·综 述·

新生血管动物模型的构建

郭 婷,宋洪元,赵世红*
(第二军医大学长海医院眼科,上海 200433)

【摘 要】 新生血管是指从已有毛细血管发展形成新血管,该过程受血管生成因子和血管抑制因子双重调控,是一个动态平衡的过程。新生血管是多种疾病的病理性改变,包括肿瘤、早产儿视网膜病变和糖尿病视网膜病变等,是严重的致残性病变。建立新生血管动物模型是研究这些疾病发病机制的重要前提,本文主要对主动脉环血管生成模型、基质胶栓动物模型、氧诱导视网膜病变模型、激光诱导脉络膜新生血管动物模型4种建模方法进行了综述。

【关键词】 新生血管;主动脉环;基质胶栓;氧诱导;激光诱导
【中图分类号】 R332;R732;R774 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.12.226

Establishment of animal models of neovascularization

GUO Ting, SONG Hong-Yuan, ZHAO Shi-Hong*
(Department of Ophthalmology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Angiogenesis is characterized by forming new blood vessels from existing capillaries, and is mutually regulated by angiogenic factors and antiangiogenic factors in a dynamically balanced process. As a severely debilitating pathological change of a variety of diseases, including tumor, retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy, *etc*, angiogenesis is a severely disabling condition. Thus, establishing animal models of neovascularization is an important prerequisite to study the pathogenesis. This article reviewed 4 animal models of angiogenesis, that is, aortic ring assay, matrigel plug assay, oxygen-induced retinopathy and laser-induced choroidal neovascularization in animal models.

【Key words】 neovascularization; aortic ring; matrigel plug; oxygen-induced; laser-induced
This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81470652).
Corresponding author: *ZHAO Shi-Hong*, *E-mail*: *zhaosh2001@sina.com*

新生血管是指从已有毛细血管发展形成新血管,该过程受血管生成因子和血管抑制因子双重调控,是一个动态平衡的过程[1]。这个过程有利于胚胎发育、伤口修复以及缺血组织再灌注等[2]。然而对于肿瘤、早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)和糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)等疾病,新生血管却会造成身体严重损害[3-6]。它们产生新生血管的原因有各自的机制,目前还尚不明确。为了深入探讨这些疾病的发病机制,建立成熟和接近临床的新生血管动物模型是必要前提,本文对建立新生血管动物模型的4种常用方法进行了综述。

1 主动脉环血管生成模型

1990年,Nicosia和Ottinetti首次设计了大鼠主动脉环血管生成模型(aortic ring assay, ARA)[7]。这种方法目前应用较广,所选用的动物主要有大鼠、小鼠、猪等[8]。

1.1 方法

分离8~12周野生型C57 BL/6小鼠胸主动脉,于Opti-MEM培养基中清洗,剥离干净残带组织后切成宽为0.5~1.0 mm的环,Opti-MEM饥饿过夜,第2天将环置于铺有基质胶的96孔板中培养,观察主动脉形成新生血管的情况[9]。本模型能检测生长因子和一些小分子药物对新生血管形成的影响。

1.2 影响因素

1.2.1 培养基 主动脉环培养采用Opti-MEM培养基加2.5%的胎牛血清,相比DMEM加2.5%的胎牛血清培养基,主动脉环在Opti-MEM培养基中出芽效果更明显[9]。

收稿日期:2016-07-26;**修回日期**:2016-09-16
基金项目:国家自然科学基金面上项目(81470652)
通信作者:赵世红,E-mail:zhaosh2001@sina.com

1.2.2 基质和生长因子 培养主动脉环的基质主要有胶原基质、纤维蛋白基质、基底膜基质[10,11]。生长因子有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)。在纤维蛋白基质中加入bFGF,或在胶原基质中加入VEGF,新生血管出芽效果较明显,基底膜基质添加10%的胎牛血清而不添加任何生长因子是最优组合[9]。

1.3 *其他*

该模型是一种与人体生理学相关的实验设计,可形成类似于人体的血管,很好地模拟体内新生血管形成;实验成本低、周期短,可获取大量样本,方便、经济和快捷;还可进行多种处理,如药物处理、基因干扰或过表达等[10]。模型的不足是与样本相关,如组织的新鲜度、非主动脉组织的掺杂、缺乏流动性等都会对模型产生影响[12]。

2 基质胶栓动物模型

基质胶栓动物模型(matrigel plug assay, MPA)是通过体内实验检测新生血管形成能力的方法[13]。此模型因其低成本、高效率、可操控性强、结果可信及可重复性强等优点已成为目前众多实验室的新选择[14]。

