doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.12.01
View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2019.12.01

激光诱导的脉络膜新生血管模型构建中的麻醉剂和激光能量选择

曹乾忠[1]，洪满珠[2]，唐细兰[1,2]

(1. 中山大学中山眼科中心，眼科学国家重点实验室 510080；2. 广州爱尔眼科医院药学部，广州 510060)

[摘　要] **目的：**比较水合氯醛和阿佛丁两种药物对小鼠的麻醉作用以及不同激光能量对脉络膜新生血管造模成功率的影响。**方法：**24只C57/BL6小鼠随机分为3组，分别予以200，300和400 mW的532 nm激光进行视网膜光凝；每组再按1:1分为2个亚组，随机使用4.3%水合氯醛或1.2%阿佛丁进行小鼠腹腔注射麻醉。在激光光凝后第4，7，10和14天进行视网膜荧光素造影(Fundus Fluorescein Angiography，FFA)、SD-OCT检查，在第14天时对脉络膜行IB4染色检查。**结果：**阿佛丁和水合氯醛诱导小鼠进入麻醉时间长分别为(120±30) s和(150±45) s，持续时间分别为(30±15) min和(50±20) min，差异均有统计学意义(均P=0.0001)；发生不可逆性白内障的比率分别为2/24和1/24，麻醉导致的死亡数分别为1和0只，差异均无统计学意义(P=0.551，P=0.300)。200，300和400 mW三个激光能量组的造模成功率分别为9.38%，37.5%和93.75%，差异有统计学意义(P=0.0001)。FFA显示：造模成功的小鼠在4 d时荧光素渗漏达到高峰，随后荧光素溢漏的面积逐渐减小。**结论：**与阿佛丁相比，水合氯醛对小鼠的麻醉维持时间长且不会增加病死率和不可逆性白内障的发生率；400 mW的532 nm激光能量是诱发CNV的较好设置。

[关键词] 脉络膜新生血管；小鼠动物模型；激光；麻醉剂

Selection of anesthetic agent and laser parameter in laser-induced choroid neovascularization models

CAO Qianzhong[1], HONG Manzhu[2], TANG Xilan[1,2]

(1. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080; 2. Department of Pharmacy, Guangzhou Aier Eye Hospital, Guangzhou 510060, China)

Abstract **Objective:** To compare the narcotic effects of chloral hydrate and avertin in mouse models and the success rate of choroidal neovascularization (CNV) mouse model establishment with different energy hierarchy of laser. **Methods:** Twenty-four mice were randomized into 3 groups, the 532 nm laser was used with different power levels of 200, 300 and 400 mW for each group. In each group, the chloral hydrate was used for 4 mice and avertin for the other 4 mice at random. On day 4, 7, 10 and 14, all mice were tested by the fundus fluorescein angiography

收稿日期 (Date of reception)：2019–10–08

通信作者 (Corresponding author)：唐细兰，Email: txilan@163.com

基金项目 (Foundation item)：爱尔眼科医院集团科研基金 (AF1611D1)。This work was supported by Aier Eye Hospital Group Scientific Research Fund, China (AF1611D1).

(FFA), SD-OCT, and the choroid was stained with the isolectin B4 conjugated AF488 on day 14. **Results:** The anesthesia induction time of avertin and chloral hydrate was (120±30) s and (150±45) s, and the duration of anesthesia was (30±15) min and (50±20) min, the differences were statistically significant (all *P*=0.0001); the incidence of irreversible cataract of avertin models and chloral hydrate models was 2/24 and 1/24, the number of death in two models was 1 and without statistical significance (*P*=0.551, *P*=0.300). With the increase of laser energy, the success rate of experiments was also gradually increased, from 9.38%, 37.5% to 93.75% (*P*=0.0001) in 200, 300 and 400 mW group, respectively. According to the results of FFA, the peak of fluorescence leaking was at day 4 after the laser burning, and was gradually reduced. **Conclusion:** Compared with avertin chloral hydrate can improve the duration of anesthesia without increasing the risk of cataract and mortality. As for the 532 nm laser, the 400 mW energy could be an optimal parameter for the laser-induced CNV.

