

# 年龄相关性黄斑变性小鼠模型的研究进展

李昊宇<sup>1</sup>, 胡秋明<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(530200)中国广西壮族自治区南宁市,广西中医药大学研究生学院;<sup>2</sup>(530021)中国广西壮族自治区南宁市,广西医大晶亮眼科医院眼底病区

作者简介:李昊宇,男,硕士研究生,研究方向:眼科学。

通讯作者:胡秋明,毕业于广西医科大学,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,主任。doctorhu530023@163.com

收稿日期:2018-04-27 修回日期:2018-08-02

## Research progress of mouse model for age-related macular degeneration

Hao-Yu Li<sup>1</sup>, Qiu-Ming Hu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Department of Fundus Diseases, Affiliated Jingliang Eye Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

**Correspondence to:** Qiu - Ming Hu. Department of Fundus Diseases, Affiliated Jingliang Eye Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. doctorhu530023@163.com

Received:2018-04-27 Accepted:2018-08-02

## Abstract

• Age - related macular degeneration (ARMD) is the leading cause of blindness in the individuals older than 65 years in developed countries. It is a complex disease influenced by interaction of heredity, age, environment, diet, smoking and many other risk factors. Dry ARMD first damages Bruch's membrane, then affect the retinal pigment epithelium (retinal pigmented epithelium, RPE) and photoreceptors. Pathological angiogenesis and vascular permeability increasing are mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF), resulting the formation of choroidal neovascularization. ARMD in human will not be caused by none of the single risk factors. Animal models that mimic a single factor cannot reproduce all the phenotypes of ARMD but can reproduce different characteristics. These animal models provide an entry point for studying the disease mechanism and finding the target of drug action. Specific modeling methods include laser modeling, gene modeling, feeding, oxidation and other models. This article summarizes and reviews the domestic and foreign classic literatures in this field to help researchers to select the suitable methods and provide new ideas for modeling.

• **KEYWORDS:** age - related macular degeneration; animal experiment; mouse model

**Citation:** Li HY, Hu QM. Research progress of mouse model for age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(9):1616-1621

## 摘要

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)是一种由遗传、年龄、环境、饮食、吸烟等多种危险因素相互作用导致的复杂疾病。干性ARMD首先损害Bruch膜,随后影响视网膜色素上皮(retinal pigmented epithelium, RPE)和光感受器等,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可介导病理性血管形成和血管通透性增高,形成脉络膜新生血管。其中任何单一危险因素均不足以导致人类发病,仅模仿单一因素的动物模型无法复制出ARMD的所有表型,但是可以复制出ARMD的不同特征。这些动物模型为疾病机制研究和寻找药物作用靶点提供了切入点。具体造模方法有激光造模、基因造模、饲喂造模、氧化造模和利用其他模型等。本文总结了国内外此方面的经典文献并加以综述,旨在协助研究者选取符合研究目的的造模方法,并提供新的造模思路。

**关键词:**年龄相关性黄斑变性;动物实验;小鼠模型

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.9.13

**引用:**李昊宇,胡秋明. 年龄相关性黄斑变性小鼠模型的研究进展. 国际眼科杂志 2018;18(9):1616-1621

## 0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)是导致全球范围内3~5千万人视力受损的重要因素。在发达国家,ARMD是65岁以上人群高发的致盲性疾病<sup>[1-2]</sup>。ARMD病程长,几乎均以无新生血管生成的干性ARMD起病,晚期可进展为地图样萎缩(geographic atrophy, GA),或有脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)生成的湿性ARMD(wARMD)<sup>[3]</sup>。与视网膜色素上皮(retinal pigmented epithelium, RPE)退化性改变有关的玻璃膜疣(drusen)形成是早期干性ARMD的典型特征,随后可出现RPE和光感受器的萎缩,RPE异常包括非地图样萎缩、局部色素增生和地图样萎缩。新生血管形成是湿性ARMD发病重要机制<sup>[4]</sup>。可以选取这些病理表现为切入点进行造模。造模时,应着重考虑到实验目的、技术水准、实验周期和可重复性等因素。本文将人眼与小鼠眼视网膜解剖结构及生理功能加以对比,并对利用小鼠制作ARMD模型展开综述。

