

## 活体情况下评价载脂蛋白A1对小鼠视网膜血管生成的影响

苏焜仪, 胡安娣娜, 陈珠婷, 连玉, 吕林, 胡洁  
(中山大学中山眼科中心/眼科学国家重点实验室, 广东广州510060)

**摘要:**【目的】用眼底照相及荧光造影探讨载脂蛋白A1(apoA1)正常生理状态下及缺氧状态下对小鼠视网膜血管生长情况的影响。【方法】在正常生理条件(常氧)下,通过 $apoA1^{+/+}$ 鼠、 $apoA1^{-/-}$ 鼠与C57/BL6J小鼠对比,分别在第17天末(幼年期)、8周龄(成年期)、20周龄(中老年期),进行体内实验:①小鼠眼底照相(观察血管形态)及②荧光造影(FFA)(观察血管渗漏情况,分析视网膜平均血管密度、孔隙率及连接点个数);并分别制备它们缺氧条件下的氧诱导的视网膜病变(OIR)模型进行实验:①眼底照相;②荧光眼底血管造影。【结果】常氧下,①眼底照相示3种小鼠不同时期视网膜血管形态相似;②FFA提示3种小鼠不同时期毛细血管分布均匀,无明显无灌注区及荧光渗漏等表现。组间无统计学差异( $P_{血管密度}=0.59>0.05$ ,  $P_{孔隙率}=0.52>0.05$ );缺氧状态下,①眼底照相示:视网膜主要血管明显迂曲扩张;②FFA示3组均有静脉串珠样改变,毛细血管分布不均,见无灌注区及荧光渗漏等表现。对血管密度、孔隙率和连接点个数进行分析,组间有显著差异( $P_{血管密度}=0.0016<0.01$ ,  $P_{孔隙率}=0.0019<0.01$ ,  $P_{连接点个数}=0.0013<0.01$ )。【结论】通过小鼠视网膜成像系统在活体情况下发现在生理条件下, $apoA1$ 基因表达量的多少对小鼠正常视网膜血管生长无影响。缺氧状态下, $apoA1$ 表达量增高可使小鼠视网膜无灌注区面积减少,荧光渗漏减少。

**关键词:**载脂蛋白A1;氧诱导视网膜病变小鼠模型;血-视网膜屏障;眼底血管造影

中图分类号:R77 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2021)02-0177-08

### Evaluation of The Effects of apoA1 on Retinal Angiogenesis of Mice in Vivo

SU Kun-yi, HU Andina, CHEN Zhu-ting, LIAN Yu, LV Lin, HU Jie

(State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Correspondence to: HU Jie; E-mail: hehujie@126.com

**Abstract:** 【Objective】 Fundus imaging and fluorescein angiography were used to investigate the effect of apoA1 on the growth of retinal blood vessels under physiological environment and hypoxia state. 【Methods】 Under normal physiological conditions, by comparing  $apoA1^{+/+}$  mice and  $apoA1^{-/-}$  mice with C57/BL6J mice, experiments in vivo were conducted at the end of the day 17 (infancy), 8 weeks and 20 weeks, respectively, including: ① mice fundus photography (to observe vascular morphology) and ② fundus fluorescein angiography (FFA) (to observe vascular leakage, and to analyze average retinal vascular density, porosity and numbers of junction points). Their OIR models were prepared respectively for experiments with fundus photography and FFA. 【Results】 Under constant oxygen, fundus photography showed that the retinal blood vessels of the three kinds of mice were similar at different stages; FFA suggested that the capillary distribution of the three kinds of mice was uniform at different stages, and there was no obvious perfusion area and fluorescein leakage. There was no statistical difference between groups ( $P_{vascular\ density}=0.59 > 0.05$ ,  $P_{porosity}=0.52 > 0.05$ ); Under hypoxia state, fundus photography showed that the main retinal vessels were obviously tortuous and dilated; FFA showed that all three groups had venous beaded changes, uneven capillary distribution, but no perfusion area and fluorescein leakage. Analysis of vascular density, porosity, and number of connection points showed there were significant differences between groups

收稿日期:2020-12-02

基金项目:国家自然科学基金(81500735,81970807);广东省自然科学基金(2017A030313494,2020A1515011462)

作者简介:苏焜仪,硕士生,研究方向:视网膜新生血管性疾病, E-mail: 1054722531@qq.com;胡洁,通信作者,博士,主任医师, E-mail: hehujie@126.com

( $P_{\text{vascular density}}=0.0016 < 0.01$ ,  $P_{\text{porosity}}=0.0019 < 0.01$ ,  $P_{\text{number of connection points}}=0.0013 < 0.01$ ).【Conclusions】 Under physiological conditions, the expression level of *apoA1* gene has no effect on retinal vascular growth. Under hypoxia state, increased *apoA1* expression might reduce retinal nonperfusion area and reduce fluorescein leakage.

