

CD105 评价脉络膜新生血管变化的实验研究

陶方方, 亢泽锋, 刘 健, 褚文丽, 周志豪

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81574032)

作者单位: (100040) 中国北京市, 中国中医科学院眼科医院眼科

作者简介: 陶方方, 在读博士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 亢泽锋, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合眼科. Zefeng2531@163.com

收稿日期: 2016-12-26 修回日期: 2017-04-10

An experimental research on changes of choroid neovascularization evaluated by CD105

Fang-Fang Tao, Ze-Feng Kang, Jian Liu, Wen-Li Chu, Zhi-Hao Zhou

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81574032)

Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

Correspondence to: Ze-Feng Kang. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China. Zefeng2531@163.com

Received: 2016-12-26 Accepted: 2017-04-10

Abstract

• AIM: To observe the accuracy of the experimental choroid neovascularization (CNV) changes evaluated by CD105 immunohistochemical examination.

• METHODS: Twenty-four male Brown Norway (BN) rats were randomly divided into the control group (6 rats) and the experimental group (18 rats). The CNV were induced by 659nm krypton laser. And the power was 360mW, exposure time was 0.05s, spot diameter was 50 μ m. The formation rate of CNV and the average optical density (AOD) of leakage flare were observed by fluorescein fundus angiography (FFA) and indocyanine green angiography (ICGA) on the seventh day, the fourteenth day and the twenty-first day after laser photocoagulation. The histopathology changes of CNV and the AOD of CD105 were observed by eyeball exemplar.

• RESULTS: The CNV appeared on the seventh day after laser photocoagulation, and reached the peak on the fourteenth day and twenty-first day after laser photocoagulation. The formation rate of CNV were 77.08%, 85.42%, 89.58%, at 7, 14 and 21d after laser photocoagulation. From 7 to 21d after laser photocoagulation, the AOD of leakage flare increased gradually ($P < 0.05$). There had significant differences between 7 days' outcome and 14 days' outcome ($P < 0.05$), and had no significant differences between 14 days' outcome and 21 days' outcome ($P > 0.05$). From 7 to 21d

after laser photocoagulation, the expression of CD105 increased gradually, and then decreased gradually, and from 14 to 21d, there had significant differences between 7 days' outcome and 14 days' outcome of AOD ($P < 0.05$), and had no significant differences between 14 days' outcome and 21 days' outcome ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: Immunohistochemical outcomes of CD105 are highly consistent with fundus angiography outcomes of CNV changing regularity.

• KEYWORDS: choroidal neovascularization; CD105; krypton laser

Citation: Tao FF, Kang ZF, Liu J, et al. An experimental research on changes of choroid neovascularization evaluated by CD105. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(5):850-853

摘要

目的: 通过免疫组织化学法观察 CD105 对实验性脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)变化评价的准确性。

方法: 采用氩激光诱导棕色挪威(brown Norway, BN)大鼠建立实验性 CNV 模型。24 只雄性 BN 大鼠, 随机分为正常对照组(6 只)与模型组(18 只)。模型组行 659nm 氩激光视网膜光凝, 功率 360mW, 曝光时间 0.05s, 光斑直径 50 μ m。光凝后 7、14、21d 行荧光素钠和吲哚菁绿眼底血管造影, 观察 CNV 形成率及渗漏光斑平均光密度值(average optical density, AOD)变化。处死大鼠, 获得眼球标本, 观察 CNV 的组织病理学变化和 CD105 因子的表达。结果: 光凝后 7d, CNV 开始形成, 14d 和 21d 达到高峰。光凝后 7、14、21d 的 CNV 形成率分别为 77.08%、85.42%、89.58%。光凝后 7~21d, 荧光素渗漏 AOD 值逐渐增高 ($P < 0.05$), 7d 与 14d 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 14d 与 21d 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。造模后 7~21d, CD105 因子表达先升高后下降, 7d 与 14d 比较 AOD 值差异有统计学变化 ($P < 0.05$), 14d 与 21d 比较 AOD 值差异无统计学变化 ($P > 0.05$)。