## 1 实验动物的遴选

就ARMD而言,如Bruch膜厚度改变、色素上皮层下沉积物、玻璃膜疣的出现、免疫细胞改变,以及ERG等检查异常均有报道,这些病理变化为造模提供了思路和方

向。ARMD 的动物模型已通过灵长类动物、啮齿类动物、兔子和猪等实验动物实现。灵长类动物眼底解剖结构与人类最为相似,且发病机制相似度高。但由于灵长类动物实验成本较高、饲养难度较大、实验周期较长等特点,甚至存在伦理学问题,对于实验室研究而言仍存在着一些不便与弊端。啮齿类动物与人类拥有较多的同源基因,且具有成本低、繁殖快、便于基因操作等优势<sup>[5]</sup>。没有任何一种现存的动物模型可以展现 ARMD 所有的病理改变,而纵观各种动物模型,小鼠模型能较为突出地在类脂质代谢和免疫调节异常等方面与人类 ARMD 表现出更大的相似性,同时便于观察 Bruch 膜、RPE 和光感受器损伤以及 CNV 等<sup>[6]</sup>。小鼠模型最大的劣势是小鼠眼底不具备黄斑结构,其次是固有免疫和适应性免疫系统均与人类存在差异<sup>[7]</sup>。

## 2 人与小鼠视网膜的差异

人与小鼠视网膜最显著的差异就是小鼠视网膜不存在黄斑结构<sup>[8]</sup>,而且二者光感受器数目也不同。小鼠起源于夜行物种,以视杆细胞(占光感受器细胞的 97%)为主,视锥细胞则只有 3% 左右<sup>[9]</sup>。与人类的 S(蓝光)、M(绿光)、L(红光)三型视锥细胞不同的是,小鼠只有 S 和 M 两种视锥细胞<sup>[10]</sup>。而小鼠视网膜中视锥细胞平均密度与灵长目动物大体一致。从进化角度而言,视锥细胞先进化,而后一定数目的视锥细胞可能参与了视网膜组织的形成<sup>[11]</sup>。小鼠模型和人类 ARMD 发病基本病理改变类似,均为脂褐质沉积、玻璃膜疣、RPE 和光感受器萎缩以及 CNV 形成等<sup>[8]</sup>。整体而言,小鼠视网膜与人类周边视网膜结构大致相同,可满足动物实验的需求。

## 3 干性 ARMD 小鼠模型的建立

无新生血管性 ARMD 又称干性 ARMD,眼底出现 drusen 是干性 ARMD 最早期的症状,晚期可进展为 GA 或 wARMD。干性 ARMD 小鼠造模主要目的是诱导小鼠视网膜产生 drusen 和光感受器萎缩等,各种方法概述见表 1。

**3.1 通过改变饲养模式建模** 改变饮食血糖指数(dGI)可影响 ARMD 的发病风险已得到证实<sup>[12]</sup>,也可通过饮食干预的方法来引起 ARMD 的发病。RPE 细胞吞噬光感受器脱落物质和其他代谢产物的功能减弱时,可导致 drusen 的形成,drusen 位于 RPE 和 Bruch 膜之间<sup>[13]</sup>,其主要成分中含有晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)<sup>[14]</sup>,与冠状动脉粥样硬化的斑块中成分类似。与低血糖指数(glycemic index, GI)饮食相比,高 GI 食物提供更高的血糖水平的同时,也增加了患 ARMD 的风险,且高 GI 饮食会加速视网膜损伤的出现,这可能与高 GI 饮食提高了视网膜内毒性 AGEs 水平有关。高 GI 饲养模式喂养的 C57BL/6 小鼠可出现基底沉着物等视网膜损伤,可用于模拟 ARMD 疾病的早期阶段<sup>[15]</sup>。

在 4 月龄 C57BL/6 小鼠的饮水中添加浓度为 8g/L 氢醌(hydroquinone, HQ)5d 或 3wk,即可改变单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的表达并提高 VEGF/PEDF 的比例,在吸烟的干性 ARMD 患者中,随着 VEGF/PEDF 比值的增加有利于血管生成,或许会促进 drusen 积累和加快向 CNV 发展<sup>[16]</sup>。我国学者同样通过 8g/L 氢醌饲养 C57BL/6 小鼠的方式在较短时间内诱导出 Bruch 膜出现类 drusen 样表现与 RPE 损伤的模型,可用于早、中期 ARMD 和评价药物治疗作用的相

关研究<sup>[17]</sup>。利用浓度为 8g/L HQ 饲喂小鼠来制作干性 ARMD 模型已经明确,加大饲喂浓度或延长时间来制作湿性 ARMD 模型有待进一步研究。

C57BL/6 小鼠属近交系,遗传背景清晰、稳定,个体差异较小,且所需药量小,饲养方便<sup>[18]</sup>,适合用于饲喂建模。饲喂法通常是通过改变某种物质的进食量来进行造模,造模周期和成功率与实验动物的食量和个体差异有关。而且 HQ 为香烟烟雾中物质,人类并不会直接大量食用这种物质。饲喂法常用来研究某一种因素对 ARMD 的影响,且部分物质的摄入方式与实际不符。