2.1 *方法*

取10~14周龄小鼠于腹部皮下注射基质胶500 μl,待凝固(0.5 h)后在同一部位做一个0.5 cm切口,在凝固的基质胶栓子上做同样的切口,将一块预先包有检测材料、大小为3.0 mm×2.0 mm×1.5 mm的无菌纱布敷料放入到栓子中心,缝合伤口,24 h内严密监测伤口变化。bFGF诱导的新生血管在术后1周进行检测分析,肿瘤细胞诱导的新生血管则在术后1~2周进行检测分析[15]。检测方法包括组织切片、荧光染色及测定栓子中的血红蛋白[16]。本方法可模拟各类疾病新生血管形成,是一种可靠的检测新生血管的动物模型[17]

2.2 *影响因素*

生长因子bFGF和VEGF都能促进新生血管的形成。bFGF对新生血管形成的影响具有剂量和时间依赖性;VEGF对新生血管形成的影响是剂量依赖型的[18]。

2.3 *其他*

目前采用的是改良后的MPA,相比传统模型,实验步骤复杂,耗时长,但实验过程具有合理性和说服性,结果可靠[19]。

3 氧诱导视网膜病变模型

氧诱导视网膜病变模型(oxygen-induced retinopathy, OIR)是研究视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)疾病的常用动物模型[20]。1994年Smith等[21]首次用小鼠成功构建了该模型,它是目前最常用的动物模型,研究人员认为通过高氧诱导的小鼠RNV与人ROP病程相似。

3.1 *方法*

生后7 d的C57BL/6小鼠放入体积分数为75%高氧环境中饲养5 d,之后放入正常环境中饲养5 d即可成模[21]。小鼠经高氧刺激再回到正常的氧环境后,其视网膜组织相对缺氧,VEGF分泌增多形成RNV[1]。通过视网膜荧光造影铺片和计数内皮细胞核进入玻璃体的数量来检测模型的成模情况[22,23]。该方法简单、快捷、稳定、成模率高、周期性短、重复性强,主要用来模拟ROP和DR[24]。

3.2 *影响因素*

3.2.1 动物 大鼠、犬、猫和小鼠RNV模型都有报道[25]。目前,模型多选择SD大鼠、C57BL小鼠等啮齿类动物,因它们的视网膜血管发育与人类相似[21]。大鼠虽生长快、繁殖性能好、存活率高、耐高氧能力强及眼球体积相对大,但建模成功率明显不如C57BL小鼠高[26]。

3.2.2 周龄 1周龄小鼠的玻璃体动脉退化程度最高,视网膜血管发育尚未成熟,当缺氧刺激后所出现的血管增生性反应主要为异常的视网膜血管,可最大限度地反映病理性视网膜血管新生的程度[27]。

3.2.3 时间 母鼠的存活是关系到建模小鼠能否健康成长的关键因素,母鼠的死亡直接导致动物模型制备的失败。研究发现,母鼠的耐氧能力要弱于新鼠,不能在高氧环境中存活>5 d[21]。

3.2.4 氧浓度 过低氧浓度不利于新生血管形成,>80%的氧浓度虽能促进小鼠RNV形成,但是降低了母鼠和小鼠的存活率。研究发现75%的氧浓度既能保证小鼠RNV形成,又可最大程度地保证母鼠及小鼠的存活率[28]。

3.3 *其他*

OIR模型的实际建模过程中仍存在母鼠死亡率高、乳鼠成模率低且不稳定等问题。随着实验技术的成熟,改进方法也不断出现。如母鼠固定间隔时间段哺乳幼鼠或多只母鼠交替哺乳小鼠,固定时间段开仓清洗和换食,释放氧流量等可降低幼鼠的死亡率。

4 激光诱导脉络膜新生血管动物模型

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是脉络膜的毛细血管增殖,通过布鲁赫膜(Bruch' membrane)裂口在 Bruch 膜与视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)之间或神经视网膜与 RPE 之间,或 RPE 与脉络膜之间增殖。

4.1 方法

激光诱导 CNV 模型是常用的 CNV 动物模型,1979 年,Ryan 首次用小鼠建立了 CNV 模型,具体方法是将小鼠瞳孔散大,角膜表面放置盖玻片,利用氩激光在脉络膜数个点击穿 Bruch 膜形成 CNV,通过荧光标记的葡聚糖血管灌注脉络膜铺片观察 CNV 的情况[29]。本模型建模的机制虽与年龄相关性黄斑变性(age related macular degeneration, AMD)发生机制不完全相同,但是目前研究 AMD 引起的 CNV 最常用的模型。

