

视网膜缺血再灌注模型的建立与观察研究进展

王浩,刘索新,鞠学红

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2010HL043)
作者单位:(261042)中国山东省潍坊市,潍坊医学院解剖学教研室

作者简介:王浩,在读硕士研究生,研究方向:神经解剖学。
通讯作者:鞠学红,男,教授,硕士研究生导师,研究方向:神经解剖学. juxh@wfmc.edu.com
收稿日期:2012-06-05 修回日期:2012-08-30

Establishment and investigation of retinal ischemia-reperfusion model

Hao Wang, Suo-Xin Liu, Xue-Hong Ju

Foundation item: Shandong Provincial Natural Sciences Foundation Project, China (No. ZR2010HL043)
Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Correspondence to: Xue-Hong Ju. Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China. juxh@wfmc.edu.com
Received:2012-06-05 Accepted:2012-08-30

Abstract

• Retinal ischemia-reperfusion model is thought to be a critical step in investigating its mechanism, prevention and treatment. A number of animal models and analytical techniques have been used to study retinal ischemia, but there is little quantitative investigation. This article assesses the various establishment methods of experimental retinal ischemia-reperfusion models and compares the different features of the models.

• **KEYWORDS:** retina; ischemia-reperfusion; model

Citation: Wang H, Liu SX, Ju XH. Establishment and investigation of retinal ischemia-reperfusion model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(10):1902-1903

摘要

视网膜缺血再灌注模型是研究视网膜缺血再灌注损伤机制的重要模型,其建立手段较多,但定量方法较少。本文结合文献综述视网膜缺血再灌注模型的建立方法,比较不同模型的特点。

关键词: 视网膜;缺血再灌注;模型

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.23

引用:王浩,刘索新,鞠学红. 视网膜缺血再灌注模型的建立与观察研究进展. 国际眼科杂志 2012;12(10):1902-1903

0 引言

视网膜缺血再灌注损伤主要发生于视网膜中央动静脉栓塞、急性闭角型青光眼、糖尿病性视网膜病等视网膜

血管阻塞所引起的缺血性眼病^[1-3],表现为许多缺血性眼病患者在血液再通后,视网膜损伤加重,视功能进一步下降。视网膜缺血再灌注损伤的机制十分复杂,是目前国内外研究的重点课题之一^[4-9]。建立动物视网膜缺血再灌注损伤模型,研究其发生机制,对临床缺血性眼病的预防和治疗具有指导意义。本文结合文献综述视网膜缺血再灌注模型的建立方法,以期对视网膜缺血再灌注损伤机制研究和损伤治疗提供参考。

1 建立视网膜缺血再灌注动物模型的意义

视网膜缺血再灌注模型是研究视网膜缺血再灌注损伤机制,探讨预处理因素对视网膜缺血再灌注损伤修复作用的基本模型^[10-14]。建立视网膜缺血再灌注模型,努力使模型接近临床病理过程,研究其发生机制以及预防和治疗的方法,为临床治疗奠定基础。

2 视网膜缺血再灌注模型的建立方法

2.1 血管结扎模型 最常用的方法是手术分离暴露眼球后部,用尼龙线或丝线将视网膜中央动、静脉连同视神经一起结扎^[9],或在手术显微镜下剪开视神经鞘膜,分离出视网膜中央动脉,单独钳夹视网膜中央动脉^[15],也有学者结扎双侧颈总动脉造成视网膜缺血而建立视网膜缺血再灌注模型的^[16]。Wang等^[17]研究发现,结扎视网膜中央动、静脉,引起视网膜缺血,60min后去除结扎,5min后视网膜血供恢复。

2.2 管内段视神经损伤模型 有学者以家兔作为实验动物,通过管内段视神经损伤制作视网膜缺血再灌注模型,方法是:用20g/L戊巴比妥钠(30mg/kg)将家兔麻醉,经颅入路暴露视神经颅口。将一直径约1mm的乳胶条塞进视神经管,然后将一顶端带有弧形缺口的小金属凿卡在与视神经孔相对应的眶板残端上,将一直径15mm,高82mm,重110g的金属圆柱体自1.5m高处自由落下,击打于圆形平面的中央,致伤能量为1.621J。视神经损伤后水肿,造成视网膜血供受阻,引起视网膜缺血^[18]。

2.3 视神经结扎模型 将兔麻醉固定于手术操作台上,眼科剪剪开外眦部皮肤至眶缘软骨,沿角膜缘360°剪开球结膜,钝性分离暴露4条直肌,做直肌牵引吊线,自颞上方向眼球后钝性分离,暴露视神经,在眼球后约1.5mm处用0号黑丝线结扎视神经。用直接检眼镜观察眼底,见后极部视盘周围视网膜变白,动脉变细,静脉扩张,血管搏动消失。60min后松开结扎线,10min后用直接检眼镜观察眼底,见后极部视网膜恢复红色,动、静脉管径趋于正常^[19],视网膜缺血再灌注造模成功。

