

◆方药实验研究◆

# 视网膜中央静脉阻塞模型兔中小胶质细胞的表达研究

董子奕<sup>1,2</sup>, 蒋鹏飞<sup>1,2</sup>, 彭清华<sup>1,2,3</sup>, 李文娟<sup>1,2</sup>, 李建超<sup>1,2</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208
2. 中医药防治耳鼻喉疾病湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208
3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

**[摘要]** 目的: 探讨兔视网膜中央静脉阻塞 (Central retinal vein occlusion, CRVO) 模型中小胶质细胞的数量和形态变化及引起变化的机制。方法: 将 30 只成年兔随机分为空白组和模型组, 以氩激光照射视网膜主干静脉的方法造模, 行眼底照相和眼底荧光素造影 (Fundus fluorescein angiography, FFA) 检查, 分别于 1 天、3 天、7 天、14 天和 28 天检测视神经的白细胞分化抗原 45 (Cluster of differentiation 45, CD45) 表达情况。40 倍光镜照相, 测定灰度值和累计光密度值 (IOD 值)。结果: 与空白组比较, 模型组 3 天时 CD45 表达达到高峰 ( $P < 0.05$ ), 其后模型组 CD45 表达逐步下降, 但仍有小胶质细胞活化。结论: CRVO 可以引起视神经的小胶质细胞活化, 表现为数量增多和胞体形态多样化。

**[关键词]** 视网膜中央静脉阻塞 (CRVO); 小胶质细胞; 动物实验; 兔

**[中图分类号]** R774; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 05-0001-03

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2019.05.001

## A Study on the Expression of Microglial Cells in Model Rabbits with Central Retinal Vein Occlusion

DONG Ziyi, JIANG Pengfei, PENG Qinghua, LI Wenjuan, LI Jianchao

**Abstract:** Objective: To study the changes in the number and morphology of microglial cells in the central retinal vein occlusion (CRVO) model rabbits and the mechanism of the changes. **Methods:** Divided 30 rabbits randomly into the blank group and the model group. The argon laser was used to irradiate the main vein of retina to make models. Performed fundus photography and fundus fluorescein angiography (FFA), respectively, on 1, 3, 7, 14, and 28 days of treatment so as to detect the expression of cluster of differentiation 45 (CD45) of the optic nerve, and took a 40-fold photomicrograph to measure the gray value and the integrated optical density value (IOD value). **Results:** Compared with that in the blank group, the expression of CD45 in the model group reached the peak at the third day ( $P < 0.05$ ); then the expression of CD45 in the model group was gradually decreased, but the activation of microglial cells can still be observed. **Conclusion:** CRVO can activate microglial cells in the optic nerve by manifesting/presenting the increase in number and diversity in cell morphology.

**Keywords:** Central retinal vein occlusion (CRVO); Microglial cells; Animal experiment; Rabbits

视网膜中央静脉阻塞 (Central retinal vein occlusion, CRVO) 的病因复杂, 尚未明确, 研究表明其与血栓形成因素有关<sup>[1]</sup>。一般认为高血压、高血脂、青光眼、糖尿病以及动脉硬化等都是引起 CRVO 的高危因素。CRVO 后视网膜会发生缺血缺氧, 小胶质细胞在组织缺血、缺氧中会有活化的表现, 为探究在 CRVO 中

是否存在小胶质细胞的活化, 本实验选用视神经的白细胞分化抗原 45 (Cluster of differentiation 45, CD45) 作为指标反映小胶质细胞活化的情况, 以期找到 CRVO 后小胶质细胞活化的机制。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 选用有色成年兔 30 只, 体质量 2.0 ~ 2.5 kg,

**[收稿日期]** 2018-10-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上资助项目 (30772824, 81574031); 中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目 (2017TP1018); 长沙市科技计划项目 (K1501014-31, kc1704005); 国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目 (ZK1801YK015)