**3.2 通过氧化机制建模** 维持人脑及视网膜内胆固醇、脂蛋白等物质在正常而稳定的水平是确保器官形态及功能健全的重要前提<sup>[19]</sup>。有实验证实,ARMD 患者体内的脂质过氧化物水平高于正常值<sup>[20]</sup>,会对视网膜形态结构与视功能造成损伤。抗氧化机制的衰弱和过度氧化会使眼部出现 ARMD 的相关症状,可以利用氧化损伤的方式来模拟 ARMD 病理改变。吸烟和光化学损伤是常见的氧化损伤。吸烟是 ARMD 发病的重要危险因素<sup>[21-22]</sup>,吸烟者患 ARMD 风险要比非吸烟者高 2~3 倍<sup>[23]</sup>。与吸烟相关的血管炎症、内皮调节异常、氧化损伤、毒性作用与组织病理改变等为 ARMD 的发生、发展提供了有利的微环境<sup>[22]</sup>。烟草烟雾中含有 4 000 余种毒物,最主要的是具有强氧化作用的物质,如一氧化氮、一氧化碳和 HQ 等。将小鼠直接暴露在烟草烟雾或与烟雾相关的氧化物分子中,可导致 RPE 和 Bruch 膜物质沉淀和损伤,新生血管长入 Bruch 膜、脉络膜 CCL-2 和 VEGF、PEDF 表达改变等。吸烟对 RPE、脉络膜血管和 Bruch 膜的损伤以及 ARMD 的发病或由上述强氧化物质引起<sup>[24]</sup>,通过香烟烟雾制作小鼠 ARMD 模型的成功更能证明这一理论。光照可诱导视紫红质和脂褐素等感光分子产生活性氧中间体,从而对视网膜造成氧化损伤,其机制与激光制作 CNV 模型不同。持续光照可制作大鼠的萎缩性 ARMD 模型,对小鼠的作用和具体光照强度及波长等需进一步探究。这种方法理论上具有可行性,操作简单且无侵入性,造模周期较短,有良好前景。

视网膜内主要抗氧化物质为超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),SOD(1~3)中以 SOD1 最为活跃<sup>[25-26]</sup>。视网膜细胞的氧化损伤可表现出类似干性 ARMD 的表现。可通过抑制 SOD1 活性来诱导视网膜细胞的氧化应激反应,从而制作干性 ARMD 模型。可使用 SOD1<sup>-/-</sup>小鼠直接建模,与野生型(wild-type, WT)小鼠相比,SOD1<sup>-/-</sup>小鼠的内核层和外核层的厚度会随着年龄的增长逐渐下降,其视网膜结构和功能的改变也会随着年龄的增长愈为显著<sup>[27]</sup>。在成年 C57BL/6 小鼠视网膜下注射腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)核酶可达到敲除 SOD2 mRNA 的目的,从而制作早期 ARMD 模型<sup>[28]</sup>。SOD1<sup>-/-</sup>小鼠视网膜变性进程较为缓慢,而 SOD2<sup>-/-</sup>小鼠视网膜变性较为快速和严重<sup>[27]</sup>。

对 C57BL/6J 小鼠进行尾静脉注射碘酸钠(NaIO<sub>3</sub>)可为研究 ARMD 的发病机制与治疗提供有效的动物模型<sup>[29]</sup>。NaIO<sub>3</sub>是一种无机氧化剂,可引起视网膜的氧化应激反应,视网膜内 SOD 和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性均呈明显下降趋势,NaIO<sub>3</sub>用量越大,视网膜细胞损伤出现时间越早、程度越重<sup>[30]</sup>。NaIO<sub>3</sub>对视网膜的损伤

