

地塞米松联合脂多糖诱导股骨头坏死模型的构建**

田力¹, 梁晓鹏², 田晓晔³, 于鑫琛⁴, 田晶⁴

Constructing a rabbit model of necrosis of the femoral head by the combination of dexamethasone and lipopolysaccharide

Tian Li¹, Liang Xiao-peng², Tian Xiao-ye³, Yu Xin-chen⁴, Tian Jing⁴

Abstract

BACKGROUND: An ideal animal model of necrosis of the femoral head is beneficial to the studies on the cause of disease, pathogenesis and treatment.

OBJECTIVE: To research the experimental result of necrosis of rabbit femoral head induced by the combination of dexamethasone and lipopolysaccharide.

METHODS: Thirty male New Zealand rabbits were divided into experimental group (20 rabbits) and control group (10 rabbits) randomly. Two injections of 10 µg/kg body lipopolysaccharide and three injections of 25 mg/kg dexamethasone were performed in the experimental group. Physiologic saline was injected in the control group.

RESULTS AND CONCLUSION: The CT scanning showed non-uniform of bone density of the femoral head in the experimental group. The indexes of Micro-CT bone metrological parameters were significantly lower in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$). Bone cell lacunae, increased fat cells and thrombocytopenia were observed in histopathological examination. The osteonecrosis rate of survived rabbits as well as the rate of empty bone lacunae was significantly lower in the experimental group than the control group. It is indicated that the combination of dexamethasone and lipopolysaccharide can induce an osteonecrosis model.

Tian L, Liang XP, Tian XY, Yu XC, Tian J. Constructing a rabbit model of necrosis of the femoral head by the combination of dexamethasone and lipopolysaccharide. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(35): 6571-6574. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 对于研究股骨头坏死的发病机制及治疗方法, 建立与股骨头坏死病程相似的动物模型是非常重要的。

目的: 观察地塞米松联合脂多糖诱导兔股骨头坏死的实验效果。

方法: 健康雄性新西兰大白兔 30 只, 随机分为模型组($n=20$)和对照组($n=10$)。模型组经耳缘静脉注射 2 次 10 µg/kg 的脂多糖, 再肌肉注射 3 次地塞米松 25 mg/kg, 对照组注射同等剂量的生理盐水。

结果与结论: 4 周后, CT 扫描显示模型组兔股骨头不同程度的骨密度不均匀。显微 CT 观察发现, 模型组骨体积分数、骨矿物质密度、骨矿物质含量和骨小梁厚度均显著低于对照组, 而骨小梁间隙高于对照组($P < 0.05$)。组织学切片见模型组骨细胞陷窝空虚, 脂肪细胞增多, 部分血管栓塞, 其中存活动物的骨坏死率和骨陷窝空虚率均明显低于对照组。说明地塞米松联合脂多糖可有效建立骨坏死模型。

关键词: 股骨头坏死; 地塞米松; 脂多糖; 显微 CT; 组织学切片

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.35.026

田力, 梁晓鹏, 田晓晔, 于鑫琛, 田晶. 地塞米松联合脂多糖诱导股骨头坏死模型的构建[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(35):6571-6574. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

股骨头缺血坏死是骨科领域较为棘手的难题之一, 如何缓解早期股骨头坏死患者的症状、延缓病情的进展一直是众多学者研究的热点, 但其病因及发病机制尚未完全明了, 治疗方法的选择及其疗效也还存在很大争议^[1]。糖皮质激素是非创伤性股骨头缺血坏死最常见的原因。人们需要进一步了解糖皮质激素性股骨头缺血坏死的病理机制, 抗凝、抗血栓形成、促进血管生成、降脂和抗细胞凋亡都可能对股骨头缺血坏死患者有作用^[2]。建立理想的股骨头缺血坏死动物模型, 是研究股骨头缺血坏死病因及发

