论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1026-03

RCS大鼠视网膜色素变性过程中视网膜形态学研究

陈丽峰,陈中山,曾玉晓,翁传煌,阴正勤 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究遗传性视网膜色素变性大鼠(Royal College of Surgeons rat,RCS rat)在视网膜变性发展过程中视网膜形态学变化。**方法** RCS-p+(视网膜含色素的变性大鼠)按出生后视网膜变性的发展状况分为变性早期(RCS 15 d)、中期(RCS 30 d)、晚期(RCS 90 d)3个时相点,分别采用相应时期的RCS-rdy+p+(视网膜含色素的正常大鼠)作为对照组(control groups, C 15 d, C 30 d, C 90 d),每组5眼,取各组大鼠眼球进行视网膜切片,行HE染色,采用MIAS-1000图像分析系统在400倍光镜下测视网膜外节(OS)、外核层(ONL)以及内核层(INL)厚度。**结果** ①视网膜感光细胞随着病变的发展逐渐变性死亡,晚期视网膜色素上皮层和感光细胞层结构紊乱,但光镜下观察内核层、神经节细胞层仍保持较正常的形态。②与对照组比较,RCS大鼠视网膜色素变性过程中感光细胞外节膜盘堆积,外核层变薄,内核层在变性中期增厚,早期及晚期变薄。**结论** ①RCS大鼠病变发展过程中视网膜各层神经元形态改变的不一致性。②变性中期视网膜内核层较对照组增厚,可能与该时期内核层神经元缺乏前级神经元的信号输入致细胞突起反应性增生,产生视网膜形态重构(remodeling)有关。

关键词: 视网膜色素变性;形态学

中图法分类号: R322.91;R329.24;R774.130.2 **文献标识码:** A

Morphological study of retina in RCS rats during retinal degeneration

CHEN Li-feng, CHEN Zhong-shan, ZENG Yu-xiao, WENG Chuan-huang, YIN Zheng-qin (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate morphological changes of retina in the Royal College of Surgeons (RCS) rats with the onset and development of retinitis pigmentosa (RP). **Methods** The RCS rats with inherited retinal dystrophy were divided into 3 groups: an initial stage group (RCS 15 d), a mid-stage group (RCS 30 d) and an advanced stage group (RCS 90 d) according to the severity of degeneration ($n=5$ animals in each group). These were compared with RCS-rdy+p+ rats without retinal degeneration (control groups, C 15 d, C 30 d, C 90 d). One retina of every animal was prepared for retinal slices and stained using hematoxylin-eosin (HE) method (The contralateral retina was prepared for other experiments). The thickness of outer segments (OS), outer nuclear layer (ONL) and inner nuclear layer (INL) was measured by MIAS-1000 image analysis system under light microscope. **Results** Photoreceptors of RCS rats were degenerated progressively. At late stage of retinal degeneration the structures of the retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptors layer were disorganized, but the morphology of inner nuclear layer and retinal ganglion cell (RGC) layer appeared normal. Compared with control groups, the breakdown of RPE caused a piling up of OS membranous disc photoreceptors of RCS rats with the onset and development of RP, and ONL thinning. However, INL was thickening in RCS 30 d, 15 d, and 90 d groups as compared with control groups. **Conclusion** The morphology of each layer neurons of retina in RCS rats remains change discordantly with the onset and development of RP. The thicker INL of retina in RCS rats in mid-stage group is possibly related with the reactive hyperplasia of cell processes and retinal morphology remodeling, which is resulted from lacking of signal input of fore-level neurons in retina INL.

