

# 脉络膜新生血管基因工程小鼠模型研究

徐晓玮, 黎彪, 邵毅

引用: 徐晓玮, 黎彪, 邵毅. 脉络膜新生血管基因工程小鼠模型研究. 国际眼科杂志 2019; 19(9): 1488-1491

Received: 2019-03-11 Accepted: 2019-08-08

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81660158)

作者单位: (330006) 中国江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院眼科

作者简介: 徐晓玮, 女, 南昌大学江西医学院在读本科生, 研究方向: 角膜病、眼表疾病。

通讯作者: 邵毅, 毕业于中山大学, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 角膜病、眼表疾病. freebee99@163.com

收稿日期: 2019-03-11 修回日期: 2019-08-08

## 摘要

随着基因工程技术的不断成熟, 现有多种针对脉络膜新生血管(CNV)发展的关键因素和过程的基因工程小鼠模型, 以适应针对CNV过程不同研究要点的需求。例如针对CNV过程中关键因素血管内皮生长因子(VEGF)的VEGF<sub>164</sub> RPE65转基因、Tet/VMD2/VEGF等; ApoE过表达小鼠是年龄相关性黄斑病变中自发性CNV形成机制的重要模型; 与视网膜色素上皮(RPE)变化相关的Ccl2/Cx3cr1缺陷小鼠; 脉络膜新生血管与视网膜新生血管吻合过程可见于SOD1<sup>-/-</sup>老化、Vldlr<sup>-/-</sup>定向突变等; 继发于脉络膜新生血管的视网膜新生血管可见于Cp<sup>-/-</sup>Heph<sup>-/-</sup>敲除小鼠等。这些基因工程小鼠的主要优点为诱导快, 发生时间短; 与CNV病理生理学关联强, 可比较CNV各种生物学成分, 便于对其发生机制的研究; 与人类CNV关联密切, 为人类CNV治疗评估提供研究手段等。但其也有不足, 如诱导率低、发生CNV眼的百分率低、面积小; 常发视网膜增生性瘤性病变, 对CNV研究造成了一定干扰。研究者可根据自己的需求选择适合的模型并适当修改相应实验参数。

关键词: 脉络膜新生血管形成; 基因工程; 小鼠; 动物模型; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.9.09

## Study on choroidal neovascularization genetically engineered mice model

Xiao-Wei Xu, Biao Li, Yi Shao

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81660158)

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

Correspondence to: Yi Shao. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. freebee99@163.com

## Abstract

• With the maturity of genetic engineering technology, a variety of genetic engineering mouse models for the development of key factors and processes of choroidal neovascularization (CNV) have been adapted to meet the needs of different research points in the CNV process. For example, VEGF<sub>164</sub> RPE65 transgene, Tet/VMD2/VEGF, etc. which are key factors in the process of CNV. ApoE overexpression rats are an important model of spontaneous CNV formation in AMD-like lesions; Ccl2/Cx3cr1-deficient mice associated with changes in retinal pigment epithelial (RPE); choroidal neovascularization and retinal neovascularization can be seen in SOD1<sup>-/-</sup> aging, Vldlr<sup>-/-</sup> directed mutation, etc; retinal neovascularization secondary to choroidal neovascularization can be found in Cp<sup>-/-</sup>Heph<sup>-/-</sup> knockout mice, etc. The main advantages of the CNV genetic engineering mouse model are rapid induction and short time of occurrence; strong correlation with CNV pathophysiology, which can compare various biological components of CNV and facilitate the study of its mechanism; closely relating to human CNV, and providing research methods for human CNV treatment evaluation. However, there are also limitations, such as low induction rate, low percentage and small area of CNV; frequent occurrence of retinal angiomas hyperplasia, which interferes CNV research. Researchers might select the appropriate model according to his own needs and modify the corresponding experimental parameters as needed.