病机制十分重要的手段, 也是进行股骨头缺血坏死治疗研究的基础^[2]。股骨头缺血坏死动物模型的造模方法文献已经有很多报道, 观察指标也多种多样。目前兔骨坏死模型的激素诱导制作方法主要包括连续 2 次注射脂多糖(100 µg/kg)^[3]、单剂量静脉注射脂多糖(10 µg/kg)^[4]、连续多次肌注皮质类固醇(4 mg/kg)^[5]、大剂量脂多糖联合大剂量的皮质类固醇, 但尚没有一种能够快速、高效、低死亡率以及更加接近人早期股骨头缺血坏死的动物模型。

理想的动物模型应该具有较高的造模成功率及较低的病死率, 良好的股骨头坏死动物模型的建立, 有助于研究股骨头坏死的发病机制, 为股骨头坏死的预防和治疗提供理论依据。地

¹Clinical Department,
²School of Optometry,
Shenyang Medical
College, Shenyang
110034, Liaoning
Province, China;
³Jingkang
Rehabilitation
Pension Center,
Tieling Economic
Development Zone,
Tieling 112000,
Liaoning Province,
China; ⁴Shenyang
Jingkang Medical
Group, Shenyang
110043, Liaoning
Province, China

Tian Li, Professor,
Chief physician,
Clinical Department,
Shenyang Medical
College, Shenyang
110034, Liaoning
Province, China
Linan1956@
yahoo.com.cn

Correspondence to:
Liang Xiao-peng,
Master, Engineer,
School of Optometry,
Shenyang Medical
College, Shenyang
110034, Liaoning
Province, China
Linan1956@
yahoo.com.cn

Supported by: the
Foundation of
Liaoning Educational
Bureau, No.
2008-7-29*; the
Funding Program of
Shenyang Science
and Technology
Department, No.
1081233-1-00-03*

Received: 2011-02-28
Accepted: 2011-04-22

沈阳医学院,¹ 临床教研室,² 眼视光学院, 辽宁省沈阳市 110034;³ 铁岭经济开发区靖康康复养老中心, 辽宁省铁岭市 112000;⁴ 沈阳靖康医疗集团, 辽宁省沈阳市 110043

田力, 男, 1956年生, 河北省秦皇岛市人, 汉族, 教授, 主任医师, 从事临床外科、局解手术学的临床、教学和科研工作。Linan1956@yahoo.cn

通讯作者: 梁晓鹏, 硕士, 工程师, 沈阳医学院眼视光学院, 辽宁省沈阳市 110034 Linan1956@yahoo.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)35-06571-04

收稿日期: 2011-02-28
修回日期: 2011-04-22
(20110228020/YJ·W)

塞米松能减轻关节的炎症, 但长期大量使用易导致骨质疏松或股骨头坏死等并发症。地塞米松可抑制骨细胞增殖, 抑制细胞合成蛋白质和Ⅱ型胶原; 随着时间的延长, 抑制作用增强; 剂量越大, 抑制作用越强^[6-7]。作者所在实验团队在总结前人成功经验的基础上, 旨在建立一个能够真正模拟人早期股骨头缺血坏死的动物模型, 使用小剂量脂多糖联合大剂量的地塞米松诱导兔股骨头坏死, 通过组织学技术、CT扫描和显微CT成像观察诱导早期兔股骨头坏死的实验效果。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2008-08/2009-07在沈阳医学院病理学实验室完成。

材料:

实验动物: 30只雄性新西兰大白兔, 清洁级, 体质量2.5~4.0 kg, 由沈阳医学院动物实验中心提供。所有动物在沈阳医学院实验动物饲养中心饲养, 每日给予定量兔饲料和清洁饮用水, 定期观察动物的生活习惯、饮食规律情况。实验过程中对动物处置符合科学技术部2006年《关于善待实验动物的指导性意见》的要求^[8]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
脂多糖	美国 Sigma 公司
地塞米松	美国辉瑞公司
“PLUS4”型螺旋 CT	德国 SIEMENS 公司
eXplore 局部显微 CT 扫描仪	英国 GE 公司
光学显微镜, 自动图像信号采集与分析系统	日本 Olympus 公司

方法:

分组: 新西兰大白兔30只随机分为模型组($n=20$)和对照组($n=10$)。

股骨头坏死模型的制作: 模型组连续2 d每日经耳缘静脉注射10 $\mu\text{g/kg}$ 的脂多糖, 再连续3 d, 每日臀部肌肉注射地塞米松25 mg/kg。对照组注射同等剂量的生理盐水, 脂多糖和地塞米松均不注射, 所有动物连续3 d注射地塞米松后, 每日灌胃 8×10^4 U庆大霉素。

股骨头坏死兔与正常兔股骨头CT扫描检测: 最后1次地塞米松注射后4周, 经耳缘静脉注射10%水合氯醛溶液3 mL/kg, 麻醉成功后, 将大白兔俯卧位放置, 固定四肢, 采用螺旋CT扫描

双侧髓关节, 选择层厚1 mm, 螺距1.5 mm。观察兔股骨头关节面以及股骨头内骨密度的变化。

股骨头坏死兔与正常兔股骨头显微CT扫描: CT扫描后随机选择模型组与对照组动物各5只, 经耳缘静脉注射空气处死后, 取出双侧股骨, 保留股骨近端5 cm长度股骨干, 新鲜标本置于显微CT下成像, 并逐层选定股骨头、颈部皮质骨边缘轮廓为感兴趣区域(range of interest, ROI), 形成三维ROI并进行计算。分析参数: 骨体积分数、骨矿物质密度、骨矿物质含量、骨小梁厚度、骨小梁间隙。显微CT影像参数: 工作电压80 kV, 电流450 μA , 空间分辨率80 μm , 扫描层厚45 μm , 扫描旋转角度为360°, 保持股骨长轴与扫描室切面垂直。

股骨头坏死兔与正常兔股骨头组织形态学检查: 经耳缘静脉注射空气处死模型组及对照组动物各5只, 取股骨头沿冠状面正中锯开, 体积分数4%甲醛缓冲液固定24~48 h后, 采用5%硝酸液脱钙, 流水冲洗后常规石蜡包埋切片, 苏木精-伊红染色, 光镜观察。自动图像信号采集与分析系统中进行骨组织形态观察, 记录骨坏死发生率及空骨陷窝百分率。骨坏死定义: 骨小梁内出现弥漫性空陷窝或核皱缩, 伴有周围骨髓细胞坏死^[9]。骨坏死发生率=任何一侧股骨头出现骨坏死灶的动物数/组内动物总数 $\times 100\%$; 随机取10个高倍镜视野($\times 400$), 每个视野内计算空骨陷窝百分率=空骨陷窝数/总骨陷窝数 $\times 100\%$ 。

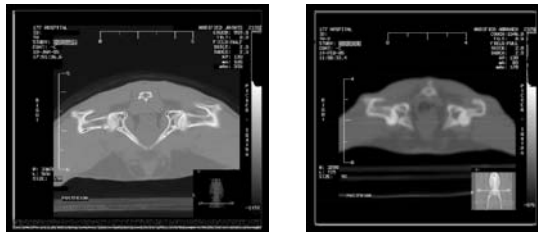
主要观察指标: 骨体积分数, 骨矿物质密度, 骨矿物质含量, 骨矿物质含量, 骨小梁厚度, 骨小梁间隙、组织切片骨坏死率及空骨陷窝率。

统计学分析: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 11.0软件对数据结果进行 χ^2 检验及 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用新西兰白兔30只, 模型组20只注射地塞米松3周后死亡2只, 对照组10只均存活。

2.2 股骨头坏死兔与对照组兔的股骨头CT扫描结果比较 模型组两侧股骨头明显变形, 股骨头骨密度不均一, 关节面模糊。对照组两侧股骨头关节面清晰, 骨的密度无异常, 见图1。



a: Model group

b: Control group

Figure 1 CT scan results

图1 两组CT扫描结果

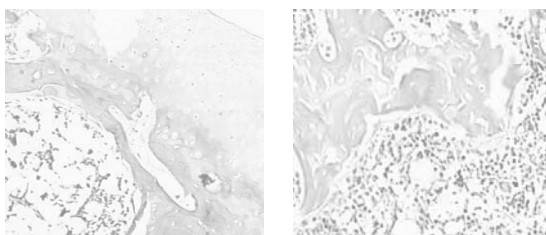
2.3 两组存活动物显微CT骨计量学指标结果 模型组骨体积分数、骨矿物质密度、骨矿物质含量和骨小梁厚度均显著低于对照组, 而骨小梁间隙高于对照组($P < 0.05$), 见表1。