表1 干性 ARMD 小鼠模型造模方法概要

造模方法	主要机制	造模对象	关键步骤与核心技术	损伤类型	优势、适用研究	局限与不足
改变饲喂模式	高 GI 饮食提高视网膜内毒性 AGEs 水平	C57BL/6 小鼠	饲喂高 GI 饲料	drusen、基底层沉着物形成	操作简单,适用于研究饮食因素与 ARMD 的关系	造模效果差异大,研究因素单一
	摄入 HQ 改变 MCP-1 表达,提高 VEGF/PDGF 比例	C57BL/6 小鼠	饮水中加入 8g/L HQ 5d 或 3wk	drusen 形成与 RPE 损伤	操作简单,适用于研究 HQ 与 ARMD 的关系和评价药物疗效	造模效果差异大,毒物摄入方式与实际不符,研究因素单一
氧化损伤	香烟烟雾引起的氧化损伤	C57BL/6 小鼠	将小鼠暴露在香烟烟雾或相关分子中	Bruch 膜和 RPE 损伤	操作简单,适用于研究吸烟与 ARMD 的关系	研究因素单一
	持续光照引起的氧化损伤	SD 大鼠	将大鼠暴露在 1 000Lx 明亮光持续照射 24h 或蓝光 6h	萎缩性病灶	造模时间短,适用于研究光损伤与 ARMD 的关系	小鼠实验需进一步完善,有较好前景
SAM 品系	注射腺病毒核酶敲除 SOD2 mRNA	C57BL/6 小鼠	小鼠视网膜下注射腺病毒核酶	内核层和外核层厚度下降	适用于研究氧化应激损伤与 ARMD 的关系	SOD1 <sup>-/-</sup> 小鼠视网膜变性进程较为缓慢,SOD2 <sup>-/-</sup> 小鼠视网膜变性较为快速和严重
	抑制抗氧化物质 SOD 诱发氧化损伤	SOD <sup>-/-</sup> 小鼠	直接利用 SOD <sup>-/-</sup> 小鼠	内核层和外核层厚度下降		
	利用无机氧化剂 NaIO <sub>3</sub> 诱发氧化损伤	C57BL/6J 小鼠	小鼠尾静脉注射 NaIO <sub>3</sub>	RPE、感光细胞和内层视网膜损伤	病变程度与注射剂量成正比,适用于研究氧化应激损伤与 ARMD 的关系	药物注射剂量不明确
基因工程	改变基因表达,模拟病理表现	abcr <sup>-/-</sup> 小鼠	敲除 ABCR 基因	黄斑区 RPE 萎缩	直接利用 SAMP 模型,适用于研究年龄与 ARMD 的关系	SAMP 品系的潜在影响因素
基因工程		Efemp1 <sup>R345W/R345W</sup> 小鼠	转基因技术	干性 ARMD 表现		
		Timp3 <sup>S156C/S156C</sup> 小鼠	转基因技术	Bruch 膜增厚和 RPE 萎缩		
		Ccl2 <sup>-/-</sup> 小鼠	敲除 CCL2 基因	GA、外层视网膜萎缩、CNV	从基因水平模拟病理表现	操作要求较高
		Ccr2 <sup>-/-</sup> 小鼠	敲除 CCR2 基因	drusen 形成		
		Cx3cr1 <sup>-/-</sup> 小鼠	敲除 CX3CR1 基因	drusen 形成		
阿尔兹海默模型	基因表达与干性 ARMD 相符	5XFAD 小鼠	直接利用 5XFAD 小鼠	干性 ARMD 表现	适用于 β-淀粉样蛋白相关性 ARMD 的研究	阿尔兹海默模型的潜在影响因素

作用已得到证实,会先后引起 RPE、感光细胞和内层视网膜的损伤<sup>[31]</sup>。较大剂量(40~75mg/kg)给药会导致视网膜出现迅速、严重、不可逆的损伤,不利于进一步研究。较小剂量(15~30mg/kg)的给药量造成的视网膜损伤太轻,建模需要时间长<sup>[29]</sup>。不同剂量药物注射取得的效果不同,制作干性 ARMD 模型时需严格定量,以避免因药物过量致 CNV 形成,而确切剂量尚存争议,需进一步摸索并加以完善。

**3.3 利用 SAM 品系建模** 人类与啮齿类动物视网膜光感受器丢失与年龄增长有关均已被证实<sup>[32-33]</sup>。将 AKR/J 品系小鼠进行选择近交,可得到加速衰老小鼠(Senescence-Accelerated Mouse, SAM)品系。SAM 小鼠具有诸多衰老特征,如毛发脱落、皮肤损伤、淀粉样变性和寿命缩短等。可分为 9 种易衰老型 SAMP(1~9)和 4 种抵抗衰老型

SAMR(1~4)<sup>[34-35]</sup>。SAMP 小鼠寿命更短,在 8 月龄时即可具有 SAMR 小鼠双倍的衰老特征<sup>[36]</sup>。SAMP8 小鼠寿命较短,且能表现出 ARMD 的特征性表现<sup>[37]</sup>。在这些小鼠中,RPE 和 Bruch 膜损伤均可被观察到。有 40% 11 月龄以上的 SAMP8 小鼠可观察到内层 Bruch 膜-脉络膜新生血管<sup>[38]</sup>。这种动物模型不受小鼠年龄限制,不必等待小鼠自然衰老,可利用小鼠品系特点迅速达到“衰老”状态,适用于研究年龄与 ARMD 关系的相关研究。