**[作者简介]** 董子奕 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

**[通信作者]** 彭清华, E-mail: pqh410007@126.com。

由湖南中医药大学动物实验室提供,动物许可证号:湘医动字第30-015号,实验动物合格证号:SCXK(京)2017-0701。饲养于湖南中医药大学动物实验中心SPF级实验房,湿度50%~55%,室温(23±2)℃。实验前排除全身及眼部病变。

**1.2 主要仪器及试剂** PV9000型二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)、细胞裂解液、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天公司)、RIPA蛋白裂解液、ECL发光试剂盒、转移缓冲液、羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司)、脱脂奶粉(伊利公司)。

电泳仪、垂直板电泳槽、水平电转槽、水平摇床(北京六一仪器厂),轮转石蜡切片机(徕卡公司),超低温冰箱(中科美菱公司)、立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),净化工作台(苏州净化设备有限公司),电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司),低温台式高速离心机(赫西仪器装备有限公司),微量分光光度计(美国NanoDrop公司),PCR仪(德国Biometra公司),凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),微量移液器(德国Eppendorf公司),台式高速冷冻离心机(Thermo公司),超纯水仪(Millipore公司),紫外可见分光光度计(上海Spectrum公司),恒温摇床(金坛华特实验仪器有限公司)、扫描仪(日本Canon公司)。

**1.3 模型及标本制备** 将30只兔编号,随机平均分成空白组和模型组。模型组家兔用倍频Nd:YAG激光仪照射视网膜主干静脉进行造模,通过眼底荧光素血管造影检查(Fundus fluorescein angiography, FFA)来确定造模是否成功,未成功则补充照射,直至成功造模。分别于造模后即时、1天、14天、28天行眼底照相和FFA检查。分别于1天、3天、7天、14

天、28天,每组随机各取3只兔子,空气栓塞法处死后,立即将眼球完整取出固定于4%多聚甲醛溶液中,制作石蜡切片行免疫组化检测。

**1.4 CD45表达情况检测** 免疫组化染色,40倍镜下观察小胶质细胞的CD45表达情况。

**1.5 图像分析及统计学方法** 用MIAS-2000图形分析系统,在40倍镜下取4个不同的视野并照相。对每张相片用Image-Pro Plus 6.0系统进行灰度值以及累计光密度(IOD)的测定。实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示。统计学分析采用SPSS17.0进行正态性和方差齐性检验,及单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 2组兔眼底照相结果** 见图1。空白组主干静脉从视盘鼻侧及颞侧水平状向两边延伸,走向清晰,视盘边界清楚无水肿。模型组即时眼底照相视网膜颞侧主干静脉有长约1.5 mm阻塞,阻塞血管变白,变细;1天时主干静脉阻塞存在,阻塞血管无再通迹象;14天时无明显血管再通,视网膜水肿严重,部分血管周围出现棉绒斑;28天时眼底改变未见好转,出血继续存在。

**2.2 2组兔眼FFA图像结果** 见图2。空白组注射荧光素钠后在5~6 s即出现静脉充盈,管壁完整,没有荧光渗漏。模型组即时照相显示血管荧光充盈时间明显延长,多在8 s以上;1天时各阻塞血管无再通;14天时部分标本出现荧光遮蔽现象;28天时部分标本视网膜有荧光渗漏现象,证实有新生血管生成。

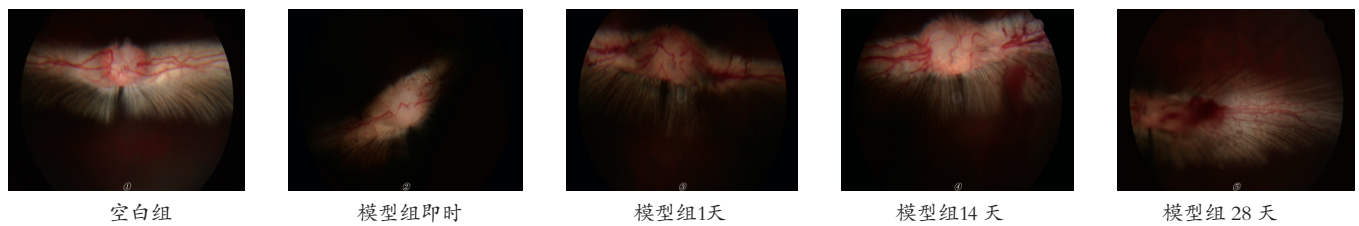


图1 2组兔眼底照相结果 (×40)