表1 两组动物 Micro-CT 骨计量学指标比较
Table 1 Comparison of Micro-CT bone metrological parameters for survived animals in two groups ($\bar{x} \pm s$)

Item	Model group	Control group
<i>n</i>	18	10
Bone volume fraction (%)	0.24±0.07	0.56±0.23 ^a
Bone mineral density (g/cm ³)	384.27±32.65	762.06±41.48 ^a
Bone mineral content (g)	93.21±28.55	196.72±12.46 ^a
Trabecular thickness (μm)	6.79±0.83	7.53±0.27 ^a
Trabecular bone gap (μm)	16.38±2.94	11.46±0.32 ^a

^a $P < 0.05$, vs. control group

2.4 股骨头坏死股骨头组织病理变化 模型组兔股骨头软骨层变薄, 部分可见软骨面剥脱, 软骨下骨小梁明显变细稀疏, 结构紊乱, 部分骨小梁断裂不连续, 陷窝内骨细胞明显减少, 骨细胞陷窝中有广泛的脂质沉积, 脂肪细胞体积与数量明显增多, 部分融合成泡状, 髓腔内造血细胞明显减少, 软骨下骨微血管内可见血栓形成。对照组股骨头骨小梁致密, 排列规则, 骨细胞形态结构正常, 陷窝内见较多骨细胞, 脂肪细胞分布均匀, 脂肪细胞大小均匀, 见图2。



a: Model group

b: Control group

Figure 2 Histological changes of two groups (Hematoxylin-eosin staining, ×400)

图2 两组组织学变化(苏木精-伊红染色, ×400)

两组骨坏死率及空骨陷窝率见表2。

表2 两组的骨坏死率及空骨陷窝率比较
Table 2 Comparison of osteonecrosis and empty bone lacuna rate in two groups (%)

Item	Model group	Control group
<i>n</i>	18	10
Osteonecrosis rate	88.9(16/18) ^a	76.06 (0/10)
Empty bone lacuna rate ($\bar{x} \pm s$)	47.7±1.6 ^a	6.3±0.2

^a $P < 0.05$, vs. control group

3 讨论

股骨头坏死多发于30~59岁之间^[10], 发展到后期可导致股骨头塌陷并继发骨关节炎, 严重影响患者的正常生活, 是一种致残率相当高的疾病。非创伤性股骨头坏死常见原因有血红蛋白病、减压病、使用激素、酗酒等, 其中糖皮质激素是股骨头坏死最常见的原因^[11]。对于研究股骨头坏死的发病机制及治疗方法, 建立与股骨头坏死病程相似的动物模型是非常重要的。

兔常被用于建立激素诱导性股骨头坏死模型, 但糖皮质激素的用量、类型和股骨头坏死的发病率各家报道不一; 同时, 在建立股骨头坏死模型过程中, 单独应用激素还是联合应用一些辅助制剂(如内毒素、马血清等)各家意见尚存分歧。以往学者多采用给健康动物单一注射激素诱导股骨头坏死模型, 其结果很难产生典型的骨坏死病变^[12]。因为在临床实际中只是在肾病综合征、感染性休克、妊娠并发症、恶性肿瘤、系统性红斑狼疮等疾病时应用激素较多, 且较容易出现股骨头坏死的并发症。这就说明在大部分激素性股骨头坏死的临床病例中, 在应用激素以前机体已经有血液系统和脉管系统的病变基础或者有免疫系统失调, 那么在建立股骨头坏死动物模型应用激素前, 加用一些辅助制剂造成血液系统和脉管系统病理改变后, 再应用激素, 这样更接近临床发病及治疗情况, 由此建立的动物模型更有利于对临床治疗及预防的研究。事实上, 在加用辅助制剂后建立模型的效率会明显提高, 造模时间相对缩短^[13]。