**3.4 通过基因工程建模** 敲除小鼠 ABCR 基因突变所得 abcr<sup>-/-</sup>小鼠可出现较为明显的 RPE 增厚和破坏<sup>[39]</sup>。Efemp1<sup>R345W/R345W</sup>小鼠具有与干性 ARMD 类似的病理改变<sup>[40]</sup>。30 月龄 Timp3<sup>S156C/S156C</sup>小鼠可表现出 Bruch 膜增厚和 RPE 萎缩等病理改变<sup>[41]</sup>。随着 Ccl2<sup>-/-</sup>小鼠年龄的增长,会出现 GA、进行性外层视网膜变性,甚至形成 CNV。

表2 湿性 ARMD 小鼠模型造模方法概要

造模方法	主要机制	造模对象	关键步骤与核心技术	损伤类型	优势、适用研究	局限与不足
激光照射	激光照射造成 Bruch 膜断裂,诱导新生血管自脉络膜生成	C57BL/6 小鼠	激光光凝小鼠视网膜	Bruch 膜断裂, CNV 形成	效果显著,重复性和可控性较好	CNV 产生机制与 ARMD 尚存在不同
基因工程	靶向敲除 RPE 细胞的 VEGF 受体 1,在基因层面诱导 CNV 形成	VMD-Cre 小鼠与 Flt-1 <sup>loxP/loxP</sup> 小鼠	VMD-Cre 小鼠与 Flt-1 <sup>loxP/loxP</sup> 小鼠杂交	CNV 形成	效率和成功率高	
PCV 造模	HTRA1 基因表达增加与 PCV 有关		相关基因技术	Bruch 膜、脉络膜损伤,PCV 和 CNV 形成		操作水平要求较高
RAP 造模	表型符合 RAP	VLDLr <sup>-/-</sup> 小鼠	相关基因技术	典型的 RAP 的组织学和血管形态改变	重复性较好	
	表型符合 RAP	rho/VEGF 小鼠	相关基因技术	接近 RAP 特征的病理改变		

9 月龄 Ccr2<sup>-/-</sup>小鼠可发现类似 drusen 的病理改变<sup>[42]</sup>。18 月龄 Cx3cr1<sup>-/-</sup>小鼠亦可在眼底检查时发现类似 drusen 的病变<sup>[43]</sup>。Cd46<sup>-/-</sup>小鼠可用来制作干性 ARMD 模型,其光感受器损伤可从 2 月龄持续到 12 月龄<sup>[44]</sup>。通过基因工程建模可获得明确的遗传背景,但对实验操作要求往往较高。

**3.5 利用其他模型** 利用透射电镜观察成熟 5XFAD 小鼠的 RPE、Bruch 膜、光感受器和脂褐素沉着等,发现其基因表达符合干性 ARMD 的病理改变。广泛运用于阿尔兹海默病的 5XFAD 小鼠也可用来进行干性 ARMD 的相关研究,尤其是  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid beta, A $\beta$ ) 相关性 ARMD 的研究<sup>[45]</sup>。

#### 4 湿性 ARMD 小鼠模型的建立

湿性 ARMD (wARMD) 即为新生血管性 ARMD (neovascular age-related macular degeneration, nARMD),其典型病理改变为新生血管形成,包括 CNV 形成和视网膜血管瘤样增生 (retinal angiomatous proliferation, RAP)。尚存在一种名为息肉样脉络膜血管病变 (polypoidal choroidal vasculopathy, PCV) 的特殊类型。PCV 常见病理改变为积液、出血和 RPE 层脱离等<sup>[3]</sup>。当前 nARMD 的主要建模思路是诱发新生血管产生和视网膜层间脱离,各种方法概述见表 2。

**4.1 通过激光照射建模** 通过激光照射制作小鼠湿性 ARMD 模型已在各种实验中广泛使用<sup>[46]</sup>。最早使用激光损伤小鼠 Bruch 膜引起 CNV 制作 ARMD 模型的是 Campochiaro 团队<sup>[47]</sup>,该模型中认为炎症细胞分泌的大量促进血管生成的因子是导致新生血管生成的主要因素<sup>[48]</sup>。激光照射会造成 Bruch 膜断裂,诱导新生血管自脉络膜生成并进入视网膜下区域,以此模拟湿性 ARMD 的特征<sup>[47]</sup>。使用激光建模在方法学上已日趋完善,如使用绿色氩激光诱导小鼠 CNV 时,光凝部位出现气泡即意味着 Bruch 膜断裂,如此建模效果较好<sup>[49]</sup>。缺乏 IL-27 的 EB13 小鼠在受到激光损伤时,CNV 的生长程度会比 C57BL/6 小鼠更加剧烈<sup>[50]</sup>。利用波长为 810nm 的二极管极光,调整光斑为 75nm、输出能量为 130 ~ 140mW、曝光 0.1s 的方式,即可在 1wk 时间诱发小鼠眼底 CNV,发生率为 60%。波长为 647nm 的氦激光,在光斑大小为 50nm、输出能量 250mW、曝光时间为 0.05s 的情况下,可以在 1wk 时间诱发 CNV,发生率为 60% ~ 70%。波长为 514nm