**Key words:** apoA1; oxygen-induced retinopathy model; blood-retinal barrier; fundus fluorescein angiography

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(2): 177-184]

血管生成是指从现有的血管系统中形成新的血管<sup>[1]</sup>。血管闭塞、血管生长不足和高血糖导致的视网膜缺氧被确定为病理性血管形成的主要诱因,表现为血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)破坏、视网膜微血管渗漏等。如何保护BRB成为研究的热点。近来研究发现,血脂升高是糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的危险因素之一<sup>[2-3]</sup>。其中,高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)水平与DR的严重程度呈负相关<sup>[4]</sup>。HDL及其主要成分载脂蛋白A1(Apolipoprotein A1, apoA1),病理状态下具有抗动脉粥样硬化、脂肪内逆行转运、抗氧化、抗炎等作用<sup>[5-9]</sup>。我们前期实验显示PDR患者血清载脂蛋白A1(apoA1)水平降低;体内外apoA1均能促进occludin的表达,提示*apoA1*具有保护视网膜屏障的作用,论文待发表。*apoA1*是否对视网膜血管生成有影响尚未有研究报道。视网膜成像系统是一种非侵入性的眼科学成像技术,它使视网膜血管可视化,可用于研究视网膜血管发育生长和血管结构的完整性<sup>[10]</sup>,评估血管渗漏和新生血管生成的情况,如对氧诱导的视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型以及健康的小鼠视网膜进行无创体内活体评估。本研究拟采用小鼠视网膜成像系统,实现视网膜血管的可视化,实时观察*apoA1*是否会影响生理条件及缺氧环境下的小鼠视网膜血管,从而全面评估*apoA1*对小鼠视网膜血管的作用。

## 1 材料与方 法

本实验所用SPF级C57/BL6J小鼠均从广东省实验动物中心购买,所用*apoA1*<sup>+/+</sup>鼠(品系名称:C57BL/6 Tg(APOA1)1Rub/J)及*apoA1*<sup>-/-</sup>小鼠(品系名称:B6.129P2-Apoa1tm1Unc/J)均从Jackson Lab购买,国内上海南方模式生物科技有限公司净化成SPF级小鼠后,饲养于中山大学中山眼科中心实验动物中心SPF级饲养间,饲养间内湿度控制在40%

~70%,温度控制在(21±1)°C,水及食物充足。本实验所用所有的动物均遵守视觉与眼科学研究学会(ARVO)协定中动物使用原则,并且经过中山大学中山眼科中心动物伦理委员会批准,未检测出微生物。

### 1.1 研究对象

常氧组研究对象分3大组:①健康SPF级C57BL/6 Tg(APOA1)1Rub/J小鼠组(*apoA1*基因过表达小鼠,简称:*apoA1*<sup>+/+</sup>);②健康SPF级B6.129P2-Apoa1tm1Unc/J小鼠组(*apoA1*基因敲除小鼠,简称:*apoA1*<sup>-/-</sup>);③对照组:健康SPF级C57/BL6J小鼠组(正常对照组,简称:normal)。选择时间点,分3组:①第17天末(幼年鼠);②8周龄(成年鼠);③20周龄(中老年鼠)。各组各时间点小鼠样本量5只,常氧组总样本量为45只。

缺氧组研究对象分3大组:①C57BL/6 Tg(APOA1)1Rub/J小鼠OIR模型组(*apoA1*转基因小鼠OIR模型,简称:*apoA1*<sup>+/+</sup>OIR);②B6.129P2-Apoa1tm1Unc/J小鼠OIR模型组(*apoA1*基因敲除小鼠OIR模型,简称:*apoA1*<sup>-/-</sup>OIR);③对照组:C57/BL6J小鼠OIR模型组(简称:normal OIR)。

取P7的C57BL/6乳鼠、*apoA1*<sup>+/+</sup>乳鼠及*apoA1*<sup>-/-</sup>乳鼠进行造模,即OIR模型。具体做法:放入含氧体积分数为75%的饲养箱中,P12再将其放回正常室内空气饲养5d,所有动物皆饲养于屏障环境动物实验室中。选择时间点:小鼠出生后第17天末。各分组小鼠样本量5只,缺氧组总样本量为15只。

### 1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质免疫印迹 蛋白质免疫印迹(Western Blot, WB)法首先剥出视网膜组织,用200 μL RIPA缓冲液+1/100 PMSF,在4 °C条件下作用30 min,提取蛋白。以转速12 000×g在4 °C条件低温离心20 min,用BCA法测定蛋白浓度。在10%的SDS-丙烯酰胺凝胶上样30 μg蛋白进行电泳。电泳后,将蛋白电转至PVDF膜。常温下用5%脱脂牛奶在TBST缓冲液(5 mmol/L)中封闭1 h,阻断非特异性结合位点。用apoA1(鼠抗,1:1 000)和

GAPDH(兔抗,1:1 000)于4℃过夜。用TBST洗膜,每次10 min,需洗3次。分别用对应种属的二抗(1:1 000)室温下孵育二抗1 h。用TBST洗膜,每次10 min,需洗3次。1:1加入曝光液A和B,在凝胶成像仪内曝光。