Keywords choroidal neovascularization; mice model; laser photocoagulation; anesthetic

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization，CNV)存在于许多脉络膜视网膜疾病[1]，其中年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration，AMD)是老年人失明和视力损害的主要病因之一。渗出型AMD以新生血管形成为特征，病理特点主要是 CNV形成后，穿透Bruch's膜进入到通常无血管的视网膜下空间，进而引起视网膜的损害，严重影响视力[2]。De Jong[3]发现尽管只有10%AMD患者发展成新生血管性AMD，但它却是引起90%以上AMD患者中央视力恶化的病因，从而严重影响患者的日常活动。近年来，为研究渗出型AMD的发病机制，研究者建立了许多动物模型，对研究AMD病情的发生发展具有重要意义[4-6]。很多研究[3,7]显示用小鼠作为AMD的研究模型成功率高、机制研究充分、可重复性好，且相关的检查方法成熟。麻醉剂的选择和能量设置是动物CNV模型诱导的关键，为优化构建AMD动物模型，本研究采用Phoenix Micron IV视网膜成像系统自带的532 nm激光器，选择不同激光能量对CNV造模成功率的影响，比较水合氯醛和阿佛丁两种药物对小鼠的麻醉作用，以期望对后期研究提供指导和帮助。

1 材料与方法

1.1 实验动物和药物

C57/BL6小鼠，雌性，6~8周，体重为(20±2) g，来源于广东省实验动物中心[SCXK(粤)2010-0058]，在中山大学中山眼科中心SPF级饲养环境[SYXK(粤)2015-0058]中饲养(伦理编号为2015-118)。使用的药物包括盐酸丙美卡因滴眼液(比利时爱尔康公司)、复方托比卡胺滴眼液(沈阳兴齐眼药股份有限公司)、2%羟丙基甲基纤维素滴眼液(中山大学附属眼科医院制剂)、妥布霉素眼膏(比利时爱尔康公司)、10%荧光素钠注射液[广西梧州制药(集团)股份有限公司]、阿佛丁(日本TCI公司)和阿佛丁溶剂叔戊醇(德国Sigma公司)。

1.2 小鼠分组

小鼠随机分为3组，每组8只，每组设定的激光能量分别为200，300和400 mW，光凝时间为100 ms，激光光斑大小为50 μm。

1.3 小鼠激光光凝诱导的 CNV 模型的建立

麻醉：小鼠使用4.3%水合氯醛麻醉用量为10 μL/g，1.2%阿佛丁为20 μL/g。

激光视网膜光凝：盐酸丙美卡因滴眼液滴眼1次，复方托比卡胺滴眼液滴眼散瞳2次，2%羟丙基甲基纤维素滴眼液滴眼1次。观察瞳孔散大后利用Phoenix Micron IV视网膜成像系统和激光系统(美国Phoenix研究实验室)，避开血管于小鼠视盘周约2个视盘直径，上、下、左、右各激发1次，共4点/眼；以看到有气泡产生为Bruch's膜击穿特征；完成后涂妥布霉素眼膏1次；小鼠加热垫保温、观察至苏醒。

1.4 荧光素眼底血管造影

分别于光凝后4，7，10，14 d各时间点对小鼠散瞳及麻醉，麻醉方法同前，腹腔内注射100 g/L荧光素钠注射液0.05 mL，行荧光素眼底血管造影检查。

1.5 SD-OCT 检查

小鼠麻醉后，用复方托吡卡胺滴眼液散瞳，盐酸丙美卡因滴眼液滴眼1次，2%羟丙基甲基纤维素眼水滴眼1次。用海德堡OCT仪器SPECTRALIS(德国SPECTRALIS)对小鼠视网膜眼底行OCT检查，着重对激光光凝的斑点进行断层扫描。

1.6 小鼠视网膜、脉络膜铺片和 IB4 染色

在第14天处死小鼠，以供铺片和IB4染色。颈椎脱臼法处死小鼠，摘除眼球，放入4%多聚甲醛溶液中固定2 h，剥离眼外肌等组织，然后用眼科剪去除角膜结膜和晶状体等结构，只留下视网膜和脉络膜等组织。将视网膜和脉络膜分离，放入到含有10 μg/mL，AF488偶联同工凝集素B4(Isolectin B4，IB4；美国Thermo Scientific公司)的溶液中过夜染色，温度为4 ℃，次日进行视网膜和脉络膜铺片。用荧光显微镜Zeiss Observer A1(德国Zeiss公司)进行荧光观察。