结论: CD105 免疫组织化学与眼底血管造影对 CNV 变化规律的研究结果具有高度一致性, CD105 免疫组织化学评价 CNV 具有准确、易操作的优点。

关键词: 脉络膜新生血管; CD105; 氩激光

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.5.11

引用: 陶方方, 亢泽锋, 刘健, 等. CD105 评价脉络膜新生血管变化的实验研究. 国际眼科杂志 2017;17(5):850-853

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是对特异性刺激所做出的非特异性反应, 是年龄相关性黄斑

表1 光凝后不同时间 CNV 发生率与荧光素渗漏 AOD 值变化

光凝后时间	光凝斑总数	渗漏光斑数	CNV 发生率(%)	荧光素渗漏 AOD 值($\bar{x}\pm s$)	F/t	P
7d	48	37	77.08	138.37±38.81	10.88 ^a	0.000
14d	48	41	85.42	173.47±10.94	-2.945 ^b	0.006
21d	48	43	89.58	193.26±33.81	-1.659 ^c	0.106

注:a;三组之间比较;b;14d与7d比较;c;21d与14d比较。

变性、病理性近视等多种严重损害视功能眼病的共同病理产物。CNV 治疗较为棘手,病因尚不十分明确。CNV 动物模型是研究其病理过程及防治的基础,而特异性强、简便易操作的 CNV 评价指标是进行 CNV 相关实验研究的重要保障。本研究通过比较 CD105 免疫组织化学与眼底血管造影对 CNV 半定量研究的结果,评估 CD105 免疫组织化学方法观察实验性 CNV 的可行性,为今后 CNV 的相关研究提供可供选择的观察指标。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级雄性 BN 大鼠 24 只,8 周龄,体质量 180~220g,购于北京市维通利华公司。动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。10% 水合氯醛溶液(国药集团),复方托吡卡胺滴眼液(参天制药),荧光素钠注射液(爱尔康),吲哚菁绿注射液(丹东医创药业),苏木素-伊红染色剂(北京益利),SP-9000 试剂盒(中杉金桥);CD105(RD SYSTEMS)。多波长氩激光机(Lumenis Inc, Laserex LP352),眼底血管造影机(Topcon, TRC. 50DX),光学显微镜(Leica)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 24 只雄性棕色挪威(brown Norway, BN)大鼠,随机分为正常对照组(6 只)与模型组(18 只)。本实验遵守动物伦理和福利准则施行单眼造模,并取得医院伦理委员会同意。

1.2.2 造模 采用氩激光诱导 BN 大鼠建立实验性 CNV 模型。10% 水合氯醛(3.5mL/kg)腹腔注射麻醉,随机选取 1 眼为实验眼,另 1 眼不做特殊处理。麻醉后,实验眼用复方托吡卡胺滴眼液散瞳,在显微镜盖玻片上滴 1 滴玻璃酸钠滴眼液,将盖玻片压在实验眼角膜上,找到视盘,围绕视盘 1 圈、距视盘 1~2 个 PD、在相邻两血管间隙行激光光凝,以有白色气泡产生为 Bruch's 膜破裂的标准,视为造模成功。每只眼光凝 8~10 个点,激光功率 360mW,光斑直径 50 μ m,曝光时间 0.05s。

1.2.3 大鼠 CNV 发生率与渗漏强度 光凝后第 7、14、21d,行 FFA+ICGA 检查,并拍摄眼底彩照和无赤光照相。腹腔注射 10% 水合氯醛(3.5mL/kg)麻醉,散瞳,拍摄眼底彩照和无赤光照相后,以 10% 荧光素钠注射液(1mL/kg)和 8mg/mL 吲哚菁绿注射液(2mL/kg)的混合液注入腹腔。拍摄注药后 30min 内的 FFA 和 ICGA 图像。计算 CNV 的发生率, CNV 发生率=渗漏光斑数/激光光斑数 \times 100%。ICGA 的 CNV 充盈情况分为有(+)和无(-)。用 Image Pro Plus 6.0 软件分析图片,每只眼取 3 个视野的平均光密度值(average optical density, AOD)累积值作为该组的 AOD 值。渗漏光斑的定义:FFA 有荧光素渗漏,且 ICGA 呈现充盈状态。