国内外学者对激素性股骨头坏死进行了大量的研究, Tsuji等^[14]运用cDNA 阵列和RT-PCR技术发现低氧状态下高剂量激素更易引起细胞凋亡, 也有研究认为糖皮质激素诱导的高血压扰乱了股骨头血流和股骨头修复过程^[15], 国内外不少学者均发现激素性和酒精性股骨头坏患者血浆中的管内皮舒张因子含量明显减少^[16]。Drescher等^[17]认为内皮素含量升高, 可以使血管强烈收缩, 在股骨头内形成高灌低排、髓内血液淤滞、骨内高压及血液高凝, 易于形成血栓。糖皮质激素能诱导骨髓基质细胞向脂肪细胞分化, 减少向成骨细胞分化^[18]。提示糖皮质激素可能首先通过升高骨内压力导致骨缺血, 随

后通过骨髓内成脂进一步减少股骨头的血流量^[19-21]。

Yin等^[22]报道, 地塞米松可直接诱导骨髓基质细胞分化成大量脂肪细胞, 抑制其成骨性分化。本实验采用地塞米松联合脂多糖制备的兔股骨头坏死模型骨坏死范围广, 坏死部位包括骨骺端、干骺端和骨干, 骨坏死率高, 与临床所见骨坏死表现一致^[23-25]。MRI对股骨头坏死早期诊断有较高的敏感性, 能早期准确描述骨坏死的形态、部位及炎性反应过程。实验使用了CT、显微CT扫描以及组织学切片三种检测来评价早期股骨头缺血性坏死, 3种方法可以互相弥补。CT扫描快速安全, 能够大体观察股骨头密度的变化, 作为一种无创伤性的检测手段, 比普通X射线更加准确地反映出小动物髓关节的病理变化。在显微CT分析中, 骨体积分数描述了骨组织与整体组织的比例; 而骨小梁三维厚度和连接密度则定量描述了柱状和板状的骨小梁结构特点。骨骼力学强度减低不仅与骨矿物质密度减少有关, 还与微结构异常有关。二维横断面图像在描述连接性上有局限性, 原因是骨小梁在垂直方向的走向并非规律有序, 因此显微CT的三维重建分析方法较传统的组织学切片计量学方法更为可靠。

组织学切片观察则是一种最常规观察病理改变的检测手段之一。Hanzeur等^[26]对髋关节疼痛, 而X射线检查没有病理改变的I期股骨头坏死患者取活检, 其病理报告为骨小梁变细、坏死, 骨髓细胞坏死, 骨样基质再生。这与本文造模的影像学改变相似, 如均出现成骨细胞死亡、骨髓坏死、脂肪细胞增生、数目增多, 以及可能出现的组织修复反应。

综上所述, 地塞米松联合脂多糖能够诱导兔早期股骨头缺血性坏死模型, 并且方法简单、快速, 更加接近人早期股骨头缺血坏死。

4 参考文献

- [1] Lieberman JR, Berry DJ, Mont MA, et al. Osteonecrosis of the hip: management in the 21st century. Instr Course Lect. 2003;52: 337-355.
- [2] Pengde K, Fuxing P, Bin S, et al. Lovastatin inhibits adipogenesis and prevents osteonecrosis in steroid-treated rabbits. Joint Bone Spine. 2008;75(6):696-701.
- [3] Pierre-Jacques H, Glueck CJ, Mont MA, et al. Familial heterozygous protein-S deficiency in a patient who had multifocal osteonecrosis. A case report. J Bone Joint Surg Am. 1997;79(7): 1079-1084.
- [4] Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Schwartzman reaction. Clin Orthop Relat Res. 1995;(316):235-243.
- [5] Irida T, Yamamoto T, Miyamishi K, et al. Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits. Bone. 2001;28(6):641-649.
- [6] Yamamoto T, Irida T, Sugioka Y, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 1997;40(11):2055-2064.
- [7] Tang CF, Li GX, Wen J, et al. Zhongguo Redai Yixue. 2008;8(2): 213-215.
汤晨逢, 李国新, 温健, 等. 地塞米松磷酸钠对兔关节软骨细胞体外培养的影响[J]. 中国热带医学, 2008,8(2):213-215.

