层状沉积物^[38]。额外饲喂高脂肪饮食时可加剧表型变化,出现基底线性沉积物。产生 APOB100 脂蛋白的小鼠仅出现 Bruch 膜的改变,不会出现玻璃膜疣^[39]。

1.4.5 Ldl 受体^{-/-}小鼠+高脂肪饮食

Ldl 受体^{-/-}小鼠由于不能胞内转运胆固醇,导致血浆胆固醇水平升高及 Bruch 膜中膜半透明颗粒增加^[40]。饲喂高脂肪饮食导致 Bruch 膜的进一步增厚,且与 RPE 和外层视网膜中促血管生成因子 VEGF 的表达增加相关。

1.4.6 Vldl 受体^{-/-}小鼠

编码极低密度脂蛋白(VLDL)受体的基因突变纯合子小鼠不会出现血脂异常,但从 2 周龄开始出现视网膜新生血管。这些血管向视网膜下腔生长,1~2mo 可形成脉络膜血管吻合或引起视网膜出血。对该模型的进一步研究证实了 CNV 的形成、VEGF 水平的升高

和 Wnt 途径的失调^[41]。这些发现表明 VLDL 受体对 CNV 起负调节作用。因此, VLDL 受体的调节可作为 ARMD 治疗的新途径。

1.4.7 CD36^{-/-}小鼠 CD36 是氧化低密度脂蛋白 (OxLDL) 的清道夫受体, 在 RPE 顶端和基底外侧膜中表达。CD36 缺乏的小鼠饲喂常规饮食也会出现视网膜下 OxLDL 累积。这些动物表现出 Bruch 膜增厚, 与 ApoE^{-/-} Cd36^{-/-} 双敲除小鼠杂交产生 ApoE^{-/-} 时, 这种症状会加重。还报道了 CD36^{-/-} 小鼠出现年龄依赖性脉络膜退化, 其可能继发于 COX2 (VEGF 上游激活剂) 的下调^[42]。

1.4.8 Mcd/mcd 小鼠 (转基因突变体组织蛋白酶 D) 组织蛋白酶 D 是一种天冬氨酸蛋白酶, 在 RPE 中高度表达并在光感受器外节的降解中起重要作用, 其以酶原的形式分泌, 需进一步翻译加工后活化。非活性形式组织蛋白酶原 D 的积累与 RPE 功能障碍有关^[43]。为了研究其积聚对光感受器的影响, 建造了表达突变型组织蛋白酶 (mcd) 的转基因小鼠。转基因的纯合小鼠 (mcd/mcd) 9mo 时出现 RPE 萎缩区^[44]。10~18mo 出现 RPE 肥大区、光感受器萎缩和 ERG 减少。另外, 这些动物眼底可观察到黄色斑点, 组织学上与基底层状及线性沉积物相似, 自发荧光成像表现出类似脂褐素沉积的高自发荧光区域。与 mcd1/mcd1 小鼠相比, mcd2/mcd2 小鼠可表达更高水平的无活性组织蛋白酶原, 且时间更早 (3mo 即出现)^[45]。

1.5 ARMD 的其他啮齿动物模型

1.5.1 快速衰老小鼠 快速衰老小鼠 (SAM) 模型最初由选择性繁殖用于快速衰老的 AKR/J 小鼠衍变而来。随后扩增至 9 个衰老易感系 (SAMP) 和 4 个衰老抵抗系 (SAMR)。表型特征因品系而异, 但 SAMP 系动物的共同点为早期即出现老年淀粉样变性、骨质疏松症、退行性关节炎、白内障、听力障碍和脑萎缩, 并伴有学习和记忆缺陷^[46]。已显示 SAMP1 小鼠表现出 Bruch 膜的增厚和 RPE 变化, 包括基底层皱褶的肿胀和脂褐素颗粒的累积。10mo 的 SAMP8 小鼠出现 Bruch 膜增厚、RPE 下基底层状沉积物、基底状沉积物和 Bruch 膜内小区域的新生血管^[46]。