1.2.2 小鼠体质量记录 在活体情况下进行,记录各组各时间点的小鼠的体质量,取平均值后进行比较。

1.2.3 活体眼底照相 应用Micron IV 摄像系统(Phoenix Research Laboratories, San Ramon, CA),取各组各时间点的小鼠,35%水合氯醛(注射剂量为0.1 mL/10 g)腹腔下注射进行全身麻醉,麻醉后再固定小鼠,利用复方托吡卡胺滴眼液给小鼠眼睛散瞳,右旋糖酐羟丙甲纤维素滴眼液保护角膜,调整进光角度,进行小鼠活体眼底照相。

1.2.4 荧光眼底血管造影 小鼠活体眼底照相后,腹腔下注射10%荧光素钠(注射剂量为0.1 mL/10 g)后,行荧光眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA),活体观察视网膜血管的变化。在活体状态下观察到迂曲和扩张的视网膜血管,同时留意无灌注区,对视网膜血管病变可进行动态检测。采用AngioTool软件分析视网膜的血管密度、孔隙率、连接点个数。血管密度定义为血管面积与总体面积之比,它能够反映视网膜微血管的改变,体现血-视网膜屏障破坏的严重程度。孔隙率定义为孔隙体积占总体体积的百分比,它反映血管的不均匀性,间接反映无灌注区的大小。连接点个数则指分析图片范围内血管分支点的个数,间接反映视网膜血管的分支生成情况。

### 1.3 统计学方法

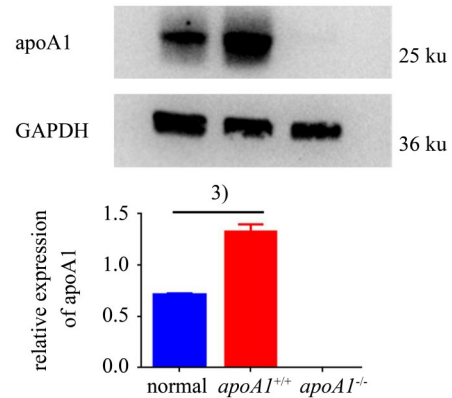
采用GraphPad Prism 6及SPSS 24软件对实验数据进行分析,数据首先进行正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布且方差齐性的数据,对单因素变量资料采用One-way ANOVA单因素方差分析,总的方差分析有统计学意义时采用Bonferroni法进行两两比较。对双因素变量资料采用Two-way ANOVA双因素方差分析法,总的方差分析有统计学意义时两两比较采用Bonferroni法。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 提前验证性试验

为了验证动物模型的有效性,我们通过West-

ern Blot实验进行检测。通过统计学分析(单因素方差分析),组间差异有统计学意义( $F=739.19, P<0.0001, n=3$ ;图1),采用Bonferroni法作两两比较,发现正常组与 $apoA1^{+/+}$ 组、正常组与 $apoA1^{-/-}$ 组比较差异有统计学意义( $P<0.0001$ )。验证 $apoA1^{+/+}$ 小鼠 $apoA1$ 过表达, $apoA1^{-/-}$ 小鼠已缺失 $apoA1$ ,为后续研究结果的可信性奠定了基础。



The content of  $apoA1$  by grey was compared among normal,  $apoA1^{+/+}$ , and  $apoA1^{-/-}$ . The protein expression of  $apoA1$  and GAPDH were determined by Western Blot ( $F=739.19, P<0.0001, n=3$ )

图1 小鼠肌肉 apoA1 含量统计图

Fig. 1 The relative expression of apoA1 in various mice muscle

### 2.2 各组各时间点的小鼠的平均体质量

在正常生理条件下,各组小鼠在不同年龄段均符合正常小鼠正常曲线(表1), $apoA1$ 基因的过表达及敲除情况不影响小鼠的正常发育。

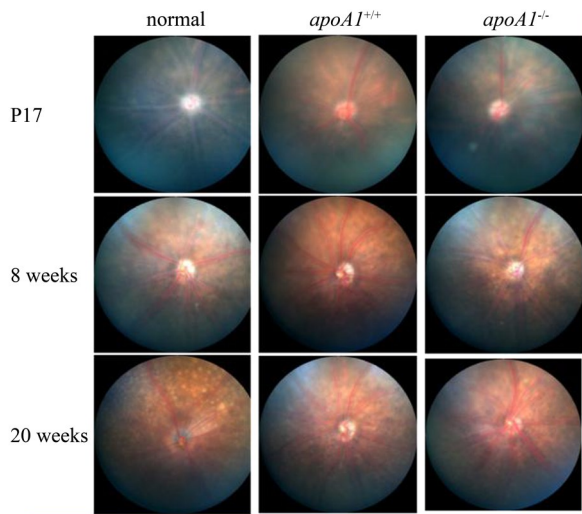
表1 各组各时间点的小鼠的平均体质量

Groups	Average weight of mice at each time point in each group ( $\bar{x} \pm s, g, n=5$ )		
	P17	8 weeks	20 weeks
Normal	7.31±0.30	18.93±1.24	28.32±2.18
$apoA1^{+/+}$	7.12±0.27	19.62±2.02	28.14±1.98
$apoA1^{-/-}$	6.82±0.25	19.13±2.21	27.64±2.04