1.7 图像面积计算和统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析。图像面积计算用Image Pro Plus 6.0软件，面积大小用像素表示。率的比较用卡方检验；定量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用方差分析，两组间比较用t检验。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同麻醉药对 C57/BL6 小鼠发生白内障的影响

按照Vincent Lambert等[3]的操作步骤使用不同麻醉剂对C57/BL6小鼠进行麻醉，结果显示：相比于阿佛丁，水合氯醛诱导小鼠进入麻醉的时间更长，且麻醉时长更长；阿佛丁的毒性比水合氯醛更大，但麻醉引起的白内障差异无统计学意义(P>0.05，表1)。

2.2 不同激光能量下 CNV 造模成功率的比较

使用200，300和400 mW的激光能量造模效果见表2。结果显示：随着激光能量的递增，CNV成功率也逐渐升高。在激光能量达到400 mW时，SD-OCT显示视网膜色素上皮被击穿，呈现不连续的状态(图1)。CNV出现的FFA溢漏大小较均一，而且IB4染色面积比较大(图2，3)。FFA染色显示在第4天时渗漏最为明显，随着激光能量的提高，荧光素渗漏区增多。

表1 不同麻醉剂对C57小鼠的影响

Table 1 Effect of different anesthetics on C57 mice

麻醉剂	用量/(μL·10 g^{-1})	麻醉诱导时间/s	麻醉维持时长/min	麻醉后白内障发生率(白内障眼球/总眼球数)	麻醉后病死率(死亡数/总数)
1.2%阿佛丁	50	120 ± 30	30 ± 15	2/24	1/12
4.3%水合氯醛	100	150 ± 45	50 ± 20	1/24	0/12
t/χ^2		4.14	6.55	0.356	1.043
P		0.001	0.0001	0.551	0.307

表2 不同激光能量CNV造模成功率

Table 2 Successful rate of CNV model under different laser energy hierarchy

组别	成功点数	不成功点数	成功率/%
200 mW	3	29	9.38
300 mW	12	20	37.5
400 mW	30	2	93.75
χ^2			47.35
P			0.0001