1.2.4 HE 染色观察大鼠视网膜组织病理变化 光凝后第 7、14、21d,每组分别过量麻醉处死 6 只 BN 大鼠,摘取眼球,去除眼前节,于 4% 多聚甲醛中固定 24h 后,置于自动

脱水机脱水,浸蜡包埋,冷冻。4 μ m 连续切片,捞片、烤片,HE 染色。于 \times 200、 \times 400 镜下观察激光光凝处视网膜组织的变化。

1.2.5 免疫组织化学检测大鼠 CNV 组织中 CD105 变化 石蜡切片脱蜡水化,参照试剂盒说明书,使用 SP 法、DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分化、氨水返蓝,脱水透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察拍照。用 PBS 代替一抗做阴性对照,CD105 稀释浓度为 1:50。每组选取 5 张 \times 400 光学显微镜拍摄的图像,每张图像取 3 个包含 CNV 的视野,用 Image Pro Plus 6.0 软件分析图像的 AOD 值。

统计学分析:采用统计学软件 SPSS17.0 进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 LSD-t 检验或 Dunnett T_3 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 CNV 发生率和渗漏强度 正常 BN 大鼠眼底彩照可见圆形视盘居中,视网膜血管围绕视盘呈放射状分布,FFA 无荧光素渗漏,ICGA 示脉络膜血管呈网织状。模型组大鼠视网膜彩照可见血管间隙分布的激光斑;光凝后 7d,光斑局部周围可见视网膜水肿,光斑下可透见少量出血;光凝后 14d,视网膜水肿减轻、视网膜下出血吸收。FFA 早期,荧光素渗漏呈点状,晚期呈斑片状,渗漏荧光逐渐增强,ICGA 呈花环状渗漏。造模后 7d 出现明显渗漏,14、21d 渗漏强度逐渐增强($P < 0.05$),14d 与 21d 比较差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。7、14、21d 荧光素渗漏 AOD 值分别为 138.37±38.81、173.47±10.94、193.26±33.81。光凝后 7、14、21d 的 CNV 发生率分别为 77.08%、85.42%、89.58%。有荧光素渗漏的光斑在 ICGA 均呈充盈状态(表 1,图 1~8)。

2.2 大鼠视网膜组织病理变化 正常视网膜组织结构层次清晰,排列整齐。光凝 7d 后,光凝处视网膜组织结构紊乱,组织内陷,外核层断裂或缺损,内核层向外层视网膜迁移。增殖细胞穿过破损的 Bruch's 膜和 RPE 层向视网膜内层浸润。光凝斑处可见由迁移增殖的 RPE 细胞、纤维母细胞、中性粒细胞、色素性巨噬细胞等炎性细胞围成的纤维血管组织,形成早期 CNV。光凝后 14d, CNV 达到顶峰,纤维血管组织继续生长,可见血管内皮细胞围成的管腔,偶见其内的红细胞。光凝后 21d,纤维细胞逐渐增多,炎性细胞逐渐减少, CNV 趋向纤维化,逐渐稳定(图 9~10)。

2.3 大鼠 CNV 组织中 CD105 因子 AOD 值结果 CD105 因子标记新生血管,阳性反应物呈棕黄色。光凝后 7、14、21d, CD105 的 AOD 值分别为 0.0268±0.0057、0.0510±0.0118、0.0453±0.0115。7d 与 14d 比较,差异有统计学意义($t = -4.142, P < 0.05$)。14d 与 21d 比较,差异无统计学意义($t = 0.9726, P > 0.05$,图 11~12)。