### 2.3 正常生理条件下小鼠视网膜成像系统对小鼠视网膜血管结构评价

2.3.1 小鼠眼底照相 在正常生理条件下,3种小鼠不同时期主要血管自视盘发出,呈放射状分枝形态,血管径直。中周部视网膜血管管径逐渐均匀变

细,大血管在走行过程中逐级发出分支血管,分支血管呈纹理状衔接良好(图2)。



Under constant oxygen, fundus photography showed that the retinal blood vessels of the three kinds of mice were similar at different stages, their capillary distribution was uniform at different stages, and there was no obvious perfusion area and fluorescein leakage.

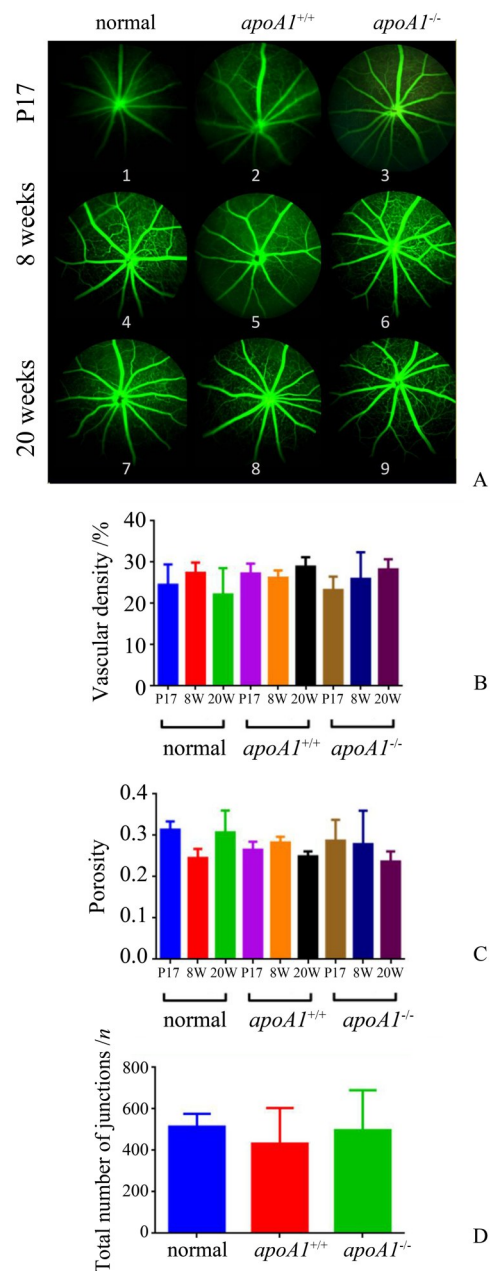
图2 生理条件下3种小鼠不同时期眼底照相情况

Fig. 2 Fundus photography of three kinds of mice in different periods under physiological condition

2.3.2 小鼠荧光造影 在正常生理条件下,3种小鼠不同时期主要血管自视盘发出,呈放射状分枝形态,血管径直。周边部视网膜内层血管呈树叶脉样分支及均匀走形,灌注良好,细小血管分支直达周边部。视网膜血管无明显无灌注区及荧光渗漏等表现(图3A)。血管密度(图3B)经统计学分析(双因素方差分析法),组间比较差异无统计学意义( $F=0.72, P_{\text{血管密度}}=0.59, P>0.05, n=5$ )。孔隙率(图3C)经统计学分析(双因素方差分析法),组间比较差异无统计学意义( $F=0.84, P_{\text{孔隙率}}=0.52, P>0.05, n=5$ )。采用 Bonferroni 法作两两比较,各组间比较差异无统计学意义。连接点个数(图3D)经单因素方差分析法,组间比较差异无统计学意义( $F=0.236, P_{\text{连接点个数}}=0.797, P>0.05, n=5$ )。

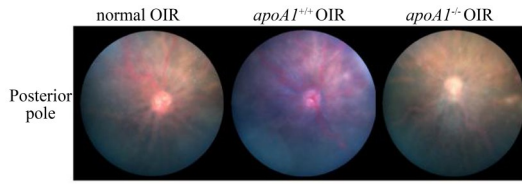
2.4 病理条件(缺氧)下小鼠视网膜成像系统对小鼠视网膜血管结构评价

2.4.1 小鼠眼底照相 造 OIR 模型后,3种小鼠视网膜均出现主要血管明显迂曲扩张、串珠样改变,部分区域可见片状出血,提示造模成功。3种小鼠 OIR 模型中,主要动脉、静脉迂曲扩张程度无明显差异(图4)。



A: Fundus fluorescein angiography of three kinds of mice in different periods under physiological condition (period 1-3: P17; period 4-6: 8 W; period 7-9: 20 W). B: Comparison of vascular densities of the three kinds of mice at different stages ( $F=0.72, P=0.59, P>0.05, n=5$ ). C: Comparison of porosity of the three kinds of mice in different periods ( $F=0.84, P=0.52, P>0.05, n=5$ ). D: Comparison of total number of junctions at P17 among the three kinds of mice ( $F=0.236, P=0.797, P>0.05, n=5$ ). The bars show no significant differences of the in each group. All the data represent the mean  $\pm$  SD and were analyzed using two-way ANOVA of variance followed by Bonferroni test.