的氩激光以 514nm 的波长、50nm 的光斑、150mW 的输出能量,曝光时间为 0.1s,可以在 1wk 时间诱发小鼠眼底 CNV,发生率为 62%<sup>[51]</sup>。激光建模效果显著,重复性和可控性都具有优势,激光建模的方式在今日依然广泛使用。但这种方法对病变的模拟为激光直接损伤导致 CNV,且损伤程度较重,甚至出现激光穿透视网膜、脉络膜的情况,其发病机制与人眼湿性 ARMD 尚有不同。

**4.2 通过基因工程建模** 可以通过 VMD-Cre 小鼠与 Flt-1<sup>loxP/loxP</sup>小鼠杂交,靶向敲除 RPE 细胞的 VEGF 受体 1,这种方法可在基因层面于 28d 内诱导病灶大小不一的 CNV 产生<sup>[52]</sup>。这种建模方法效率和成功率较高,且不需反复筛选实验动物。

**4.3 PCV 和 RAP 建模** PCV 的主要特征为脉络膜血管的透明化和息肉样扩张<sup>[53-54]</sup>。在 20 世纪 90 年代,PCV 被认为是 CNV-ARMD 的一种特殊表现形式<sup>[53]</sup>。随着对 PCV 在基因、蛋白质组学和影像学等领域研究的深入,PCV 似乎与 CNV-ARMD 的联系并不像以前认为的那样紧密<sup>[55]</sup>。由此可见,PCV 与 CNV-ARMD 在疾病特征和动物建模上均有不同。HTRA1 基因被认为与 CNV 的形成有关<sup>[56-57]</sup>,对于中国患者而言,SNPs 的 rs3753394、CFH 的 rs800292 和 HTRA1 的 rs11200638 是 PCV 的重要危险因素<sup>[58]</sup>。在小鼠视网膜 RPE 层表达过量 HTRA1 基因可导致 Bruch 膜和脉络膜血管的损伤,引起 PCV 和 CNV<sup>[59]</sup>。上述方法可获得较为准确的基因表型,且重复性较好。有关 PCV 的小鼠模型相对较少,现已明确 HTRA1 基因在其中扮演重要角色,更加完善、有效的建模方法仍需进一步探索。

RAP 这一概念最早于 2001 年被提出,被当作是 nARMD 的一种特殊类型<sup>[60]</sup>。多于 15% 的 nARMD 患者存在 RAP,常伴随色素上皮脱离和网状玻璃膜疣等改变<sup>[61]</sup>。WT 小鼠视网膜中表达一定量的极低密度脂蛋白受体,尤其是在视网膜血管内皮细胞和 RPE 细胞中。VLDLr<sup>-/-</sup>小鼠可表现出典型的 RAP 的组织学和血管形态的改变,可作为重复性较好的 RAP 动物模型<sup>[62-63]</sup>。使用 rho/VEGF 小鼠亦可诱导出接近 RAP 特征的病理改变<sup>[64]</sup>。

#### 5 总结

本综述回顾了多种小鼠 ARMD 模型的制备方法,每种方法都存在独特的优点与局限性。饮食和烟草模型可着重研究单个危险因素 (饮食因素或吸烟) 对 ARMD 发

生、发展的影响。但建模时间较长,实验动物对刺激因素的反应也与个体间差异有关,需反复筛选实验动物。激光建模重复性好、易量化,但形成的损伤性质与实际发病并不完全一致。通过基因工程制作的模型可避免这种物理损伤带来的影响,从基因层面诱发的损伤更接近实际发病,但转基因操作相对复杂,对研究者的操作水平要求较高。注射无机氧化剂 NaIO<sub>3</sub>建模操作便捷,但注射剂量与损伤效果的关系还需进一步明确,这也提示了通过药物制作干性 ARMD 模型时需要注意病理改变是否已经成为湿性 ARMD。出于对建模效率、稳定性及可行性的考虑,制作干性 ARMD 模型时可选用氧化机制建模或直接利用 SAM 品系,激光损伤模型是制作湿性 ARMD 模型的较优选择。利用其他动物模型来进行人类疾病研究,或许还存在着我们未知的其他潜在影响因素,同时也需要结合实验目的来选择恰当的建模方式。上述一切缺陷与局限还需研究者在实践中进一步思考与探索。