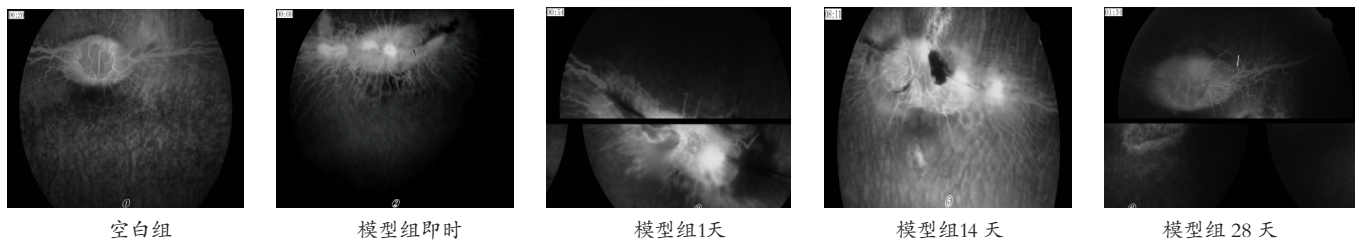


图2 2组兔眼FFA图像结果 (×40)

**2.3 2组不同时期CD45的表达结果** 见表1。空白组视神经标本上均表现为无表达或极少量表达。与空白组比较,模型组1天时CD45灰度值下降、IOD值增高( $P < 0.05$ );3天时灰度

值下降到最低、IOD值增高到最高( $P < 0.05$ );7天、14天时灰度值开始较前依次增高、IOD值开始下降,表明CD45表达开始下降;28天时灰度值继续增高、IOD值继续下降,表明

CD45 表达持续下降,提示小胶质转变为静止状态。

表1 2组不同时期 CD45 的表达结果( $\bar{x} \pm s$ )

时 间	眼数(只)	空白组		模型组	
		灰度值	IOD 值	灰度值	IOD 值
1 d	6	192.06±9.37	59.37±5.75	141.52±6.36 <sup>①②</sup>	5162.37±362.54 <sup>①②</sup>
3 d	6	194.57±10.78	53.74±4.71	86.91±5.14 <sup>①</sup>	10256.4±898.82 <sup>①</sup>
7 d	6	191.11±2.44	55.63±7.65	114.35±8.34 <sup>①②</sup>	8809.12±472.35 <sup>①②</sup>
14 d	6	198.19±2.17	54.17±8.22	146.72±4.33 <sup>①②</sup>	5462.24±423.16 <sup>①②</sup>
28 d	6	195.26±3.02	61.92±7.62	164.08±5.21 <sup>①②</sup>	4635.23±361.29 <sup>①②</sup>

与空白组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组 3 天比较,

② $P < 0.05$

### 3 小结

CRVO 发病率高,是仅次于糖尿病视网膜病变的第二大致盲性视网膜血管病<sup>[2-4]</sup>,其发生机制目前尚不明<sup>[5-8]</sup>。随着视网膜为免疫赦免区概念的打破<sup>[9-11]</sup>,视网膜小胶质细胞因有视网膜稳定的功能,其活化在 CRVO 中的研究取得了一定的进展<sup>[12-14]</sup>。视网膜小胶质细胞的免疫组化表达较多<sup>[15-16]</sup>,不同表达因子的选择对实验有一定的影响<sup>[7]</sup>,本研究选取了针对兔的 CD45 作为指标,从形态上能很清楚地显示小胶质细胞形状的多样性和数量的增多,同时髓鞘也见阳性表达,且其活化 3 天时达高峰,而后逐步转为静止状态,但 28 天观察截止时仍有部分细胞处于活化状态。