4.2 影响因素

4.2.1 动物 模型动物应具有以下特点:病理学特征与人类 CNV 相似、模型持久、制模成功率高、经济实惠、模型眼与人眼尽可能接近,以及便于操作和观察。激光诱导鼠 CNV 模型因其成本低、繁殖周期短、成模率高等优点在临床动物模型中广泛应用[30]。灵长类动物如猴等因价格贵、伦理审核困难等因素限制了其在前期研究的大批量应用[31]。猪繁殖周期长,常被用于长期的药物实验[32]。兔眼 CNV 模型费用低、CNV 发生率高、接近人眼球大小,应用也较广泛[33]。

4.2.2 常用激光 常用激光有氩激光、氪激光,不同激光波长不同,穿透力也不同,对视网膜损伤的程度也不同[34]。蓝绿氩激光因穿透力弱,主要作用于视网膜的内层和 RPE 层,Ryan 建立的小鼠 CNV 模型就是用氩激光在眼底进行激光光凝(647 nm, 100 μm, 50 ~ 100 mw, 0.1 s)[29]。氪激光则作用于 RPE 和脉络膜内层,Ryan 随后应用氪激光(488 nm 和 514nm, 50 ~ 200 μm, 200 ~ 950 mw, 0.1 ~ 0.5 s)作用于猴视网膜建立了 CNV 模型[35]。

4.3 其他

激光诱导 CNV 模型并不是最理想的 CNV 动物模型,它的机制是破坏 RPE - Bruch 膜 - 脉络膜毛细血管复合体产生新生血管[36],但是整个过程会触发炎症反应,炎症反应同时参与病理性新生血管的形成,这与非炎症反应 AMD 的发生过程并不完全吻合,因此建模过程中需通过类固醇抑制炎症反应[37]。携带 VEGF 基因的腺病毒经视网膜注射诱导 CNV,虽可避免产生炎症反应,但转导效率低、基因持续时间短,也限制了其在 CNV 建模中的应用[38]。

综上所述,为了明确各种新生血管的发病机制,实验阶段建立合理、适宜、方便、可控、发病机制相似的动物模型非常必要。ARA 和 MPA 模型可检测各种新生血管,OIR 动物模型是常用的 RNV 模型,激光诱导 CNV 动物模型是常用的 CNV 动物模型。随着现代医学实验技术的发展,研究人员应该能研究出更符合新生血管发病机制、重复率更高、结果更可靠、更经济的动物模型。

【参考文献】

[1] Mofarrahi M, Sigala I, Vassilokopoulos T, *et al*. Angiogenesis-related factors in skeletal muscles of COPD patients: roles of angiopoietin-2[J]. J Appl Physiol, 2013, 114(9): 1309 - 1318.

[2] Koob TJ, Lim JJ, Massee M, *et al*. Properties of dehydrated human amnion/chorion composite grafts: implications for wound repair and soft tissue regeneration[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2014, 102(6): 1353 - 1362.

[3] Kubota Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy[J]. Keio J Med, 2012, 61(2): 47 - 56.

[4] Van Geest RJ, Klaassen I, Lesnik-Oberstein SY, *et al*. Vitreous TIMP-1 levels associate with neovascularization and TGF-β2 levels but not with fibrosis in the clinical course of proliferative diabetic retinopathy[J]. J Cell Commun Signal, 2013, 7(1): 1 - 9.

[5] Wu Q, Ni Y, Yang Q, *et al*. ^{99}Tc MDP treatment for the therapy of rheumatoid arthritis, choroidal neovascularisation and Graves' ophthalmopathy[J]. Biomed Rep, 2016, 4(4): 400 - 402.

[6] Chen ZL, Zhu LN, Yu ZK, *et al*. Progress in the treatment of ocular neovascular diseases[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2015, 14(1): 27 - 32. [陈泽丽, 祝丽娜, 余梓逵, 等. 新生血管性眼病的治疗进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2015, 14(1): 27 - 32.]

[7] Nicosia RF, Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis *in vitro*[J]. Lab Invest, 1990, 63(1): 115 - 122.

[8] Kruger EA, Duray PH, Tsokos MG, *et al*. Endostatin inhibits microvessel formation in the *ex vivo* rat aortic ring angiogenesis assay[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268(1): 183 - 191.

[9] Baker M, Robinson SD, Lechertier T, *et al*. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis[J]. Nat Protoc, 2011, 7(1): 89 - 104.

[10] Baharara J, Namvar F, Ramezani T, *et al*. Green synthesis of silver nanoparticles using *Achillea biebersteinii* flower extract and its anti-angiogenic properties in the rat aortic ring model[J]. Molecules, 2014, 19(4): 4624 - 4634.

[11] Robinson SD, Reynolds LE, Kostourou V, *et al*. Alphav beta 3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis[J]. J Biol Chem, 2009,

284(49): 33966 - 33981.