2.4 线栓法模型 以大鼠为实验动物,水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,25g/L碘伏消毒颈部皮肤,颈旁偏左0.3~0.5cm作长约2cm纵行切口,钝性分离出颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉;丝线结扎颈外动脉远心端,动脉夹夹闭颈总动脉近心端、颈内动脉远心端,并在颈外动脉靠近颈总动脉处预置一根缝线;显微剪刀靠近颈外动脉结扎处近心端剪一斜口,插入线栓,打结预置缝线,不必太紧,剪断颈外动脉结扎处,向下逆转动脉,使之与颈内动脉呈一直线;松开颈总、颈内动脉夹,同时用显微镊子向颈内动

脉输送线栓到达标记点即可。此时外观可见大鼠左眼苍白,与右眼对比明显,眼底镜下可见左眼视网膜水肿、苍白,实验组分别缺血1,2h后恢复再灌注6h;将线栓头退至颈总动脉分叉处可见左眼巩膜重新恢复血供,视网膜血管充盈,大鼠视网膜缺血再灌注造模成功^[20]。做病理切片,与正常对照组相比,实验组中大鼠视网膜缺血1h主要表现为视网膜水肿,其中以神经纤维层和内网状层最明显,厚度增加明显,染色较淡,缺血2h视网膜水肿加重,内核层细胞排列紊乱,可见白细胞浸润;再灌注6h后视网膜和神经纤维层水肿开始减轻。有学者利用下列方法成功制作了视网膜缺血再灌注模型:将小鼠麻醉后,用乙烯基聚硅氧烷口腔印模材料包被尼龙缝线,绕过颈外动脉,把尼龙缝线插入颈内动脉,因眼动脉是颈内动脉的一个分支,这样可造成同侧眼动脉阻塞。通过用激光多普勒流量计观察大脑中动脉相关区域的血流来确定尼龙缝线是否插入颈内动脉,尼龙线在颈内动脉内阻塞2h(即缺血维持2h)后取出,再灌注22h,造模成功^[21]。

2.5 激光光凝术模型 倍频532激光装置(Carl Zeiss, Germany)对SD大鼠右眼上巩膜静脉以及小梁网所在区域实施光凝术,左眼不做任何处理。激光光凝术参数设置为:波长532nm,能量400~800mW,光凝点120~150;光凝时间50ms,光点直径50 μ m。每只鼠需实施二次激光光凝术,两次光凝术的间隔时间为1wk,测量第二次术后24,72h眼压,每次各眼测量均录用测量误差小于5%的3个数据作为测量结果。根据大鼠眼压的测量结果,选取第二次光凝术后72h、平均眼压大于30mmHg的大鼠进行药物实验^[22]。通过激光光凝法诱导大鼠高眼压,从而造成视网膜缺血。

2.6 高眼压模型 该模型是由眼前房刺入连有灌注瓶的灌注针头,通过升高灌注瓶,使眼内压超过体循环收缩压或达到一定的数值,造成整个视网膜的缺血。马艳萍等^[23]将Healon针头置入大鼠前房,升高输液瓶高度至距大鼠眼的垂直距离136cm,此高度差可在大鼠眼内形成100mmHg的眼内压,维持灌注时间60min,施行前房高压灌注后,可观察到大鼠前房明显加深,用直接检眼镜观察大鼠眼底,以眼底视网膜动脉血流中断、球结膜苍白为视网膜缺血成功标准,数分钟后可见角膜水肿呈雾状,灌注完毕拔除Healon针头后,穿刺口附近虹膜可见少量出血。丢弃穿刺口漏水,前房不能形成或前房明显积血或针头误伤晶状体,形成白内障的大鼠,重新补充实验大鼠。程辉等^[24]将充满生理盐水的输液器始端和血压计与水银柱相连的输气管用三通管相连接,尾端连接23gauge针头,将针头在大鼠前房裂开角膜交界处刺入大鼠眼前房,将血压计缚带缠紧绑缚,根据连通器原理,此时水银计显示的压力即为大鼠眼内压,给血压计充气使血压计压力保持125mmHg,持续时间60min使眼内压维持在一个恒定值,然后解除压力造成缺血再灌注。该模型眼底镜可见视网膜缺血再灌注前后视网膜的缺血充血过程,对视网膜进行组织学检查,可见缺血再灌注对视网膜造成的病理损伤。本模型缺血持续时间易于控制,避免了钳夹、结扎视神经阻断视网膜中央动脉等方法造成的眼内损伤大、稳定性差、难以重复等缺点。此模型可行性强、损伤确切、可复性好,且对眼内组织损伤小等优点,是视网膜缺血性疾病的机制及治疗研究中比较理想的模型。