Key words: retinitis pigmentosa; morphology

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB724302)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB724302)

作者简介: 陈丽峰(1975-),女,山西省太谷县人,博士研究生,医师,主要从事视网膜色素变性疾病机制方面的研究。电话:13696458102,E-mail: chenlf5468@gmail.com

通讯作者: 阴正勤,电话:(023)68754401

收稿日期: 2006-02-07;**修回日期:** 2006-03-22

视网膜色素变性（retinitis pigmentosa，RP）是属于视锥、视杆营养不良的一组遗传病，组织病理学证实 RP 是原发于感光细胞变性、死亡，继发于其后的视网膜色素上皮（retinal pigment epithelium，RPE）改变。目前还没有可有效阻止病变进展和恢复视网膜功能的治疗方法[1-3]。在过去的数年间，人们对视网膜变性疾病的认识在各领域，包括分子遗传学、基因工程和药理学等的研究，有了一定的进展。而变性过程中视网膜各层形态学出现什么样的变化，目前鲜有报道。本研究对 RCS 大鼠病变发展的不同阶段视网膜形态学改变进行观察，了解本实验室从国外引进的 RCS 大鼠和对照大鼠发育过程中的视网膜形态学改变，为功能研究奠定基础。

皇家外科学院大鼠（Royal College of Surgeons rat，RCS）为遗传性视网膜色素变性的经典动物模型，该鼠患有一种以感光细胞进行性变性为特征的常染色体隐性遗传病。RCS 大鼠为视网膜色素变性疾病发生发展的认识，为治疗这类疾病新的途径的探索，提供了一种极佳的动物模型。

1　材料与方法

1.1　实验动物分组

RCS 大鼠 15 只（Beckman Vision Center，UCSF School of Medicine，San Francisco，CA，USA 赠送，第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供）分 2 个品种 4 系：RCS（褐顶，无色素眼，网膜萎缩）；RCS-rdy +（褐顶，无色素眼，无网膜萎缩，对照）；RCS-p +（黑顶，色素眼，网膜萎缩）RCS-rdy + p +（黑顶，色素眼，无网膜萎缩，对照）。

RCS-p + 大鼠 15 只，250 ~ 300 g，雌雄不限，按出生后 15、30、90 d 分为 3 组，每组 5 只。应用同时同龄组 RCS-rdy + p + 大鼠（含色素正常 RCS 大鼠）各 5 只作各组正常对照，每组 5 只。对各组大鼠取 1 眼视网膜切片后行苏木精-伊红染色。

1.2　实验步骤

将大鼠乙醚麻醉，摘除眼球，一侧眼做组织学在冰浴条件下去除眼前节，将眼杯在 4% 中性甲醛液中浸泡固定 3 d，石蜡包埋眼杯，切片 4 μm，常规行 HE 染色。

光学显微镜下观察视网膜各层结构。光镜下观察并照相，采用 MIAS-1000 图像分析软件测量内核层（inner nuclear layer，INL）外核层（outer nuclear layer，ONL）以及外节（outer segments，OS）厚度。每张切片测 5 处，规则分隔。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　视网膜色素变性过程中视网膜光感层外节（OS）厚度变化

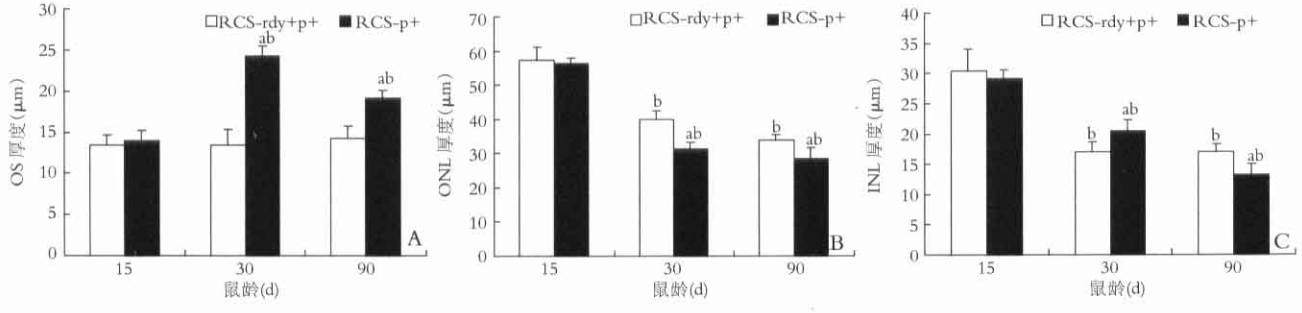
对照组大鼠在视网膜发育过程中（15、30、90 d）视网膜光感层外节（OS）厚度无显著变化；而变性大鼠视网膜 OS 厚度在 30、90 d 时较 15 d 时显著增厚，且与各自相同年龄的正常组大鼠比较也显著增厚（图 1A）。