图3 生理条件下3种小鼠不同时期荧光造影情况及统计图  
Fig. 3 Fundus fluorescein angiography of three kinds of mice in different periods under physiological condition and their statistical graphs

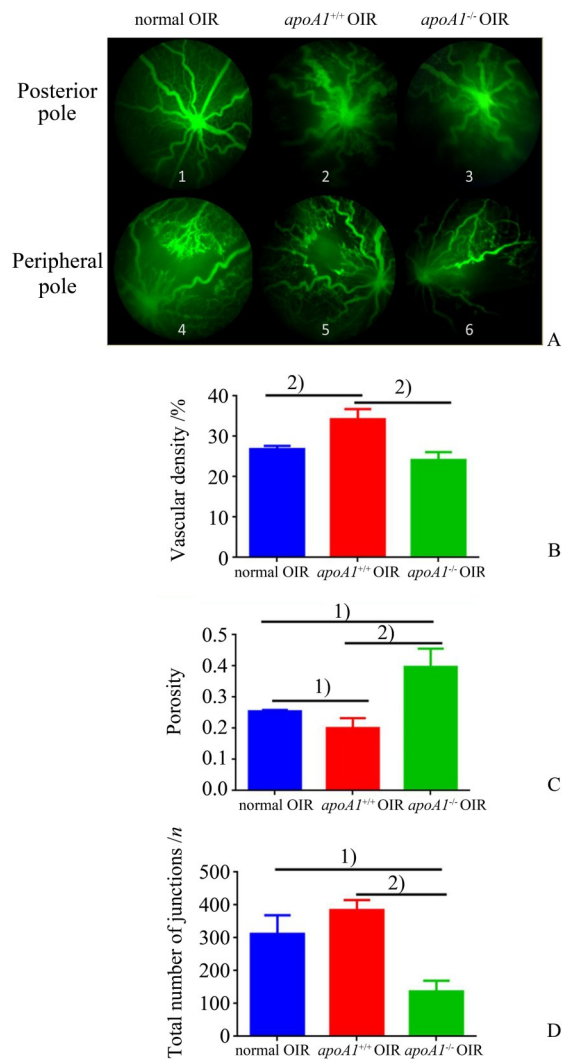


Under hypoxia state, fundus photography showed that the main retinal vessels were obviously tortuous and dilated.

图4 缺氧状态下P17的小鼠OIR模型眼底照相情况

Fig. 4 Fundus photography of OIR model of P17 in the three kinds of mice under hypoxia state

2.4.2 小鼠荧光造影 缺氧状态下,3种小鼠视网膜均出现中央区域无灌注区形成,血管明显迂曲扩张、串珠样改变,毛细血管分布不均(图5A)。中央视盘呈高荧光状态,腹腔下注射造影剂1 min后,部分区域可见不同程度的片状荧光渗漏。其中,无灌注区面积比较:  $apoA1^{-/-}$  OIR > 正常小鼠 OIR >  $apoA1^{+/+}$  OIR。荧光渗漏出现时间,从早到晚排序:  $apoA1^{-/-}$  OIR > 正常小鼠 OIR >  $apoA1^{+/+}$  OIR。三组小鼠 OIR 模型血管密度经统计学分析(One-Way ANOVA),组间比较差异有统计学意义( $F=22.56$ ,  $P_{\text{血管密度}}=0.0016$ ,  $P<0.01$ ,  $n=5$ ;图5B)。采用 Bonferroni 法进一步作两两比较,发现正常小鼠 OIR 组与  $apoA1^{+/+}$  OIR 组比较差异有统计学意义( $P=0.0086$ ,  $P<0.01$ ),  $apoA1^{+/+}$  OIR 组与  $apoA1^{-/-}$  OIR 组比较差异有统计学意义( $P=0.0018$ ,  $P<0.01$ ),而正常小鼠 OIR 组与  $apoA1^{-/-}$  OIR 组比较差异无统计学意义( $P=0.42$ ,  $P>0.05$ )。3组小鼠 OIR 模型孔隙率经统计学分析(One-Way ANOVA),组间差异有统计学意义( $F=21.08$ ,  $P_{\text{孔隙率}}=0.0019$ ,  $P<0.01$ ,  $n=5$ ;图5C)。采用 Bonferroni 法进一步作两两比较,发现正常小鼠 OIR 组与  $apoA1^{-/-}$  OIR 组比较差异有统计学意义( $P=0.011$ ,  $P<0.05$ ),  $apoA1^{+/+}$  OIR 组与  $apoA1^{-/-}$  OIR 组比较差异有统计学意义( $P=0.0020$ ,  $P<0.01$ ),而正常小鼠 OIR 组与  $apoA1^{+/+}$  OIR 组比较差异无统计学意义( $P=0.41$ ,  $P>0.05$ )。同样方法分析连接点个数,组间差异有统计学意义( $F=27.64$ ,  $P_{\text{连接点个数}}=0.0013$ ,  $P<0.01$ ,  $n=5$ ;图5D)。采用 Bonferroni 法进一步作两两比较,发现正常小鼠 OIR 组与  $apoA1^{-/-}$  OIR 组比较差异有统计学意义( $P=0.0072$ ,  $P<0.01$ ),  $apoA1^{+/+}$  OIR 组与  $apoA1^{-/-}$  OIR 组比较差异有统计学意义( $P=0.0012$ ,  $P<0.01$ ),而正常小鼠 OIR 组与  $apoA1^{+/+}$  OIR 组比较差异无统计学意义( $P=0.24$ ,  $P>0.05$ )。