3 展望

理想的视网膜缺血再灌注模型应当是只阻断视网膜动脉或动静脉,而对视网膜其他部分组织没有任何损伤,

但由于实验条件和技术的限制,目前尚无一种模型能够达到这一要求。本文对各种视网膜缺血再灌注模型的建立方法进行总结,期望建立一种更能接近临床病理过程的方法,从而为视网膜缺血再灌注损伤的研究奠定基础。

参考文献

- 1 庞志宏,杜亚辉,李晓光,等.超选择眼动脉插管局部溶栓治疗视网膜中央动脉阻塞.介入放射学杂志2004;13(2):99-100
- 2 Kern TS, Miller C, Du YP, et al. Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology. *Diabetes* 2007; 56(2): 373-379
- 3 赵成,游志鹏.视网膜缺血再灌注损伤的治疗进展.国际眼科杂志2007;7(2):475-477
- 4 Ju XH, Li XY, Li XS, et al. Ultrastructural changes in the optic nerve and capillary vessels during early stages of optic nerve injury. *Neural Regen Res* 2008;3(9):995-999
- 5 唐洪涛,杨明,鞠学红.视网膜缺血再灌注损伤机制的研究进展.解剖学研究2007;29(5):383-386
- 6 鞠学红,刘光义,于树娜,等.视神经损伤后视网膜中GAP-43的表达及MDA、NO和ATPase的测定.解剖学研究2007;29(1):15-18
- 7 李晓双,鞠学红,王亚男.地塞米松对兔视神经钳夹伤后视网膜神经节细胞存活及Nogo-A表达的影响.眼科新进展2008;28(10):737-739
- 8 鞠学红,刘光义,李晓双,等.管内段视神经损伤后视网膜的形态学改变及GAP-43的表达.解剖学杂志2007;30(1):366-368
- 9 Nonaka A, Kiryu J, Tsujikawa A, et al. Administration of 17beta-estradiol attenuates retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(9):2689-2696
- 10 徐建森,孟瑞华,张杰,等. Neuregulin-1 β 预处理对大鼠视网膜缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响.眼科新进展2009;29(1):31-34
- 11 赵海雁,庞东渤.果糖二磷酸镁对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用.眼科新进展2010;30(4):328-331
- 12 赵岩松,赵华锋,王晓莉,等.视网膜下移植骨髓间充质干细胞对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的影响.中国组织工程研究与临床康复2008;12(47):9261-9263
- 13 徐旭,高明宏,禹海,等.腺病毒载体介导的色素上皮衍生因子对大鼠视网膜缺血再灌注损伤后视觉电生理的影响.国际眼科杂志2008;8(6):1153-1155
- 14 陆孟婷,李平华.视网膜缺血再灌注损伤中谷氨酸的兴奋毒性及其机制.国际眼科杂志2008;8(8):1637-1639
- 15 Yokoyama A, Oshitari T, Negishi H, et al. Protection of retinal ganglion cells from ischemia-reperfusion injury by electrically applied HSP27. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(13): 3276-3283
- 16 Osborne NN, Larson A, Barnett NL. Influence of excitatory amino acids and ischemia on rat retinal choline acetyltransferase-containing cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(8): 1692-1700
- 17 Wang XL, Teng LL, Li A, et al. TRPC6 channel protects retinal ganglion cells in a rat model of retinal ischemia/reperfusion-induced cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(11): 5751-5758
- 18 Ju XH, Cheng H, Liu HG, et al. Pathological changes in the retina and growth associated protein-43 expression following treatment of intracanalicular optic nerve injury via optic canal decompression, dexamethasone or their combination. *Neural Regen Res* 2010;5(10):752-756
- 19 丁建光,姜德咏,吴荣瀚,等.兔视网膜不同缺血时间再灌注后ERG的变化.国际眼科杂志2005;5(4):659-666
- 20 尹晓涛,孟瑞华,王景.线栓法制备大鼠视网膜缺血再灌注模型的初步探讨.青岛大学医学院学报2008;44(4):357-360
- 21 Li SY, Fu ZJ, Ma H, et al. Effect of lutein on retinal neurons and oxidative stressin a model of acute retinal ischemia/reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(2): 836-843
- 22 黄萍,徐永胜,卫若昕,等.汉防己素滴眼液对高血压模型大鼠的降眼压作用.中国实验动物学报2009;17(1):31-35
- 23 马艳萍,朱承华,杭荟.倍他洛尔与氨基胍对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用.国际眼科杂志2008;8(2):284-287
- 24 程辉,李秀云,鞠学红.大鼠视网膜缺血再灌注模型的建立与观察.解剖学研究2009;31(2):139-141