1.5.2 导致黄斑营养不良的单基因突变 已构建了一些由单个基因突变引起的遗传性黄斑营养不良的动物模型, 并将其用作 ARMD 的研究模型。其中包括 Timp3^{-/-} 小鼠 (Sorsby 眼底营养不良模型)、Aber^{-/-} 小鼠 (常染色体隐性 Stargardt 病模型)、ELOVL4 转基因小鼠 (常染色体显性 Stargardt 病模型) 和 fibulin-3 转基因小鼠 (人 EFEMP1 突变模型)。

2 湿性黄斑变性的啮齿动物模型

2.1 激光诱导 CNV 1989 年 Dobi 等^[47] 首次使用 647nm 氦激光 (100 μ m, 50~160mW, 0.1s) 建立了大鼠模型。他们对诱导产生 CNV 所需功率的初步观察结果至今仍有参考意义: 不足以产生 Bruch 膜断裂的灼烧 (60mW) 不会引起 CNV; 灼烧过强 (130mW 及以上) 导致大量脉络膜出血, 最终的无血管瘢痕不会引起 CNV; 产生白色凝固斑伴中央气泡形成的灼烧 (研究中为 120mW), 无论有无相关出血, 都可诱导 Bruch 膜的破裂并产生 CNV。1998 年第一只小鼠模型由 Tobe 等^[48] 建立, 同样使用氦激光 (50 μ m, 350~400mW, 0.05s) 在视网膜后极部进行 3 次灼烧, 2wk

时 87% 的小鼠灼烧区出现 CNV。该作者指出, 有气泡形成的灼烧中 CNV 形成率较高 (气泡表示 Bruch 膜的破裂)。

激光诱导 CNV 的发展阶段: 早期膜形成、成熟纤维血管网的建立和退化^[49]。小鼠和大鼠激光后 CNV 的形成过程相似, 早期病变出现在第 1wk, 大多数研究中成熟 CNV 出现在第 10~14d^[48, 50]。啮齿动物激光损伤模型是一种急性炎症损伤模型, 不是长期衰老变性和慢性炎症的结果, 其发病机制与人眼 ARMD 有所不同, 且激光光凝对神经视网膜造成的损害程度显著大于人类 ARMD 的典型损伤, 目前尚不知道此会在何种程度上改变实验性 CNV 的周围环境。

2.2 视网膜下注射诱导 CNV 在视网膜神经上皮层和 RPE 之间注射促血管生成物质, 注射对 RPE 造成的干扰联合血管生成因子的共同作用, 可形成延伸至视网膜下腔的 CNV^[52]。

2.2.1 视网膜下基质胶注射液 基质胶 (matrigel) 是由 Engelbreth-Holm-Swarm 小鼠肉瘤细胞分泌的细胞外基质蛋白混合物, 包括 FGF-2 在内的各种生长因子。该混合物在 4 $^{\circ}$ C 时为液态, 并在 24 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C (体内注射) 时固化, 其固体形式可有效捕获生长因子并使其缓慢释放^[52]。通过小鼠周边眼底视网膜下注射基质胶, 在 Ccl2 缺陷小鼠和野生型小鼠中诱导形成 CNV, 并观察到 RPE 和光感受器变性、RPE 细胞迁移^[53]。在 RPE 和视网膜神经层间注入基质胶后, RPE 细胞穿过沉积物迁移以重建与光感受器的联系, 产生 RPE 下沉积物, 随后来自脉络膜的新生血管穿透 Bruch 膜形成 CNV^[52], 这证明了在预防 CNV 方面 RPE 和 Bruch 膜之间的必要联系。

2.2.2 视网膜下 VEGF 基因治疗 VEGF 在眼内血管生成中的核心作用已得到证明。RPE 是 VEGF 的主要分泌者, 其功能障碍在 CNV 的发病机制中起关键作用。2000 年 Baffi^[54] 和 Spilisbury 等^[55] 通过视网膜下注射表达 VEGF 的腺病毒载体, 建立了各自的 CNV 大鼠模型。两组均在注射后 4wk 通过血管造影和组织学检测到 CNV 的形成, 且经组织学检测第 80d 仍可观察到新生血管复合物。