• KEYWORDS: choroidal neovascularization; gene engineering; mouse; animal models; vascular endothelial growth factor

Citation: Xu XW, Li B, Shao Y. Study on choroidal neovascularization genetically engineered mice model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(9): 1488-1491

## 0 引言

脉络膜新生血管形成(choroidal neovascularization, CNV)是许多影响视力的眼部疾病的主要病理特征, 同时还与视网膜新生血管形成及二者吻合具有密切关系。CNV动物模型的发展有助于理解这些病症的生物学特性, 也可以用于测试新疗法和发展新技术。虽然这些模型概括了CNV在人类中的许多临床表现, 但发展的时间、病程进展、病变的大小和外观在不同的模型中各不相同。通

常有三种动物模型 CNV:激光诱导型、手术诱导模型和基因工程动物。对于前两者的研究已经较为透彻,近年来随着基因工程技术的快速发展,研发出多种不同基因工程动物模型。本综述主要对几种技术成熟、应用最为广泛的基因工程动物模型 CNV 进行介绍。

## 1 CNV 发病机制

CNV 存在于许多脉络膜视网膜疾病<sup>[1]</sup>,例如年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)、糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、病理性高度近视和早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)等<sup>[2]</sup>。理解 CNV 的病理生物学对于开发适合的动物模型非常重要。CNV 代表对特定刺激的非特异性反应<sup>[3]</sup>。CNV 的动态过程(起始、维持和退化阶段)与血管生成、炎症的动态过程和蛋白水解有关<sup>[4]</sup>。CNV 的发展始于 Bruch 膜的破裂或缺陷,这可能继发于创伤性损伤<sup>[5]</sup>、退行性病变<sup>[6]</sup>、组织牵引<sup>[7]</sup>和(或)炎症<sup>[8]</sup>。CNV 发病机制的关键包括巨噬细胞和视网膜色素上皮巨噬细胞,它们表达的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )在该过程中起重要作用<sup>[9]</sup>。视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)是脉络膜新生血管形成过程的关键调节作用部位,它表达 VEGF、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)和白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8),调节单核细胞和内皮细胞募集<sup>[10]</sup>。VEGF 是 CNV 中血管生成的主要引发剂<sup>[4]</sup>。由 VEGF 和血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)介导的内皮细胞生长和包绕细胞外基质的周细胞覆盖对于 CNV 形成是必需的<sup>[11]</sup>。CNV 中涉及几种炎症因子系统,包括补体系统、细胞因子和趋化因子<sup>[12]</sup>。纤维蛋白充当 CNV 生长的支架<sup>[13]</sup>,纤维蛋白由循环纤维蛋白原从组织因子(tissue factor, TF)转化而来。TF 细胞受体是促进凝血酶和纤维蛋白两者的丝氨酸蛋白酶的共活化剂。TF 也参与炎症、VEGF 分泌和细胞黏附<sup>[14]</sup>过程,需要注意的是:脉络膜新生血管可穿过 Bruch 膜破口,在视网膜下形成异常新生血管,且二者可以相互吻合<sup>[15]</sup>。

除了概括人类 CNV 的病理生物学之外,CNV 的动物模型最好能够具备在一定时间内有效且可重复,稳定且可持续,表现出类似人类 CNV 的包括生长模式在内的病理学特点<sup>[3]</sup>,生产便宜并能够在体内使用包括荧光素血管造影术(fluorescein angiography, FFA)和光相干断层扫描术(optical coherence tomography, OCT)的成像技术。以下主要介绍 CNV 基因工程小鼠模型,总结不同基因工程小鼠 CNV 模型的相关特征,并给出具体的例子,包括它们的优点和缺点。这些模型可以通过引入细胞因子、年龄、饮食和其他因素进行修改。

## 2 CNV 基因工程小鼠模型及其特征

### 2.1 VEGF<sub>164</sub> RPE65 转基因小鼠

虽然有几种 ARMD 的转基因小鼠模型,但只有相对较少的模型自发形成 CNV。很明显,视网膜 VEGF 或 RPE 过度表达不足以在这些模型中引起 CNV,并且受损的 Bruch 膜在 CNV 发展中具有关键作用。该模型的优点是能够通过比较对照和杂交育种实验来研究 CNV 的各种生物组分。缺点是 CNV 发展

的时长相对较长,发生 CNV 眼睛的比例相对较小和 CNV 面积小。该模型支持 CNV 的最佳模型是引入 Bruch 膜物理破坏的概念<sup>[16]</sup>。Schwesinger 等<sup>[17]</sup>描述了一种转基因小鼠表达由 RPE65 启动子驱动的 VEGF。所有的小鼠都形成了组织学上鉴定的脉络膜内血管异常,未突破 Bruch 膜,被描述为脉络膜新生血管样改变(intrachoroidal neovascularization),但最终未形成 CNV。一些研究者认为该模型中的脉络膜血管异常代表发育(血管发生)改变,而不是新生血管形成。