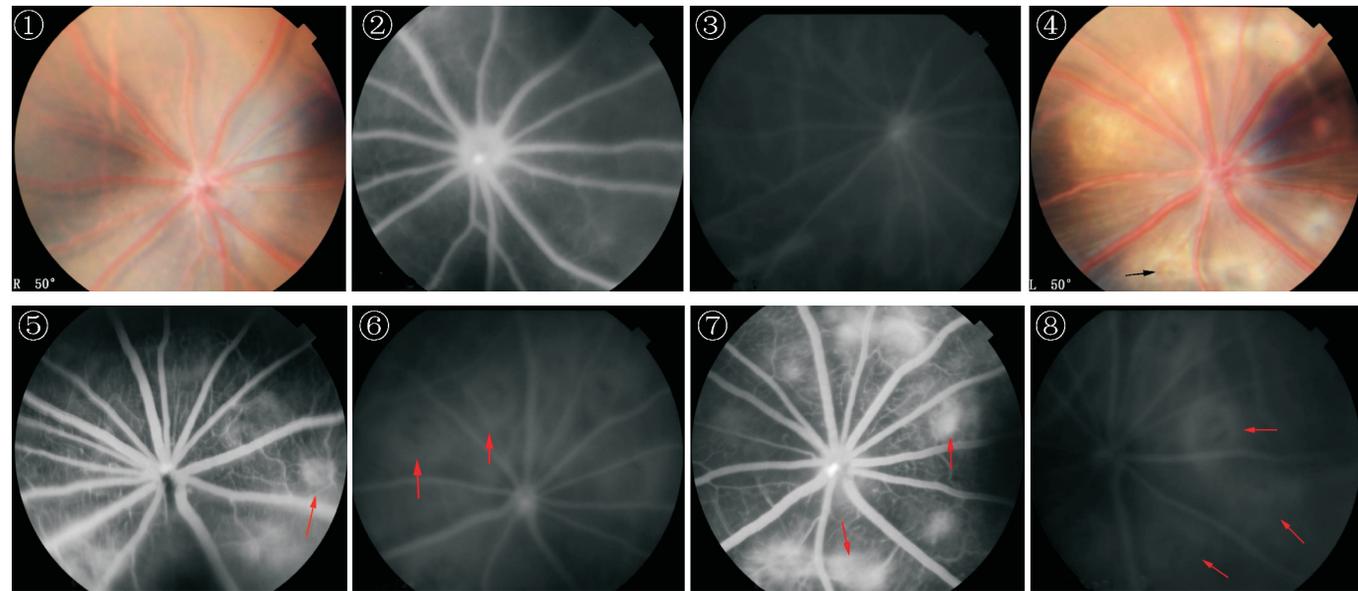


图1 正常BN大鼠眼底彩照。
 图2 正常BN大鼠眼底FFA图像。
 图3 正常BN大鼠眼底ICGA图像。
 图4 造模后7d模型组大鼠眼底彩照,可见光凝斑处少量出血(黑箭头)。
 图5 造模后7d模型组大鼠FFA早期图像,光凝斑处荧光素渗漏(红箭头)。
 图6 造模后7d模型组大鼠ICGA早期图像,光凝斑周围呈高荧光,中心呈低荧光,CNV成花环状(红箭头)。
 图7 造模后7d模型组大鼠FFA晚期图像,光凝斑处荧光素渗漏(红箭头)。
 图8 造模后7d模型组大鼠ICGA晚期图像,光凝斑周围呈高荧光,中心呈低荧光,CNV成花环状(红箭头)。

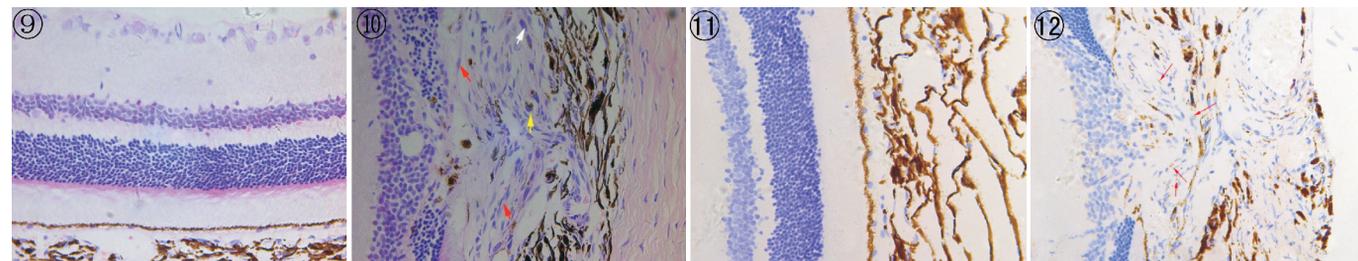


图9 正常BN大鼠视网膜切片HE染色,视网膜各层组织结构清晰,排列规则($\times 400$)。
 图10 造模后21d模型组大鼠视网膜切片HE染色,CNV从脉络膜穿过破损的Bruch's膜侵入视网膜,内核层、外核层组织向脉络膜一侧凹陷;CNV处可见迁移增殖的RPE细胞(白箭头),纤维细胞(红箭头),色素性巨噬细胞(黄箭头, $\times 400$)。
 图11 正常BN大鼠视网膜组织中未见CD105表达(SP $\times 400$)。
 图12 模型组CNV中可见CD105表达,内、外核层及脉络膜未见阳性表达(SP $\times 400$)。