A: Fundus fluorescein angiography of OIR model of P17 in the three kinds of mice under hypoxia state; B: Comparison of vascular density in OIR model among the three kinds of mice ( $F=22.56$ ,  $P=0.0016$ ,  $P<0.01$ ,  $n=5$ ; normal OIR vs.  $apoA1^{+/+}$  OIR:  $P=0.0086$ ,  $P<0.01$ ,  $apoA1^{+/+}$  OIR vs.  $apoA1^{-/-}$  OIR:  $P=0.0018$ ,  $P<0.01$ ; normal OIR vs.  $apoA1^{-/-}$  OIR:  $P=0.42$ ,  $P>0.05$ ); C: Comparison of porosity in OIR model among the three kinds of mice ( $F=21.08$ ,  $P=0.0019$ ,  $P<0.01$ ,  $n=5$ ; normal OIR vs.  $apoA1^{-/-}$  OIR:  $P=0.011$ ,  $P<0.05$ ,  $apoA1^{+/+}$  OIR vs.  $apoA1^{-/-}$  OIR:  $P=0.0020$ ,  $P<0.01$ , normal OIR vs.  $apoA1^{+/+}$  OIR:  $P=0.41$ ,  $P>0.05$ ); D: Comparison of total number of junctions in three groups of OIR mice ( $F=27.64$ ,  $P=0.0013$ ,  $P<0.01$ ,  $n=5$ ; normal OIR vs.  $apoA1^{-/-}$  OIR:  $P=0.0072$ ,  $P<0.01$ ,  $apoA1^{+/+}$  OIR vs.  $apoA1^{-/-}$  OIR:  $P=0.0012$ ,  $P<0.01$ , normal OIR vs.  $apoA1^{+/+}$  OIR:  $P=0.24$ ,  $P>0.05$ ). The bars show the significant differences of the in each group. All the data represent the mean  $\pm$  SD and were analyzed using one-way ANOVA of variance followed by Bonferroni test. 1)  $P<0.05$  between two groups,  $n=5$ . 2)  $P<0.01$  between two groups,  $n=5$ .

图5 缺氧状态下P17的3种小鼠OIR模型荧光造影情况  
Fig. 5 Fundus fluorescein angiography of OIR model of P17 in the three kinds of mice under hypoxia state

### 3 讨论

apoA1 是血清高密度脂蛋白颗粒中主要的蛋白质成分,反映了血管组织中脂质积累。它是一种相对较大的蛋白质,含有 243 个氨基酸残基。它参与脂肪分子的逆行转运、血清胆固醇酯的形成和抗凝血过程,具有显著的抗氧化、抗炎和抗动脉粥样硬化作用。本研究采用动物视网膜成像系统在活体情况下对小鼠视网膜血管进行观察,并用血管密度、孔隙率、连接点个数等指标反映视网膜微血管的改变。我们运用的小鼠眼底照相及眼底荧光造影,具有视网膜实时成像的特点<sup>[10]</sup>,在不需要牺牲小鼠的情况下,监测生理及病理条件下的视网膜血管变化。通过上述指标同样可以评价视网膜血管生长及破坏情况。并用 C57BL/6 小鼠的三大关键时期(幼年期、成年期、中老年期)模拟小鼠的生长周期,以此首次探讨在正常生理条件下,apoA1 基因表达量的多少对小鼠视网膜血管生长发育的影响。