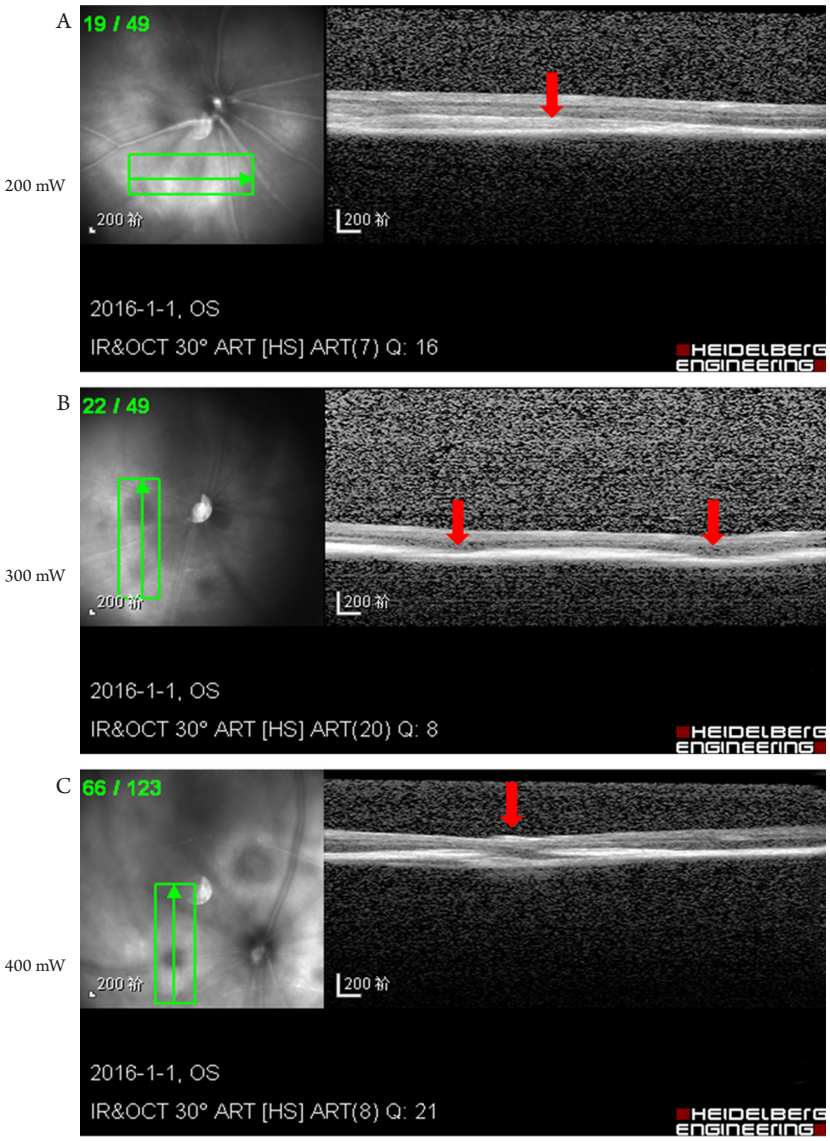


图1 不同激光能量SD-OCT检查结果

Figure 1 SD-OCT results of retinal photocoagulation areas with different laser energy

(A) 200 mW组激光光凝后，SD-OCT未见色素上皮层和Bruch's膜有穿孔；(B) 300 mW组在激光光凝处，可见视网膜色素上皮层水肿，但未见有穿孔；(C) 400 mW组，在激光光凝处可见色素上皮层不连续，Bruch's膜有穿孔。(红色箭头为激光光凝斑点)。

(A) No rupture of pigment epithelium layer and Bruch's membrane was found by SD-OCT in 200 mW group; (B) Edema but no rupture of pigment epithelium was identified in 300 mW group. (C) The rupture of pigment epithelium layer and Bruch's membrane was showed in 400 mW group. (The red arrow shows the photocoagulation spot).

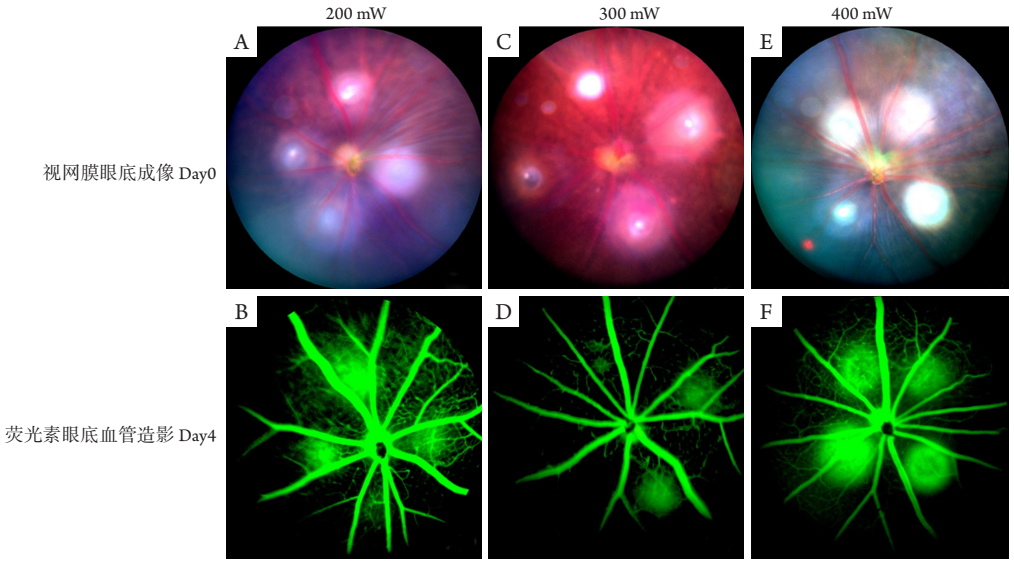


图2不同能量造模时激光斑和FFA结果

Figure 2 Fundus color photography and FFA results of laser spots with different energy hierarchy