#### 参考文献

- 1 Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, et al. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(1):1-29
- 2 Friedman DS, O'Colmain BJ, Muñoz B, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122(4):564-572
- 3 Ferris Fd, Fine SL, Hyman L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol* 1984;102(11):1640-1642
- 4 Miller JW, Le Couter J, Strauss EC, et al. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmol* 2013;120(1):106-114
- 5 Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ. Animal models of age related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):487-509
- 6 Fletcher EL, Jobling AI, Greferath U, et al. Studying age-related macular degeneration using animal models. *Optom Vis Sci* 2014;91(8):878-886
- 7 Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004;172(5):2731-2738
- 8 Ramkumar HL, Zhang J, Chan CC. Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). *Prog Retin Eye Res* 2010;29(3):169-190
- 9 Carter-Dawson LD, LaVail MM. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 1979;188(2):245-262
- 10 Szél A, Röhlich P, Caffé AR, et al. Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J Comp Neurol* 1992;325(3):327-342
- 11 Wikler KC, Rakic P. Distribution of photoreceptor subtypes in the retina of diurnal and nocturnal primates. *J Neurosci* 1990;10(10):3390-3401
- 12 Chiu CJ, Milton RC, Gensler G, et al. Association between dietary glycemic index and age-related macular degeneration in nondiabetic participants in the age-related eye disease study. *Am J Clin Nutr* 2007;86(1):180-188
- 13 Abdelsalam A, Del Priore L, Zarbin MA. Drusen in age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1999;44(1):1-29
- 14 Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(23):14682-14687
- 15 Weikel KA, FitzGerald P, Shang F, et al. Natural history of age-related retinal lesions that precede AMD in mice fed high or low glycemic index diets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(2):622-632

- 16 Pons M, Marin-Castaño ME. Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2011;6(2):e16722
- 17 安娜,陈强,梁丽娜,等. 氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型的建立. *眼科新进展* 2016;36(7):605-608
- 18 Dithmar S, Sharara NA, Curcio CA, et al. Murine high-fat diet and laser photochemical model of basal deposits in Bruch membrane. *Arch Ophthalmol* 2001;119(11):1643-1649
- 19 Peiretti E, Mandas A, Abete C, et al. Age-related macular degeneration and cognitive impairment show similarities in changes of neutral lipids in peripheral blood mononuclear cells. *Exp Eye Res* 2014;124:11-16
- 20 Nowak M, Swietochowska E, Wielkoszyński T, et al. Changes in blood antioxidants and several lipid peroxidation products in women with age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol* 2003;13(3):281-286
- 21 Myers CE, Klein BEK, Gangnon R, et al. Cigarette smoking and the natural history of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmol* 2014;121(10):1949-1955
- 22 Velilla S, García-Medina JJ, García-Layana A, et al. Smoking and age-related macular degeneration: review and update. *J Ophthalmol* 2013;2013:895147
- 23 Thornton J, Edwards R, Mitchell P, et al. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye* 2005;19(9):935-944
- 24 Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Catanuto P, et al. Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(2):729-737
- 25 Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem* 2005;74:563-593
- 26 Behndig A, Svensson B, Marklund SL, et al. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(3):471-475
- 27 Hashizume K, Hirasawa M, Imamura Y, et al. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am J Pathol* 2008;172(5):1325-1331
- 28 Justilien V, Pang JJ, Renganathan K, et al. SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(10):4407-4420
- 29 姜双,徐海月. 碘酸钠对小鼠视网膜形态和功能变化的影响. *国际眼科杂志* 2016;16(6):1036-1038
- 30 朱颖婷,邓新国,高杨,等. 碘酸钠诱导大鼠视网膜损伤的病理改变和 SOD、CAT 的变化. *中国病理生理杂志* 2010;26(09):1851-1854
- 31 Tao Z, Dai J, He J, et al. The influence of NaIO<sub>3</sub>-induced retinal degeneration on intra-retinal layer and the changes of expression profile/morphology of DA-ACs and mRGCS. *Mol Neurobiol* 2013;47(1):241-260
- 32 Gao H, Hollyfield JG. Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(1):1-17
- 33 Katz ML, Robison WG. Evidence of cell loss from the rat retina during senescence. *Exp Eye Res* 1986;42(4):293-304
- 34 Takada Y, Uyama M, Ohkuma H, et al. Immunohistological study in Bruch's membrane of senescence accelerated mouse. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1994;98(10):955-961
- 35 Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, et al. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr* 1994;19(2):185-192
- 36 Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp Gerontol* 1997;32(1-2):105-109