Rubin 等<sup>[11]</sup>最早于 1990 年构建 apoA1 过表达小鼠模型,用于研究 apoA1 转基因表达改变后,涉及小鼠 apoA1 血浆水平的机制。过表达模型构建后,其血清 HDL 水平大约是正常水平的两倍。apoA1 在决定高密度脂蛋白颗粒大小分布方面起主导作用。随后,有研究利用 apoA1 过表达小鼠证明它可以降低饮食诱导发生的大动脉粥样硬化病变的风险<sup>[12]</sup>。为确定实验性降低血浆高密度脂蛋白水平是否会增加动脉粥样硬化易感性,Williamson 等<sup>[13]</sup>于 1992 年利用基因靶向技术来产生 apoA1 基因敲除小鼠模型。尽管与正常小鼠相比,apoA1 基因敲除纯合子小鼠缺乏 apoA1 蛋白,它们在 3 月龄时仍健康生长。这一事实证明 apoA1 对小鼠的正常发育并不是至关重要的。该模型的有效存活为更好地研究 apoA1 缺失在脂质代谢和动脉粥样硬化的发生的影响提供了可能。

我们研究发现,正常情况下 apoA1 过表达对视网膜血管生成无影响。我们可见 3 种小鼠在幼年、成年、中老年时期中观察到视网膜血管的生长发育上未见明显异常,其表现为主要血管自视盘发出,呈放射状分枝形态,血管径直,毛细血管分布均匀,无明显无灌注区,无新生血管形成。我们可知,HDL 除了参与胆固醇逆向转运外,HDL 有血管保护作用,包括内皮细胞功能保护作用、抗炎作用、抗

血栓作用、抑制血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖<sup>[14]</sup>等作用。ApoA1 是高密度脂蛋白中含量最丰富的成分,它有着与 HDL 相似的作用。我们猜测,在正常生理情况下,无显著刺激因素,未能诱导机体产生氧化还原应激反应、炎症反应等,apoA1 高表达情况下,调节内皮细胞、调节血管生成、调节内外膜功能等血管保护作用未能凸显,血管依旧正常生成,呈正常血管分布形态。因此,apoA1 过表达小鼠模型,其血管正常发育与正常小鼠相比无明显改变。

我们的研究也显示在正常情况下,apoA1 缺失对视网膜血管生成无影响,分析原因如下:首先,本研究模拟小鼠正常条件下,观察 apoA1 对视网膜血管生成的影响,而 apoA1 与脂质代谢息息相关,下一步研究将对各组小鼠的血脂状况进行测量,做组织切片对小鼠的大血管壁进行病理观察,以进一步验证。其次,组织脂质堆积在病变晚期时症状才凸显。apoA1<sup>-/-</sup>小鼠模型,可模拟临床上的丹吉尔病(tangier disease, TD),这是一种罕见的遗传病,其临床特征是血浆高密度脂蛋白水平严重降低,外周组织脂质积累,心血管疾病风险增加<sup>[15]</sup>。而在眼科中曾有报道,患者年轻时双眼无明显病变,其重要临床表现为成年后逐渐出现角膜混浊,活检标本中显示结膜血管周细胞变性,细胞见双折射脂质颗粒<sup>[16]</sup>,对全身血管系统的发育无影响。而本研究中小鼠研究至中老年期,可能未能诱导出相应血管改变。

我们的研究结果还显示:缺氧状态下,3 组小鼠的 OIR 模型在眼底照相中均可发现主要血管明显迂曲扩张、串珠样改变,部分区域可见片状出血。主要动脉、静脉迂曲扩张程度无明显差异。说明对于主要血管,抵抗氧化应激所导致的迂曲扩张的作用不显著。3 组小鼠造 OIR 模型后,在荧光造影中均可见大量的无灌注区,荧光渗漏,血管的扩张、扭曲和闭塞。血-视网膜屏障均有不同程度的破坏,视网膜内皮细胞间的紧密连接屏障发育不完善,并且更重要的是,apoA1 表达量增高,可见视网膜血管的荧光渗漏减少,视网膜无灌注区面积减少。血管密度的统计学差异,说明 apoA1 能抵抗缺氧对视网膜血管屏障的破坏,维持血管网络的稳定;孔隙率的统计学差异提示 apoA1 对视网膜血管的无灌注区生成有一定的抑制作用,使无灌注区减少,连接点个数的统计学差异说明 apoA1 对视网膜血管的生长发育、分支生成毛细血管网有一定的保护作

用, 综上证据提示 *apoA1* 对视网膜血管屏障有保护作用。

我们推测 *apoA1* 保护视网膜血管无灌注区、减少渗漏的可能机制为<sup>[17]</sup>: 脂质内逆向转运作用。*apoA1* 是脂质在视网膜内逆向转运的关键因素<sup>[18]</sup>, 它促进胆固醇从外周组织转运到肝脏, 从而防止脂质在视网膜内积聚。抗氧化作用。LDL的氧化可导致平滑肌细胞毒性和血管内皮功能障碍, *apoA1* 可以促进血管保护机制<sup>[19]</sup>, 具有抗氧化作用, 抑制LDL的氧化, 通过清除有害的氧化脂质, 抵抗视网膜受到氧化应激的损害。保护内皮细胞作用。已有研究表明, 较高水平的 *apoA1* 可改善冠状动脉的血管内皮功能<sup>[20]</sup>, 对于微血管病变, 其作用亦然, 它可以调节血管内皮细胞。重组 HDL(reconstituted HDL, rHDL) 可以刺激内皮祖细胞(EPCs)的分化, 并增强 EPCs 介导小鼠的内皮修复。一氧化氮(NO)可使血管扩张, *apoA1* 对内皮细胞 NO 依赖性