(A) 200 mW激光造模时的激光斑；(B)造模后4 d荧光素钠血管造影，可见3个荧光素溢漏的新生血管区域；(C)300 mW激光造模时的激光斑；(D)造模后4 d荧光素钠血管造影，可见2个荧光素溢漏的新生血管区域；(E)400 mW激光造模时的激光斑；(F)造模后4d荧光素钠血管造影，可见4个大小均一的荧光素溢漏新生血管区域。

(A) Representative Laser spot in 200 mW group; (B) Representative ocular FFA images on 4 days after laser photocoagulation, three fluorescein leakage areas were shown. (C) Laser spots in 300 mW group. (D) Representative FFA images in 300 mW group, two fluorescein leakage areas were appeared 4 days after laser burn. (E) Laser spots in 400 mW group. (F) Representative FFA images in 400 mW group, four homogeneous fluorescein leakage areas were shown.

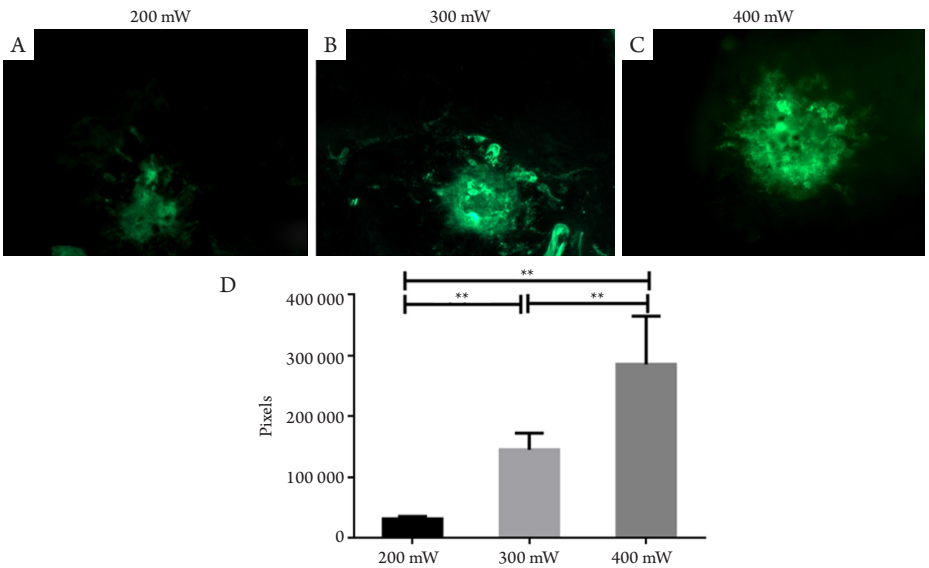


图3 光凝后14 d不同激光能量下的脉络膜平铺片IB4检查结果

Figure 3 Comparison of IB4 staining areas of flat-mounted choroid with different laser energy 14 days after laser burn

(A)200 mW组脉络膜平铺片，绿色区域为IB4阳性区(新生血管区)；(B)300 mW组脉络膜平铺片；(C)400 mW组脉络膜平铺片；(D)统计结果(× 100)。$^{**}P$<0.01。

(A) Representative images of flat-mounted choroid with IB4 staining at day 14 after laser photocoagulation, the green area was the IB4 staining area (neovascularization area) in the 200 mW group; (B) representative images in 300 mW group; (C) representative images in 400 mW group; (D) Statistical result for IB4 staining area (× 100). $^{**}P$<0.01.