2.2　视网膜色素变性过程中视网膜外核层（ONL）厚度变化

不同鼠龄视网膜外核层（ONL）厚度 30、90 d 时与 15 d 比较显著变薄，后两者之间无显著差异，且 ONL 厚度在变性鼠较相应时期正常鼠更为变薄（图 1B）。

2.3　视网膜色素变性过程中视网膜内核层（INL）厚度变化

正常组不同鼠龄视网膜内核层（INL）厚度在 30、90 d 时较 15 d 时显著变薄，但变性 30 d 鼠 INL 厚度较相应时期增厚（图 1C）。



a：$P<0.01$，与 RCS-rdy + p + 同年龄组和 15 d 比较；A：OS. a：$P<0.01$，与 RCS-rdy + p + 同年龄组比较；b：$P<0.01$，与 15 d 鼠比较；B：ONL. a：$P<0.01$，与 RCS-rdy + p + 同年龄组比较；b：$P<0.01$，与 15 d 鼠比较；C：INL.

图 1　视网膜色素变性过程中 OS、ONL、INL 厚度变化

3　讨论

视网膜色素变性（retinitis pigmentosa，RP）是一种遗传性进行性视网膜退行性病变，RP 发病率 1/3 500 ~ 1/4 000，好发于青壮年。常染色体隐性遗传占 60%，显性 10% ~25%，5% ~18% 为 X - 连锁遗

传[4]。尽管在诸多领域对该病进行了多方位、多层次的研究，但目前还没有阻止病变进展和恢复视功能的治疗方法，究其原因是目前对该病的发病机制尚未认识清楚。皇家外科学院大鼠 RCS 为遗传性视网膜色素变性的经典动物模型，本研究采用 HE 染色方法对 RCS 大鼠与对照组大鼠在发育过程中视网膜形态改变进行观察比较，研究 RCS 大鼠发育过程中视网膜的形态学特性，为下一步的电生理学研究奠定基础。

对照组大鼠在视网膜发育过程中感光细胞外节厚度无显著变化；而变性大鼠在 30、90 d 时外节增厚，这可能是由于视网膜色素上皮细胞吞噬感光细胞外节膜盘能力的缺陷，致使视细胞碎屑堆积所致。RCS 大鼠睁眼前（约出生后 14 d），视网膜未受到光线刺激，感光细胞外结膜盘未脱落，此时视网膜发育正常，与正常大鼠相比未见明显差异。睁眼后视网膜接受形觉刺激，感光细胞外节膜盘脱落并在感光细胞外节顶端堆积，成为视网膜变性最早的征象，提示外节膜盘的堆积可能是感光细胞变性的起始原因。脱落的外节膜盘不断堆积，出生后 30 d 时 RCS 大鼠感光细胞外节层较对照组显著增厚，随着病情的进展进一步变宽，而残留的感光细胞外节结构紊乱，丧失正常的杆状形态。该现象可能与脱落的外节膜盘不断堆积而未能及时吞噬和代谢有关，进而进一步影响了视细胞的正常代谢从而加速视细胞的死亡。

RCS 大鼠及对照组大鼠视网膜外核层厚度在出生后 15、30、90 d 时均表现为逐渐变薄，但在变性中、晚期 RCS 鼠较相应时期与对照鼠相比外核层厚度显著变薄，这与视网膜变性中、晚期感光细胞变性死亡有关。关于感光细胞死亡的机制目前尚不清楚，以往的研究认为凋亡在视网膜变性的发病机制中扮演了极为重要的角色[5]。