### 2.2 Tet/VMD2/VEGF 和 Tet/VMD2/VEGF/Ang2 多重转基因小鼠

在一组实验中,Oshima 等<sup>[18]</sup>研究了双重(Tet/VMD2/VEGF)和三重(Tet/VMD2/VEGF/Ang2)转基因小鼠。RPE 中 VEGF 表达增加的成年小鼠具有正常的视网膜和脉络膜,并且不发生 CNV。然而,视网膜下注射含有 Ang2 序列的腺病毒载体导致 100% 的 Tet/VMD2/VEGF 小鼠中产生组织学鉴定的 CNV,而 Tet/VMD2/VEGF/Ang2 三重转基因小鼠不自发产生 CNV。研究人员使用免疫组化和荧光素葡聚糖灌注平台来证明 CNV 的存在和大小。该模型提供了 VEGF 过度表达不足以发展 CNV 的重要信息;必须有 Bruch 膜水平的机械损伤和/或其他因素来诱导 CNV。在转基因动物中外源性施用四环素或多西环素可抑制目的基因的表达从而影响 CNV 的发生。需要注意的一点是,应该仔细评估多西环素下调 CNV 的动物模型。

### 2.3 Ccr2/Ccl2 缺陷小鼠

由 Ambati 等<sup>[19]</sup>研发的 ARMD 的 Ccr2/Ccl2 缺陷小鼠模型已经受到关注。在该模型中,Ccl2 或 Ccr2 缺陷的转基因小鼠不能将巨噬细胞募集到 RPE 和 Bruch 膜的区域,导致 C5a 和 IgG 的积累,二者均诱导 VEGF 产生。这些转基因小鼠的组织学、免疫荧光和超微结构(电镜)检查显示,大约 25% 的小鼠产生了显微镜下可见的 CNV。这些发现有助于理解 CNV 的病理生物学,特别是巨噬细胞募集。虽然 CNV 的面积非常小,但最近的研究表明 CCR3 在这些缺陷小鼠 CNV 内皮细胞中特异性表达。CCR3 靶向量子点的体内成像定位了不能通过传统 FFA 发现的 CNV<sup>[20]</sup>。这是 CNV 动物模型如何转化为成像和治疗人类 CNV 的一个很好的例子。

### 2.4 ApoE 过表达小鼠

Dithmar 等<sup>[21]</sup>证实了高胆固醇血症小鼠中 Bruch 膜和 RPE 区域中的 ARMD 样改变。Malek 等<sup>[22]</sup>对 ApoE4 过度表达的转基因小鼠饲喂高脂肪胆固醇饮食,在 65~127wk 时除了观察到玻璃疣样和基底样沉积之外,还发展出 CNV。并通过荧光素血管造影、组织学、免疫组织化学和电子显微镜检查发现 19% 的雄性和 18% 的雌性小鼠发生 CNV。该模型是研究 ARMD 样病变中自发性 CNV 形成机制的重要模型。

### 2.5 Ccl2/Cx3cr1 缺陷小鼠

Chan 等<sup>[23]</sup>研发了一种 Ccl2/Cx3cr1 缺陷双敲除(deficient double knockout, DKE)转基因小鼠,在 RPE 中 N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺(N-retinylidene-N-retinylethanolamine, A2E)水平升高,内质网蛋白-29(endoplasmic reticulum protein-29, ERp29)水平降低。这些小鼠饲喂低  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸(omega-3 polyunsaturated fatty acids, PUFAs)饮食时,出现了眼底和组织学超微结构可见的 RPE 变化和玻璃疣样病变。该小鼠中的损伤在 6wk 内发生,在转基因小鼠中时间跨度

短,因此成为转基因小鼠自发性新生血管形成中具有潜在吸引力的模型。

**2.6 SOD1<sup>-/-</sup>老化小鼠** Imamura 等<sup>[24]</sup>研究了 Cu-Zn-超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD1)缺陷小鼠的视网膜、RPE、Bruch 膜和脉络膜区域的眼底、FA、组织学、超微结构和免疫组织化学特征发现,这些 SOD1<sup>-/-</sup>老化小鼠分别有 8.3%和 10%存在 CNV 的眼底和组织学证据。在老化 SOD1<sup>-/-</sup>小鼠的 RPE 中检测到氧化损伤 DNA 的标志物 8-羟基-2'-2-脱氧鸟苷(1-OHdG),但在对照中未检测到。相对于 12 月龄的小鼠而言,16 月龄小鼠的视网膜血管与脉络膜下新生血管相吻合。