转基因小鼠阐明了视网膜下注射的重要性。在诱导 RPE 表达 VEGF 增加的 rho/VEGF 小鼠及 VMD2/VEGF 小鼠中, 可观察到来自视网膜深层毛细血管的新生血管延伸、破坏 RPE^[56], 但未观察到 CNV 的形成。当破坏 RPE 的完整性后再视网膜下注射裸腺病毒载体, 可观察到 CNV 的形成^[57]。另外, Schmack 等^[58] 发现视网膜下注射 RPE 细胞可诱导 CNV 形成, 他们把这归于注射的 RPE 可产生 VEGF 及注射过程中对 RPE 造成的机械性损伤。值得注意的是, 他们在视网膜下注射对照物质的眼底发现了 CNV, 尽管其程度较轻。

2.2.3 视网膜下注射巨噬细胞和脂质过氧化物与聚乙二醇 巨噬细胞是 CNV 形成中重要的细胞参与者, 可分泌多种血管生成相关因子。Jo 等^[59] 通过对 C57BL/6 或 Ccl2 基因敲除小鼠行视网膜下巨噬细胞注射研究 CNV 的纤维化特征, 发现实验模型中 CNV 与纤维化共存。

Baba 等^[60] 将视网膜下注射脂质过氧化物 (HpODE) 用于大鼠模型, 观察到光感受器变性、载脂巨噬细胞、RPE 细胞和 CNV。他们试图排除视网膜下注射时 Bruch 膜破

裂的动物,并假定 HpODE 诱导 RPE、内皮细胞及炎症细胞分泌蛋白酶损伤 Bruch 膜。他们的观察结果强调了对 Bruch 膜干扰和持续刺激对新血管形成的必要性。

Lyzogubov 等^[61]视网膜下注射聚乙二醇(PEG)-8 创建了 CNV 新模型。在该模型中,PEG-8 注射诱导补体级联反应的激活和剂量依赖性 CNV 产生,并持续存在至最后研究时间点(第 42d)。

3 小结

目前,啮齿动物模型已能够重建 ARMD 的许多组织学特征,共同帮助发现如遗传多态性氧化损伤、脂质和碳水化合物代谢以及补体失调等不同病理机制的作用。啮齿动物 ARMD 模型由于缺乏黄斑结构而具有一定局限性,这可能解释了为什么没能从这些模型中观察到 ARMD 从早期到晚期的演变过程。然而毫无疑问的是,随着对 ARMD 遗传和环境因素新见解的出现,及对潜在病理机制理解程度的增加,啮齿动物模型将继续在 ARMD 模型中保持前沿地位,并将能更准确地重建疾病的组织和功能学改变,从而成为测试新疗法的更优化平台。

参考文献

- 1 Coleman HRM, Chan CM, Ferris FLM, *et al.* Age-related macular degeneration. *Lancet* 2008;372(9652):1835-1845
- 2 Dong HT, Zhang JX, Li QM, *et al.* Clinical study of the correlation between complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Genet Mol Res* 2016;15(3)
- 3 Krilis M, Qi M, Qi J, *et al.* Dual roles of different redox forms of complement factor H in protecting against age related macular degeneration. *Free Radic Biol Med* 2018;129:237-246
- 4 Kim S. Association of polymorphisms in C2, CFB and C3 with exudative age-related macular degeneration in a Korean population. *Exp Eye Res* 2012;96(1):42-47
- 5 Pickering MC, Cook HT. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Renal diseases associated with complement factor H: novel insights from humans and animals. *Clin Exp Immunol* 2008;151(2):210-230
- 6 Ufret-Vincenty RL, Aredo B, Liu X, *et al.* Transgenic mice expressing variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(11):5878
- 7 Cashman SM, Desai A, Ramo K, *et al.* Expression of complement component 3 (C3) from an adenovirus leads to pathology in the murine retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3436
- 8 Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, *et al.* Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(7):2328-2333
- 9 Park SW, Im S, Jun HO, *et al.* Dry age-related macular degeneration like pathology in aged 5XFAD mice: Ultrastructure and microarray analysis. *Oncotarget* 2017;8(25):40006
- 10 Anderson DH, Talaga KC, Rivest AJ, *et al.* Characterization of beta amyloid assemblies in drusen; the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2004;78(2):243-256
- 11 Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity* 2000;12(2):121-127
- 12 Schober A, Zernecke A, Liehn EA, *et al.* Crucial Role of the CCL2/CCR2 Axis in Neointimal Hyperplasia After Arterial Injury in Hyperlipidemic Mice Involves Early Monocyte Recruitment and CCL2 Presentation on Platelets. *Circ Res* 2004;95(11):1125-1133
- 13 Ambati J, Sakurai E, Lynn BC, *et al.* An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 2003;9(11):1390-1397