- 37 Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, *et al.* Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp Gerontol* 1997;32(1-2):161-169
- 38 Majji AB, Cao J, Chang KY, *et al.* Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(12):3936-3942
- 39 Mata NL, Tzekov RT, Liu X, *et al.* Delayed dark-adaptation and lipofuscin accumulation in abcr+/- mice: implications for involvement of ABCR in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1685-1690
- 40 Fu L, Garland D, Yang Z, *et al.* The R345W mutation in EFEMP1 is pathogenic and causes AMD-like deposits in mice. *Hum Mol Genet* 2007;16(20):2411-2422
- 41 Weber BHF, Lin B, White K, *et al.* A mouse model for Sorsby fundus dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(8):2732-2740
- 42 Ambati J, Anand A, Fernandez S, *et al.* An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 2003;9(11):1390-1397
- 43 Combadière C, Feumi C, Raoul W, *et al.* CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 2007;117(10):2920-2928
- 44 Lyzogubov VV, Bora PS, Wu X, *et al.* The Complement Regulatory Protein CD46 Deficient Mouse Spontaneously Develops Dry-Type Age-Related Macular Degeneration-Like Phenotype. *Am J Pathol* 2016;186(8):2088-2104
- 45 Park SW, Im S, Jun HO, *et al.* Dry age-related macular degeneration like pathology in aged 5XFAD mice: Ultrastructure and microarray analysis. *Oncotarget* 2017;8(25):40006-40018
- 46 Lambert V, Lecomte J, Hansen S, *et al.* Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat Protoc* 2013;8(11):2197-2211
- 47 Tobe T, Ortega S, Luna JD, *et al.* Targeted disruption of the FGF-2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol* 1998;153(5):1641-1646
- 48 Noël A, Jost M, Lambert V, *et al.* Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts. *Trends Mol Med* 2007;13(8):345-352
- 49 Askou AL, Pournaras JAC, Pihlmann M, *et al.* Reduction of choroidal neovascularization in mice by adeno-associated virus-delivered anti-vascular endothelial growth factor short hairpin RNA. *J Gene Med* 2012;14(11):632-641
- 50 Hasegawa E, Oshima Y, Takeda A, *et al.* IL-27 inhibits pathophysiological intraocular neovascularization due to laser burn. *J Leukoc Biol* 2012;91(2):267-273
- 51 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
- 52 Luo L, Uehara H, Zhang X, *et al.* Photoreceptor avascular privilege is shielded by soluble VEGF receptor-1. *Elife* 2013;2:e00324
- 53 Yannuzzi LA, Sorenson J, Spaide RF, *et al.* Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy (PCV). *Retina* 1990;10(1):1-8
- 54 Nakashizuka H, Mitsumata M, Okisaka S, *et al.* Clinicopathologic findings in polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(11):4729-4737
- 55 Wong CW, Yanagi Y, Lee WK, *et al.* Age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Asians. *Prog Retin Eye Res* 2016;53:107-139
- 56 Nakayama M, Iejima D, Akahori M, *et al.* Overexpression of Htra1 and exposure to mainstream cigarette smoke leads to choroidal neovascularization and subretinal deposits in aged mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(10):6514-6523
- 57 Iejima D, Nakayama M, Iwata T. HTRA1 Overexpression Induces the Exudative Form of Age-related Macular Degeneration. *J Stem Cells* 2015;10(3):193-203
- 58 Lee KY, Vithana EN, Mathur R, *et al.* Association analysis of CFH, C2, BF, and HTRA1 gene polymorphisms in Chinese patients with polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(6):2613-2619
- 59 Jones A, Kumar S, Zhang N, *et al.* Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(35):14578-14583
- 60 Yannuzzi LA, Negrão S, Iida T, *et al.* Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* 2001;21(5):416-434
- 61 Tsai ASH, Cheung N, Gan ATL, *et al.* Retinal angiomatous proliferation. *Surv Ophthalmol* 2017;62(4):462-492
- 62 Hu W, Jiang A, Liang J, *et al.* Expression of VLDLR in the retina and evolution of subretinal neovascularization in the knockout mouse model's retinal angiomatous proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(1):407-415
- 63 Li C, Huang Z, Kingsley R, *et al.* Biochemical alterations in the retinas of very low-density lipoprotein receptor knockout mice: an animal model of retinal angiomatous proliferation. *Arch Ophthalmol* 2007;125(6):795-803
- 64 Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, *et al.* Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol* 1997;151(1):281-291