### [参考文献]

[1] PACELLA F, LA TORRE G, BASILI S, et al. Comparison between “early” or “late” intravitreal injection of dexamethasone implant in branch (BRVO) or central (CRVO) retinal vein occlusion: six-months follow-up [J]. *Cutaneous and ocular toxicology*, 2017, 36(3): 224-230.

[2] WOLF-SCHNURRBUSCH U E K. *Retinal Vein Occlusion*[M]. New Delhi: Springer, 2016: 147-150.

[3] WINEGARNER A, WAKABAYASHI T, HARA-UENO C, et al. Retinal microvasculature and visual acuity after intravitreal aflibercept in eyes with central retinal vein occlusion: an optical coherence tomography angiography study[J]. *Retina*, 2018, 38(10): 2067-2072.

[4] MCALLISTER I L, SMITHIES L A, CHEN F K, et al. Two-year efficacy of ranibizumab plus laser-induced chorioretinal anastomosis vs ranibizumab monotherapy for

central retinal vein occlusion: a randomized clinical trial[J]. *JAMA ophthalmology*, 2018, 136(12): 1391-1397.

[5] STARR M R, NORBY S M, SCOTT J P, et al. Acute retinal vein occlusion and cystic fibrosis[J]. *Int J of Ret Vit*, 2018, 4(1): 26.

[6] PRAJAPATI V A, VASAVADA D, PATEL S M, et al. A study of evaluation of various risk factors of retinal vein occlusion[J]. *Int J Res*, 2017, 2(3): 1054-1057.

[7] BUCCIARELLI P, PASSAMONTI S M, GIANNIELLO F, et al. Thrombophilic and cardiovascular risk factors for retinal vein occlusion[J]. *Eur J Intern Med*, 2017, 44: 44-48.

[8] WINEGARNER A, WAKABAYASHI T, HARA-UENO C, et al. Retinal microvasculature and visual acuity after intravitreal aflibercept in eyes with central retinal vein occlusion: an optical coherence tomography angiography study[J]. *Retina*, 2018, 38(10): 2067-2072.

[9] 胡诞宁. 胚胎干细胞衍生的视网膜色素上皮细胞移植治疗眼病[J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2014, 4(2): 104-108.

[10] GAO N N, SONG F Q, GE H Y. Research advances of miR-126 and ophthalmic diseases [J]. *Int Eye Sci*, 2017, 17(6): 1066-1068.

[11] CHEN L S, XU G X. Therapeutic potential and influencing factors of mesenchymal stem cells on retinal diseases[J]. *Int Eye Sci*, 2015, 15(3): 459-463.

[12] 赵亚飞, 唐勇, 王诗惠, 等. 小胶质细胞 P2X4 受体: 探索视网膜光损伤的新靶点[J]. *中国中医眼科杂志*, 2017, 27(1): 56-58.

[13] 董子奕, 彭清华, 李建超, 等. 兔视网膜中央静脉阻塞模型中小胶质细胞 CD40 和铁蛋白的表达[J]. *眼科新进展*, 2015, 35(2): 116-119.

[14] ZHAO X, YANG Y, ZHANG W F. Pathogenesis research progress of high altitude retinopathy[J]. *Int Eye Sci*, 2018, 18(3): 461-465.

[15] 李娟娟, 李燕, 汤志伟. 激活的小胶质细胞在大鼠视网膜缺血再灌损伤模型中的作用[J]. *眼科新进展*, 2015, 35(1): 9-14.

[16] 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[J]. *中华眼外伤职业眼病杂志*, 2018, 40(1): 18-22.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)