- [8] Jiang HJ. Yangzhou: Yangzhou University, 2009.
江海娟. 地塞米松和环丙沙星对犬软骨细胞的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2009.
- [9] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [10] Miyamishi K, Yamamoto T, Irida T, et al. A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Rheumatology (Oxford). 2001;40(2):196-201.
- [11] Jones LC, Hungerford DS. The pathogenesis of osteonecrosis. Instr Course Lect. 2007;56:179-196.
- [12] Wang KZ, Wang CS, Wu YG, et al. Zhonghua Yixue Zazhi. 2006; 86(29):2024-2027.
王坤正, 王春生, 武永刚, 等. 激素性股骨头坏死血管变化的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2006,86(29):2024-2027.
- [13] Matsui M, Saito S, Ohzono K, et al. Experimental steroid-induced osteonecrosis in adult rabbits with hypersensitivity vasculitis. Clin Orthop Relat Res. 1992;(277):61-72.
- [14] Tsuji M, Ikeda H, Ishizu A, et al. Altered expression of apoptosis-related genes in osteocytes exposed to high-dose steroid hormones and hypoxic stress. Pathobiology. 2006;73(6): 304-309.
- [15] Assouline-Dayan Y, Chang C, Greenspan A, et al. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. Semin Arthritis Rheum. 2002; 32(2):94-124.
- [16] Kerachian MA, Harvey EJ, Cournoyer D, et al. Avascular necrosis of the femoral head: vascular hypotheses. Endothelium. 2006;13 (4):237-244.
- [17] Drescher W, Varoga D, Liebs TR, et al. Femoral artery constriction by norepinephrine is enhanced by methylprednisolone in a rat model. J Bone Joint Surg Am. 2006; 88 Suppl 3:162-166.
- [18] Akaike M, Matsumoto T. Glucocorticoid-induced reduction in NO bioavailability and vascular endothelial dysfunction. Clin Calcium. 2007;17(6):864-870.
- [19] Kim HK, Sanders M, Athavale S, et al. Local bioavailability and distribution of systemically (parenterally) administered ibandronate in the infarcted femoral head. Bone. 2006;39(1): 205-212.
- [20] Yeh CH, Chang JK, Wang YH, et al. Ethanol may suppress Wnt/beta-catenin signaling on human bone marrow stroma cells: a preliminary study. Clin Orthop Relat Res. 2008;466(5):1047-1053.
- [21] Drescher W, Bunger MH, Weigert K, et al. Methylprednisolone enhances contraction of porcine femoral head epiphyseal arteries. Clin Orthop Relat Res. 2004;(423):112-117.
- [22] Yin L, Li YB, Wang YS. Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis. Chin Med J (Engl). 2006;119(7):581-588.
- [23] Tong PJ, Wu YG, Xiao LW, et al. Zhongguo Gushang. 2002;15(6): 343-346.
童培建, 吴云刚, 肖鲁伟, 等. 高凝、低纤和高脂血症在实验性激素性股骨头坏死发生中的作用[J]. 中国骨伤, 2002,15(6):343-346.
- [24] Zhang G, Qin L, Sheng H, et al. Epimedium-derived phytoestrogen exert beneficial effect on preventing steroid-associated osteonecrosis in rabbits with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition. Bone. 2007;40(3):685-692.
- [25] Qin L, Zhang G, Sheng H, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone. Bone. 2006;39(4):863-871.
- [26] Hauzeur JP, Perlmutter N, Appelboom T, et al. Medullary impairment at early stage of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head. Rheumatol Int. 1991;11(4-5):215-217.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 辽宁省教育厅基金资助项目(2008-7-29);
沈阳科技局基金资助项目(1081233-1-00-03)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第三、四作者进行实施, 第二作者进行实验评估, 资料收集为第一、四作者, 第一作者成文, 第二作者审核, 第一、二作者对文章负责。

致谢: 感谢沈阳医学院临床教研室提供实验室以及干细胞培养技术支持。感谢沈阳医学院眼视光学院在转基因实验方面的帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。