血管舒张和血流调节具有生理作用, 保护内皮细胞减少损害。调节内外膜功能。一方面, HDL 调节内膜内皮功能、血小板活化和血栓形成、炎性细胞因子分泌、泡沫细胞形成和 SMC 增殖, 抑制内膜增生。另一方面, HDL 具有调节外膜成纤维细胞分化和血管周围脂肪细胞功能的潜能, 它可能与胆固醇转运相结合, 减少血管重构<sup>[21]</sup>。

视网膜成像系统具有无创、实时、血管可视化的特点, 本文通过视网膜成像系统, 活体观察 *apoA1* 正常生理状态下及缺氧状态下对视网膜血管生长情况的影响, 发现在生理条件下, *apoA1* 基因表达量的多少对视网膜血管生长无影响; 而缺氧状态下, *apoA1* 表达量增高可使视网膜无灌注区面积减少, 荧光渗漏减少, 提示 *apoA1* 对视网膜血管屏障有保护作用, 为视网膜新生血管疾病提供新思路, 而且对其他微血管疾病及大血管疾病的发生发展也有提示作用。

#### 参考文献

- [1] Yücel EI, Sahin M. Fenretinide reduces angiogenesis by downregulating CDH5, FOXM1 and eNOS genes and suppressing microRNA-10b [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(3): 1649-1658.
- [2] Klein BE, Moss SE, Klein R, et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate [J]. Ophthalmology, 1991, 98(8): 1261-1265.
- [3] Raman R, Rani PK, Kulothungan V, et al. Influence of serum lipids on clinically significant versus nonclinically significant macular edema: SN-DREAMS Report number 13 [J]. Ophthalmology, 2010, 117(4): 766-772.
- [4] Hu A, Luo Y, Li T, Guo X, et al. Low serum apolipoprotein A1/B ratio is associated with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetes [J]. Graef Arch Clin Exp, 2012, 250(7): 957-962.
- [5] Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins [J]. Annu Rev Med, 2003, 54: 321-341.
- [6] Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, et al. HDL and endothelial protection [J]. Brit J Pharmacol, 2013, 169(3): 493-511.
- [7] Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits [J]. Circulation, 2005, 111(12): 1543-1550.
- [8] O'Connell BJ, Genest J. High-density lipoproteins and endothelial function [J]. Circulation, 2001, 104(16): 1978-1983.
- [9] Prosser HC, Ng MK, Bursill CA. The role of cholesterol efflux in mechanisms of endothelial protection by HDL [J]. Curr Opin Lipidol, 2012, 23(3): 182-189.
- [10] Alex AF, Alnawaiseh M, Heiduschka P, et al. Retinal fundus imaging in mouse models of retinal diseases [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1834: 253-283.
- [11] Rubin EM, Ishida BY, Clift SM, et al. Expression of human apolipoprotein A-I in transgenic mice results in reduced plasma levels of murine apolipoprotein A-I and the appearance of two new high density lipopro-

- tein size subclasses[J]. P Natl Acad Sci USA, 1991, 88(2): 434-438.
- [12] Berti JA, de Faria EC, Oliveira HC. Atherosclerosis in aged mice over-expressing the reverse cholesterol transport genes [J]. Braz J Med Bio Res, 2005, 38(3): 391-398.
- [13] Williamson R, Lee D, Hagaman J, et al. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I[J]. P Natl Acad Sci USA, 1992, 89(15): 7134-7138.
- [14] Reimers GJ, Jackson CL, Rickards J, et al. Inhibition of rupture of established atherosclerotic plaques by treatment with apolipoprotein A-I [J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(1): 37-44.
- [15] Yin K, Liao DF, Tang CK. ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport [J]. Mol Med, 2010, 16: 438-449.
- [16] Chu FC, Kuwabara T, Cogan DG, et al. Ocular manifestations of familial high-density lipoprotein deficiency (Tangier disease) [J]. Arch Ophthalmol, 1979, 97(10): 1926-1928.
- [17] Yin K, Agrawal DK. High-density lipoprotein: a novel target for antirestenosis therapy [J]. Clin Transl Sci, 2014, 7(6): 500-511.
- [18] Sasongko MB, Wong TY, Nguyen TT, et al. Serum apolipoproteins are associated with systemic and retinal microvascular function in people with diabetes [J]. Diabetes, 2012, 61(7): 1785-1792.
- [19] Davidson MH. Apolipoprotein measurements: is more widespread use clinically indicated? [J]. Clin Cardiol, 2009, 32(9): 482-486.
- [20] Rosenson RS, Brewer HB, Ansell BJ, et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(1): 48-60.
- [21] Poteryaeva ON, Usynin IF. Antidiabetic role of high density lipoproteins [J]. Biomed Khim, 2018, 64(6): 463-471.

(编辑 余菁)