**2.7 Vldlr<sup>-/-</sup>定向突变小鼠** 该小鼠为针对极低密度脂蛋白受体基因(Vldlr<sup>Tm1Her</sup>)的靶向突变的纯合子小鼠。3mo 后小鼠在视网膜外丛状层和脉络膜吻合区域形成新的血管<sup>[25]</sup>。如后文提及的自发性 16 号染色体 Bst 突变小鼠一样,这些特征似乎与视网膜血管瘤性增生病变(retinal angiomatous hyperplasia, RAP)相似。

**2.8 视紫红质启动子/VEGF 过度表达小鼠** Okamoto 等<sup>[26]</sup>和 Tobe 等<sup>[27]</sup>研发了视紫红质启动子/VEGF 融合基因转基因小鼠。这些小鼠的后代与 C57BL/6 小鼠杂交发展成 FFA 可见的视网膜内新生血管形成,延伸到视网膜下。该损伤与 RAP 相似,表明 VEGF 在视网膜中的过度表达足以引起视网膜内和视网膜下新生血管生成。新生血管形成可能起源于动物的脉络膜和视网膜,从而导致脉络膜-视网膜吻合。该小鼠模型可以用于评估新的 CNV 治疗方法。

**2.9 自发性 16 号染色体 Bst 突变小鼠** Smith 等<sup>[28]</sup>已经深入研究了自发性 16 号染色体 Bst 基因突变小鼠的眼部组织病理学。眼底检查发现,该小鼠自发形成了视网膜损伤。自发性腹部斑点和尾巴(Bst)突变出现在 C57BLKS 近交系小鼠中。通过眼底检查、FFA 和组织学研究,发现大约 88%的小鼠发生组织学上确定的视网膜下新生血管。新生血管形成与 RPE 异常、视网膜错构瘤样病变以及 Bruch 膜缺陷引起的视网膜和脉络膜新生血管吻合有关。尽管新生血管形成与年龄有关,但在这种小鼠中没有玻璃疣样或基底类沉积样损伤,因此相比于 ARMD 中的 CNV,新生血管的形成更类似于 RAP。

**2.10 Cp<sup>-/-</sup>Heph<sup>-/-</sup>敲除小鼠** Hahn 等<sup>[29]</sup>证明在转基因小鼠中,铁质过氧化氢酶和辅助蛋白的破坏导致了铁的过量。转基因小鼠的血浆铜蓝蛋白和膜铁转运蛋白辅助蛋白破坏导致铁超载引起 ARMD 样改变。这些小鼠产生 RPE 变化和光感受器变性。尽管脉络膜和视网膜新生血管生成并不明显,但小鼠在 RPE 水平发生明显的病变,且 100%的小鼠发生了组织学上确定的视网膜下新生血管。此外,这些小鼠不像 ARMD 那样发展出玻璃疣状或基底类沉积样病变。

### 3 总结与展望

总之,成功的 CNV 动物模型所需的三个特征:(1) VEGF 引起的持续性血管生成;(2) 炎性细胞因子组分;(3) Bruch 膜受损<sup>[30]</sup>。迄今为止的研究模型表明,VEGF 过度表达不足以引起 CNV 的发展;需要以机械或生物学方式造成 Bruch 膜的损伤以诱导 CNV。Bruch 膜在人 CNV 的形成中起中心作用。所有模型都需要 Bruch 膜受损、

VEGF 表达和炎性细胞因子等因素介导。这也强调了在 CNV 形成中起主要作用的因素取决于模型。一些模型具有由视网膜或 RPE 特异性启动子驱动的 VEGF 过度表达的转基因动物过度表达 VEGF。还有模型强调了巨噬细胞募集作用的关键性。利用 CNV 动物模型实验时,研究者应该了解 CNV 形成中各种因素(如对 Bruch 膜的机械损伤、VEGF 产生、炎性细胞因子介导)的相对重要性。没有绝对理想的 CNV 动物模型,每种现有基因工程小鼠 CNV 模型都有优点和缺点。选择动物模型时的注意事项与模型的用途有关。在决定使用哪种动物模型的 CNV 时,给定的实验室的能力,包括预算、动物培养设施和实验目标都非常重要。