3 讨论

CNV是自脉络膜长入视网膜的病理性新生血管,其血管内皮细胞的通透性异常增高,在疾病发展过程中易出现反复性渗出、出血,最终纤维化形成瘢痕,严重损伤视力。CNV的难治性与反复发作的特点,使其治疗陷入了很大的困境^[1-3]。为了更好地探索CNV防治的新思路,就需要选择合适的CNV动物模型与观察指标,进行CNV防治的实验研究。

诱导实验性CNV的方法有多种,包括视网膜下注射、激光光凝、基因重组等方法,其中激光光凝是操作简便、成功率较高的造模方法。而实验所用动物包括猴、兔、鼠和猪^[4]。激光光凝猴视网膜建立CNV虽然与人类的CNV过程相似度极高,但动物不易获得,且价格昂贵;兔视网膜脉络膜结果与人类差异较大,研究价值不高;猪体积过大,所需实验药物多且操作不易。大、小鼠动物来源充足,其中BN大鼠的视网膜结构、色素成分与人类非常相似,其

CNV具有荧光素渗漏特性,且大鼠体积适中,可操作性强^[4-7]。

本研究所用659nm氩激光,参数设置功率高达360mW,光斑直径小(50 μ m),曝光时间短(0.05s)。光凝后7d时CNV开始形成,光凝后14d达到顶峰,21d时CNV逐渐稳定,CNV发生率早期为77.08%,晚期高达89.58%,与以往研究相比模型成功率较高^[8]。本课题组以往用氩激光成功诱导三色豚鼠形成CNV,CNV发生率达68%^[9],本研究通过改进激光参数与动物种类,提高了CNV模型成功率。激光发射瞬间在局部组织引起的热效应、机械损伤效应,导致光凝后产生一系列的增生修复反应,中性粒细胞、色素性巨噬细胞分泌的多种生长因子和蛋白酶可促进CNV的形成^[10-11]。这一病理机制证实了氩激光诱导BN大鼠建立的CNV模型与人类以CNV为病理特征的眼底疾病有相同的细胞成分和相似的病理过程^[11-12]。

组织病理学检查、免疫组织化学检查、FFA和ICGA

都是观察和判断 CNV 形成与变化的指标。而 FFA 与 ICGA 检查不仅可以动态观察 CNV,还可以观察到 CNV 的形态变化,是确定 CNV 生成与变化的金标准。吲哚菁绿是大分子物质,可渗透脉络膜血管,但不能穿透 RPE 层、经视网膜血管渗漏。FFA 晚期光凝区圆盘状荧光素渗漏虽然可视为 CNV 形成的有力证据,但是 FFA 荧光素渗漏不一定都有 CNV 形成,而 ICGA 呈现充盈状态的光凝斑一定有 CNV 形成。ICGA 能更清晰地显示 CNV 的轮廓,FFA 与 ICGA 联合应用,可以提高 CNV 检测的准确性,排除非 CNV 原因所导致的高荧光结果^[8,13-14]。因此,本研究确认 CNV 形成的标准是 FFA 出现荧光素渗漏,且 ICGA 呈充盈状态。

CD105 是转化生长因子- β (transfer growth factor- β , TGF- β) 的一种受体,只表达于处于增殖状态^[15]、小血管^[16]的血管内皮细胞,正常血管内皮细胞、大血管内皮细胞无表达或仅为弱阳性表达。而 VIII、CD31、CD34 因子可以同时表达于多种血管内皮细胞^[16-17],因此 CD105 是一种特异性更强的新生血管标志物。此外,CD105 被证实与细胞周期调节蛋白 A 及 Ki-67 的增生相关,CD105 主要强表达在 Ki-67 阳性的内皮细胞。CD105 与细胞周期的相关性及其与内皮细胞增生状态的相关性,证实其更适合用于标记新生血管。免疫组织化学检查可半定量观察 CNV 组织的蛋白质表达,CD105 仅表达于新生血管内皮细胞,正常视网膜、脉络膜组织无表达。因此,CD105 可以很好地用于反映 CNV 生成情况的变化,并且本研究将阳性表达产物的 AOD 值作为观察指标,结果更具有客观性^[18]。本研究 CD105 免疫组化观察到的 CNV 变化规律与 FFA 和 ICGA 结果相一致,说明了 CD105 免疫组织化学观察 CNV 变化具有较高的准确性。并且免疫组织化学操作较 FFA 与 ICGA 更为简单、容易,仪器设备在实验室更容易获得。因此,选择 CD105 免疫组化指标观察 CNV 变化,操作性更强。