- 14 Combadière C. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 2003;107(7):1009-1016
- 15 Jung S, Aliberti J, Graemmel P, *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000;20(11):4106
- 16 Chan C. Ccl2/Cx3cr1-deficient mice: an animal model for age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res* 2008;40(3-4):124-128
- 17 Ross RJ, Zhou M, Shen D, *et al.* Immunological protein expression profile in Ccl2/Cx3cr1 deficient mice with lesions similar to age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2008;86(4):675-683
- 18 Cai J. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* 2000;19(2):205-221
- 19 Gu X, Meer SG, Miyagi M, *et al.* Carboxyethylpyrrole Protein Adducts and Autoantibodies, Biomarkers for Age-related Macular Degeneration. *J Biol Chem* 2003;278(43):42027-42035
- 20 Hollyfield JG, Perez VL, Salomon RG. A Hapten Generated from an Oxidation Fragment of Docosahexaenoic Acid Is Sufficient to Initiate Age-Related Macular Degeneration. *Mol Neurobiol* 2010;41(2):290-298
- 21 Miyajima H, Nishimura Y, Mizoguchi K, *et al.* Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration. *Neurology* 1987;37(5):761
- 22 Jeong SY, David S. Age-Related Changes in Iron Homeostasis and Cell Death in the Cerebellum of Ceruloplasmin-Deficient Mice. *J Neurosci* 2006;26(38):9810-9819
- 23 Hadziahmetovic M. Ceruloplasmin/hephaestin knockout mice model morphologic and molecular features of AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(6):2728-2736
- 24 Imamura Y, Noda S, Hashizume K, *et al.* Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: A model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103(30):11282-11287
- 25 Hashizume K. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am J Pathol* 2008;172(5):1325-1331
- 26 Sandbach JM, Coscun PE, Grossniklaus HE, *et al.* Ocular pathology in mitochondrial superoxide dismutase (Sod2)-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(10):2173-2178
- 27 Justilien V, Pang J, Renganathan K, *et al.* SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(10):4407
- 28 Klein R, Knudtson MD, Cruickshanks KJ, *et al.* Further observations on the association between smoking and the long-term incidence and progression of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2008;126(1):115-121
- 29 Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Catanuto P, *et al.* Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(2):729
- 30 Pons M, Marin-Castaño ME. Cigarette Smoke-Related Hydroquinone Dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF Expression in Retinal Pigment Epithelium *In Vitro* and *In Vivo*. *PLoS One* 2011;6(2):e16722
- 31 Curcio CA, Millican CL, Bailey T, *et al.* Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(1):265
- 32 Sun E, Lim A, Liu X, *et al.* Apolipoprotein E gene and age-related macular degeneration in a Chinese population. *Mol Vis* 2011;17:997-1002
- 33 Uchiki T, Weikel KA, Jiao W, *et al.* Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in nondiabetics). *Aging Cell* 2012;11(1):1-13