RCS 大鼠及对照组大鼠其视网膜内核层厚度在出生后 15、30、90 d 时均表现为逐渐变薄，但在变性中期 RCS 鼠较相应时期对照鼠内核层厚度显著增厚，这可能与继发视网膜变性，视网膜内层发生了形态上的重构（remodeling）[6] 有关。病变晚期感光细胞变性死亡，不能接受外来的光线刺激，并将其转为电信号向下级传递，从而视觉刺激不能输入给内层神经元，导致后者的突起反应性增生，形成新的突起网络构建。其特点为，上级神经元发出轴索，其末梢形成微神经瘤或异常突触，造成视网膜回路重新连接[7]。

我们观察到在整个变性的过程中，甚至到晚期感光细胞已完全变性死亡后光镜下观察双极细胞和神经节细胞依然保持着较正常的形态，与 Villegas 等[8] 观察到的基本一致。然而内层神经元细胞形态保持正常，并不一定意味着功能的正常，An 等[9] 对来自视网膜变性的离体培养的神经节细胞功能进行了初步检测，认为在视网膜变性之后部分神经节细胞仍然保持着一定的对光反应性。我们采用视网膜组织膜片钳技术，发现在 RCS 鼠病程中期视网膜电流图（ERG）熄灭后，仍有 73.4% 神经节细胞可以诱发出动作电位；病程晚期，仍有 28.6% 神经节细胞可以诱发出动作电位，为视网膜移植后的功能重建提供了可能[10]。

视网膜变性晚期大体形态基本正常的内层神经元其超微结构是否发生了改变，内层视网膜在变性中期有可能存在的反应性增生的细胞，和细胞新的神经网络的形成能否正常发挥视网膜回路连接，并完成视觉信息传递的功能，以及视网膜移植之后有形态重构的供主和受体视网膜能否形成功能突触等均有待进一步研究，而本课题对变性过程中视网膜形态的研究为深入探讨视网膜变性机制奠定了基础。

参考文献：

[1] LUND R D, ONO S J, KEEGAN D J, *et al*. Retinal transplantation: progress and problems in clinical application[J]. J Leukoc Biol, 2003, 74(2): 151-160.

[2] 张辰星，阴正勤，许红霞，等. RCS 大鼠病变发育过程中视网膜神经节细胞形态学变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(8)：749-752.

[3] 陈丽峰，阴正勤，曾玉晓. RCS 大鼠视网膜色素变性过程中内源性干细胞激活的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(7)：656-658.

[4] 李凤鸣. 眼科全书[M]. 北京：人民卫生出版社，1996：2273-2280.

[5] ALDER R. Mechanisms of photoreceptor death in retinal degenerations. From the cell biology of the 1990s to the ophthalmology of the 21st century?[J]. Arch Ophthalmol, 1996, 114(1): 79-83.

[6] MARC R E, JONES B W, WATT C B, *et al*. Neural remodeling in retinal degeneration[J]. Prog Retin Eye Res, 2003, 22(5): 607-655.

[7] STRETTOI E, PIGNATELLI V, ROSSI C, *et al*. Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice[J]. Vision Res, 2003, 43(8): 867-877.

[8] VILLEGAS-PEREZ M P, VIDAL-SANZ M, LUND R D. Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy[J]. Neuroreport, 1996, 7(12): 1995-1999.

[9] AN G J, ASAYAMA N, HUMAYUN M S, *et al*. Ganglion cell responses to retinal light stimulation in the absence of photoreceptor outer segments from retinal degenerate rodents[J]. Curr Eye Res, 2002, 24(1): 26-32.

[10] CHEN Z S, YIN Z Q, CHEN S, *et al*. Electrophysiological changes of retinal ganglion cells in Royal College of Surgeons rats during retinal degeneration[J]. Neuroreport, 2005, 16(9): 971-975.

（编辑 张大春）