[12] Aplin AC, Nicosia RF. The rat aortic ring model of angiogenesis[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1214: 255 - 264.

[13] Coltrini D, Di Salle E, Ronca R, *et al*. Matrigel plug assay: evaluation of the angiogenic response by reverse transcription-quantitative PCR[J]. Angiogenesis, 2013, 16(2): 469 - 477.

[14] Auerbach R, Lewis R, Shinners B, *et al*. Angiogenesis assays: a critical overview[J]. Clin Chem, 2003, 49(1): 32 - 40.

[15] Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach R. The sponge/matrigel angiogenesis assay[J]. Angiogenesis, 2002, 5(1 - 2): 75 - 80.

[16] Pabst AM, Ziebart T, Ackermann M, *et al*. Bisphosphonates' antiangiogenic potency in the development of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: influence on microvessel sprouting in an *in vivo* 3D matrigel assay[J]. Clin Oral Invest, 2014, 18(3): 1015 - 1022.

[17] Shi L, Fisslthaler B, Zippel N, *et al*. MicroRNA-223 antagonizes angiogenesis by targeting β1 integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells[J]. Circ Res, 2013, 113(12): 1320 - 1330.

[18] Benton G, Arnaoutova I, George J, *et al*. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 79: 3 - 18.

[19] Oh MJ, Zhang C, LeMaster E, *et al*. Oxidized LDL signals through Rho-GTPase to induce endothelial cell stiffening and promote capillary formation[J]. J Lipid Res, 2016, 57(5): 791 - 808.

[20] Ludewig P, Flachsbarth K, Wegscheid C, *et al*. CEACAM1 confers resistance toward oxygen-induced vessel damage in a mouse model of retinopathy of prematurity[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(12): 7950 - 7960.

[21] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, *et al*. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(1): 101 - 111.

[22] Alex AF, Heiduschka P, Eter N. Retinal fundus imaging in mouse models of retinal diseases[J]. Methods Mol Biol, 2013, 935: 41 - 67.

[23] Park SW, Kim JH, Kim KE, *et al*. Beta-lapachone inhibits pathological retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy *via* regulation of HIF-1α[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(5): 875 - 884.

[24] Gammons MV, Bates DO. Models of oxygen induced retinopathy in rodents[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1430: 317 - 332.

[25] Stieger K, Lhériteau E, Moullier P, *et al*. AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models[J]. ILAR J, 2009, 50(2): 206 - 224.

[26] Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization[J]. Prog Retin Eye Res, 2010, 29(6): 500 - 519.

[27] Scott A, Fruttiger M. Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina[J]. Eye, 2010, 24(3): 416 - 421.

[28] Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease[J]. Nature, 2004, 438(7070): 960 - 966.

[29] Ryan SJ. The development of an experimental model of subretinal neovascularization in disciform macular degeneration[J]. Trans Am Ophthalmol Soc, 1979, 77: 707 - 745.

[30] Tobe T, Ortega S, Luna JD, *et al*. Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model[J]. Am J Pathol, 1998, 153(5): 1641 - 1646.

[31] Zhu Y, Lu Q, Shen J, *et al*. Improvement and optimization of standards for a preclinical animal test model of laser induced choroidal neovascularization[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94743.

[32] Cui J, Liu Y, Zhang J, *et al*. An experimental study on choroidal neovascularization induced by krypton laser in rat model[J]. Photomed Laser Surg, 2014, 32(1): 30 - 36.

[33] Lichtlen P, Lam TT, Nork TM, *et al*. Relative contribution of VEGF and TNF-alpha in the cynomolgus laser-induced CNV model: comparing the efficacy of bevacizumab, adalimumab, and ESBA105[J]. Invest Ophthal Vis Sci, 2010, 51(9): 4738 - 4745.

[34] Wu Q, Xuan W, Ando T, *et al*. Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths[J]. Laser Surg Med, 2012, 44(3): 218 - 226.

[35] Ryan SJ. Subretinal neovascularization: natural history of an experimental model[J]. Arch Ophthalmol, 1982, 100(11): 1804 - 1809.

[36] Nakajima T, Hirata M, Shearer TR, *et al*. Mechanism for laser-induced neovascularization in rat choroid: Accumulation of integrin α chain-positive cells and their ligands[J]. Mol Vis, 2014, 20: 864 - 871.

[37] Lambert V, Lecomte J, Hansen S, *et al*. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice[J]. Nat Protoc, 2013, 8(11): 2197 - 2211.

[38] Wang F, Rendahl KG, Manning WC, *et al*. AAV-mediated expression of vascular endothelial growth factor induces choroidal neovascularization in rat[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(2): 781 - 790.

(编辑: 王彩霞)