- 34 Dithmar S, Curcio CA, Le NA, *et al.* Ultrastructural changes in Bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2035-2042
- 35 Malek G, Johnson LV, Mace BE, *et al.* Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(33):11900-11905
- 36 Baird PN, Guida E, Chu DT, *et al.* The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(5):1311
- 37 Fujihara M, Bartels E, Nielsen LB, *et al.* A human apoB100 transgenic mouse expresses human apoB100 in the RPE and develops features of early AMD. *Exp Eye Res* 2009;88(6):1115-1123
- 38 Fujihara M, Cano M, Handa JT. Mice that produce ApoB100 lipoproteins in the RPE do not develop drusen yet are still a valuable experimental system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(11):7285-7295
- 39 Rudolf M, Winkler B, Aherrahou Z, *et al.* Increased expression of vascular endothelial growth factor associated with accumulation of lipids in Bruch's membrane of LDL receptor knockout mice. *Br J Ophthalmol* 2005;89(12):1627-1630
- 40 Chen Y, Hu Y, Lu K, *et al.* Very low density lipoprotein receptor, a negative regulator of the wnt signaling pathway and choroidal neovascularization. *J Biol Chem* 2007;282(47):34420-34428
- 41 Houssier M, Raoul W, Lavalette S, *et al.* CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS Med* 2008;5(2):e39
- 42 Rakoczy PE, Baines M, Kennedy CJ, *et al.* Correlation Between Autofluorescent Debris Accumulation and the Presence of Partially Processed Forms of Cathepsin D in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells Challenged with Rod Outer Segments. *Exp Eye Res* 1996;63(2):159-167
- 43 Rakoczy PE, Zhang D, Robertson T, *et al.* Progressive Age-Related Changes Similar to Age-Related Macular Degeneration in a Transgenic Mouse Model. *Am J Pathol* 2002;161(4):1515-1524
- 44 Zhang D, Brankov M, Makhija MT, *et al.* Correlation between inactive cathepsin D expression and retinal changes in mcd2/mcd2 transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(9):3031
- 45 Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of senescence. *Exp Gerontol* 1997;32(1):105-109
- 46 Majji AB, Cao J, Chang KY, *et al.* Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(12):3936
- 47 Dobi ET, Puliafito CA, Destro M. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1989;107(2):264-269
- 48 Tobe T, Ortega S, Luna JD, *et al.* Targeted Disruption of the FGF2 Gene Does Not Prevent Choroidal Neovascularization in a Murine Model. *Am J Pathol* 1998;153(5):1641-1646
- 49 Miller H, Miller B, Ishibashi T, *et al.* Pathogenesis of laser-induced choroidal subretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(5):899-908
- 50 Edelman JL, Castro MR. Quantitative image analysis of laser-induced choroidal neovascularization in rat. *Exp Eye Res* 2000;71(5):523-533
- 51 Cao J, Zhao L, Li Y, *et al.* A subretinal matrigel rat choroidal neovascularization (CNV) model and inhibition of CNV and associated inflammation and fibrosis by VEGF trap. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(11):6009
- 52 Qiu G, Stewart JM, Sadda S, *et al.* A new model of experimental subretinal neovascularization in the rabbit. *Exp Eye Res* 2006;83(1):141-152
- 53 Zhao L, Wang Z, Liu Y, *et al.* Translocation of the retinal pigment epithelium and formation of sub-retinal pigment epithelium deposit induced by subretinal deposit. *Mol Vis* 2007;13:873-880
- 54 Baffi J. Choroidal neovascularization in the rat induced by adenovirus mediated expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(11):3582-3589
- 55 Spilisbury K, Garrett KL, Shen WY, *et al.* Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 2000;157(1):135-144
- 56 Ohno-Matsui K, Hirose A, Yamamoto S, *et al.* Inducible Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Adult Mice Causes Severe Proliferative Retinopathy and Retinal Detachment. *Am J Pathol* 2002;160(2):711-719
- 57 Oshima Y, Oshima S, Nambu H, *et al.* Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2004;201(3):393-400
- 58 Schmack I, Berglin L, Nie X, *et al.* Modulation of choroidal neovascularization by subretinal injection of retinal pigment epithelium and polystyrene microbeads. *Mol Vis* 2009;15:146-161
- 59 Jo YJ, Sonoda KH, Oshima Y, *et al.* Establishment of a new animal model of focal subretinal fibrosis that resembles disciform lesion in advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6089-6095
- 60 Baba T, Bhutto IA, Merges C, *et al.* A rat model for choroidal neovascularization using subretinal lipid hydroperoxide injection. *Am J Pathol* 2010;176(6):3085-3097
- 61 Lyzogubov VV, Tytarenko RG, Liu J, *et al.* Polyethylene glycol (PEG)-induced mouse model of choroidal neovascularization. *J Biol Chem* 2011;286(18):16229-16237