本研究使用激光光凝 BN 大鼠的方法建立实验性 CNV,具有实验动物易获得、体积小、操作简便、成功率高、重复性强的优点,适宜用于实验研究。FFA 联合 ICGA 能更有效地发现 CNV,提高 CNV 检出的正确率。CD105 能特异性表达在新生血管内皮细胞,排除其它血管内皮细胞的干扰,CD105 免疫组织化学结果与眼底血管造影结果具有高度的一致性。选择 CD105 免疫组化指标观察 CNV 变化,具有准确性高、特异性强、操作简单的优点,可以应用于 CNV 的研究。

参考文献

1 Saviano S. Combined therapy (intravitreal bevacizumab plus

- verteporfin photodynamic therapy) versus intravitreal bevacizumab monotherapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration: a 1-year follow-up study. *Dig J Ophthalmol* 2016;22(2):46-53
- 2 Rishi E, Rishi P, Sharma V, et al. Long-term outcomes of combination photodynamic therapy with ranibizumab or bevacizumab for treatment of wet age-related macular degeneration. *Oman J Ophthalmol* 2016;9(2):87-92
- 3 Sakimoto S, Sakaguchi H, Ohji M, et al. Consecutive case series with long-term follow-up of full macular translocation for myopic choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 2014;98(9):1221-1225
- 4 Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog Retin Eye Res* 2010;29(6):500-519
- 5 王立,陈辉. 脉络膜新生血管形成的模型构建与选择. *国际眼科纵览* 2014;38(2):118-122
- 6 于靖,巴俊. 脉络膜新生血管动物模型的研究进展. *东南大学学报(医学版)* 2012;31(5):632-635
- 7 杨秀梅,王雨生. 脉络膜新生血管的动物模型. *国际眼科纵览* 2006;30(3):166-170
- 8 赵世红,何守志. 氩激光诱导的大鼠脉络膜新生血管模型研究. *中华眼科杂志* 2003;39(5):298-302
- 9 张庆,田楠楠,亢泽峰,等. 加减驻景方对实验性脉络膜新生血管的作用研究. *中国中医眼科杂志* 2013;23(2):79-82
- 10 Nikkha H, Ahmadi H, Ramezani A, et al. Safe dose of intravitreal imatinib and its effect on laser-induced choroidal neovascularization; a rat-model experiment. *Int J Retina Vitreous* 2015;1:16
- 11 蔡春梅. BN 大鼠脉络膜新生血管动物模型的制作. *牡丹江医学院学报* 2005;26(3):1-3
- 12 高小燕,何守志. 核因子- κ B 在 BN 大鼠脉络膜新生血管中的表达. *眼科新进展* 2014;34(2):114-118
- 13 Rush RB, Rush SW, Aragon AV, et al. Evaluation of Choroidal Neovascularization with Indocyanine Green Angiography in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Subjects Undergoing Intravitreal Bevacizumab Therapy. *Am J Ophthalmol* 2014;158(2):337-344
- 14 李永浩,吕林,阎宏,等. 荧光素眼底血管造影和吲哚菁绿血管造影在老年性黄斑变性视网膜下出血检查中的对比研究. *中华眼底病杂志* 2003;19(3):16-18
- 15 Xu J, Wang Y, Yang X, et al. Correlation of CD 105 and Vascular Endothelial Growth Factor in Laser-induced Choroidal Neovascularization in Rats. *Yan Ke Xue Bao* 2006;22(3):166-174
- 16 徐建锋,王雨生. CD105 与脉络膜新生血管. *国际眼科杂志* 2008;8(1):126-128
- 17 Grisanti S, Canbek S, Kaiserling E, et al. Expression of endoglin in choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 2004;78(2):207-213
- 18 高艳,吴永红,张成岗. 整合平均光密度和面积比两种参数用于显微图像定量分析的初步研究. *军事医学科学院院刊* 2009;33(5):405-408