3 讨论

使用激光诱导CNV能够构建理想的AMD模型[5]。动物模型构建是研究药物治疗CNV的前提。CNV又称视网膜下新生血管，常见于许多眼底疾病，如老年性黄斑变性、特发性脉络膜新生血管和中心性渗出性脉络膜视网膜病变等[8]，是这些疾病的基本病理改变。CNV来自于脉络膜毛细血管，经Bruch's膜入侵，Bruch's膜增厚、破裂以及变性等都是产生CNV的前提条件[9]。CNV的形成经历了血管内皮细胞基底膜降解、内皮细胞增殖、血管基底膜被覆，血管腔形成及周围纤维组织增生等多个病理过程。机体各种新生血管生长因子均可引起血管异常生长，而其中又以血管内皮细胞生长因子及其信号通路尤为重要，起到关键作用[10]，这为临床治疗提供了靶点。CNV常严重损害患者的视力，降低人们的生活质量[11]。

激光能量是CNV造模的关键。激光能量过低，CNV成功率很低，达不到研究的要求；如果能量过高，则会形成一个“固定孔(Solid Hole)”，这为后续用药物治疗CNV的研究带来困扰[7]。Giani等[12]也采用532 nm激光器进行C57小鼠能量梯度的对比试验，分别比较180，240，300及360 mW CNV成功率，发现能量设置为240 mW时成功率最高，这与本研究的400 mW存在差异，可能原因包括房间的湿度、温度、能量传输过程中的衰减及对焦的准确度等，都会影响激光实际作用能量的大小，机器设定的能量值与实际起作用的能量大小存在差异，因此在具体实验时，应该对激光能量进行调整，结合SD-OCT和FFA，确认所在实验室的最佳激光能够量参数。

Lambert等[13]认为水合氯醛会增加C57/BL6患白内障和腹腔脏器粘连的风险，建议用阿佛丁替代。本研究结果显示：水合氯醛不会增加C57/BL6小鼠患不可逆性白内障的发病率，在复苏率和病死率方面两组没有差别；且相对于阿佛丁，水合氯醛小鼠麻醉维持时间长，有利于小鼠实验操作。

综上所述，水合氯醛的麻醉维持时间比阿佛丁长，并未出现加重不可逆性白内障的风险；Phoenix Micron IV视网膜成像系统532 nm激光在400 mW激光能量时，能够做出CNV理想的小鼠AMD动物模型。

致谢

感谢哈佛医学院Gong Yan博士对本课题在实验设计和实验方案的优化上提出宝贵意见。

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[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(5): 762-765
DENG Baodi, LI Jia, WANG Tingkui. Recent advances in signaling pathways related to choroidal neovascularization[J]. International Eye Science, 2019, 19(5): 762-765.
2. Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related macular degeneration[J]. N Engl J Med, 2008, 358(24): 2606-2617.
3. de Jong PT. Age-related macular degeneration[J]. N Engl J Med, 2006, 355(14): 1474-1485.
4. 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.
5. Poor SH, Qiu Y, Fassbender ES, et al. Reliability of the mouse model of choroidal neovascularization induced by laser photocoagulation recommendations for the mouse laser-induced CNV model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(10): 6525-6534.
6. Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ. Animal models of age-related macular degeneration[J]. Mol Aspects Med, 2012, 33(4): 487-509.
7. Gong Y, Li J, Sun Y, et al. Optimization of an image-guided laser-induced choroidal neovascularization model in mice[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132643.
8. Danis RP, Lavine JA, Domalpally A. Geographic atrophy in patients with advanced dry age-related macular degeneration: current challenges and future prospects[J]. Clin Ophthalmol, 2015, 9: 2159-2174.
9. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration[J]. Lancet, 2012, 379(9827): 1728-1738.
10. Ferrara N, Mass RD, Campa C, et al. Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration[J]. Annu Rev Med, 2007, 58: 491-504.
11. Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, et al. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2014, 15: 151.

12. Giani A, Thanos A, Roh MI, et al. In vivo evaluation of laser-induced choroidal neovascularization using spectral-domain optical coherence tomography[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6): 3880-3887.

13. 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.

本文引用：曹乾忠, 洪满珠, 唐细兰. 激光诱导的脉络膜新生血管模型构建中的麻醉剂和激光能量选择[J]. 眼科学报, 2019, 34(4): 222-228. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.12.01

Cite this article as: CAO Qianzhong, HONG Manzhu, TANG Xilan. Selection of anesthetic agent and laser parameter in laser-induced choroid neovascularization models[J]. Yan Ke Xue Bao, 2019, 34(4): 222-228. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.12.01