### 参考文献

- 1 邓宝娣,李嘉,王庭槐. 脉络膜新生血管相关信号通路研究进展. 国际眼科杂志 2019;19(5):762-765
- 2 冯宇梁,李杰,刘巾男,等. 视网膜脉络膜新生血管性疾病机制及治疗研究进展. 西部医学 2016;28(9):1328-1332
- 3 王常观,柳小珍,马志中,等. 小神经胶质细胞对湿性年龄相关性黄斑变性患者脉络膜新生血管膜形成的作用. 中华眼外伤职业眼病杂志 2018;40(1):18-22
- 4 Jo DH, Kim JH, Yang W, et al. Anti-complement component 5 antibody targeting MG4 domain inhibits choroidal neovascularization. *Oncotarget* 2017;8:45506-45516
- 5 Ahbeddou S, Ahmimèche J, Tzili N, et al. Post Traumatic rupture of Bruch membrane: about a case. *Pan Afr Med J* 2015;21:314
- 6 Bonilha VL, Bell BA, Rayborn ME, et al. Absence of DJ-1 causes age-related retinal abnormalities in association with increased oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2017;104:226-237
- 7 Lesman A, Rosenfeld D, Landau S, et al. Mechanical regulation of vascular network formation in engineered matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;96:176-182
- 8 McLeod DS, Bhutto I, Edwards MM, et al. Distribution and Quantification of Choroidal Macrophages in Human Eyes With Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(14):5843-5855
- 9 Rutar M, Provis JM. Role of Chemokines in Shaping Macrophage Activity in AMD. *Adv Exp Med Biol* 2016;854:11-16
- 10 Brosig A, Kuhrt H, Wiedemann P, et al. Gene expression regulation in retinal pigment epithelial cells induced by viral RNA and viral/bacterial DNA. *Mol Vis* 2015;21:1000-1016
- 11 Yin XK, Lin XC, Ren XR, et al. Novel multi-targeted inhibitors suppress ocular neovascularization by regulating unique gene sets. *Pharmacol Res* 2019;146:104277
- 12 Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, et al. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immunemediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retina Eye Res* 2001;20(6):705-732
- 13 Ali Z, Cui D, Yang Y, et al. Synchronized tissue-scale vasculogenesis and ubiquitous lateral sprouting underlie the unique architecture of the choriocapillaris. *Dev Biol* 2019[Epub ahead]
- 14 Wang L, Yang Z, Yu Y, et al. Blockage of tissue factor ameliorates the lesion of laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Exp Eye Res* 2014;127(10):117-123
- 15 Neelam K, Cheung CM, Ohno-matsui K, et al. Choroidal neovascularization in pathological myopia. *Prog Retin Eye Res* 2012;31(5):495-525

- 16 Fletcher EL, Jobling AI, Greferath U, *et al.* Studying age-related macular degeneration using animal models. *Optom Vis Sci* 2014;91(8):878-886
- 17 Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, *et al.* Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 1994;158(3):1161-1172
- 18 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
- 19 Ambati J, Anand A, Fernandez S, *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
- 20 Nagai N, Ju M, Izumi-Nagai K, *et al.* Novel CCR3 Antagonists Are Effective Mono- and Combination Inhibitors of Choroidal Neovascular Growth and Vascular Permeability. *Am J Pathol* 2015; 185 (9):2534-2549
- 21 Dithmar S, Curcio CA, Le NA, *et al.* Ultrastructural changes in Bruchs membrane of apolipoprotein E deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2035-2042
- 22 Malek G, Hohnson LV, Mace BE, *et al.* Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis; a model for age-related retinal degeneration. *Am J Ophthalmol* 2005;102(33):11900-11905
- 23 Chan CC, Ross RJ, Shen D, *et al.* Cl2/Cx3cr1-deficient mice: an animal model for age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res* 2008;40(3-4):124-128
- 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 USA* 2006;103(30):11282-11287
- 25 Heckenlively JR, Hawes NL, Friedlander M, *et al.* Mouse model of subretinal neovascularization with choroidal anastomosis. *Retina* 2003;23(4):518-522
- 26 Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, *et al.* Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina. A new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol* 1997;151(1):281-291
- 27 Tobe T, Ortega S, Luna J, *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
- 28 Smith RS, John SWM, Zabeleta A, *et al.* The bst locus on mouse chromosome 16 is associated with age-related subretinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(5):2191-2195
- 29 Hahn P, Qian Y, Dentchev T, *et al.* Disruption of ceruloplasmin and hephaestin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(38):13850-13855
- 30 Semkova I, Kociok N, Karagiannis D, *et al.* Anti-angiogenic effect of the basement membrane protein nidogen-1 in a mouse model of choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 2014;118:80-88