论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2182-03

慢性高眼压模型大鼠闪光视觉诱发电位改变的实验研究

马建洲,贺翔鸽,谢 琳,孙亚丽 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科,重庆 400042)

提 要:目的 观察慢性高眼压模型大鼠闪光视觉诱发电位(flash visual evoked potential, F-VEP)的改变,评价F-VEP监测高眼压模型大鼠视功能状态的可能性。**方法** 建立高眼压模型。SD大鼠35只,532-二极管激光行右眼角缘小梁网和角巩膜缘静脉光凝,左眼为对照眼,激光后3 d,1周,1、2、3个月和6个月观察眼压;10只高眼压模型大鼠分别于第2、6个月用TGC-350V视觉电生理仪行F-VEP检查,其余用于观察模型大鼠视网膜视神经的组织学改变。**结果** 实验眼第2个月时平均眼压显著高于对照眼($P<0.05$),第6个月时测量眼压基本恢复正常;第2、6个月的实验眼、对照眼均可引出典型的、重复性好的NPN波形。F-VEP特点:第2个月时AP_1(N_1-P_1振幅)降低($P<0.05$),并且AP_1波幅值降低持续至第6个月时仍未恢复;LP_1(P_1波潜伏期)第2个月时无明显变化($P>0.05$),第6个月时则明显延迟($P<0.05$),实验眼视网膜神经节细胞减少和视神经纤维密度减低与F-VEP改变相吻合。**结论** F-VEP可以客观反映高眼压模型的视功能状态。

关键词:闪光视觉诱发电位;高眼压;青光眼

中图法分类号:R-332;R770.43;R775 **文献标识码**:A

Variations of flash visual evoked potential in SD rats with intraocular hypertension

MA Jian-zhou, HE Xiang-ge, XIE Lin, SUN Ya-li (Department of Ophthalmology, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the alteration of flash visual evoked potential (F-VEP) and evaluate the effects of the potential on detecting optic nerve function in intraocular hypertension SD rats. **Methods** Total 35 SD rats received a 532-nm wavelength diode laser burning at the trabecular meshwork and episclera veins of the right eyes to establish a model with chronic elevation of intraocular pressure(IOP). Their left eyes were regarded as control. After laser burning the IOP was measured by a tono-pen at 3 d, 1 week, 1, 2, 3 and 6 months. The F-VEP was monitored in 10 rats at 2 and 6 months. Others were observed pathologically. **Results** The chronic hypertension were successfully obtained at the right eyes of 30 rats, with their mean IOP [(24.9±4.9) mmHg] significantly higher than that of control eyes [(17.4±4.8) mmHg] at 2 months. But there was no significant difference on the index at 6 months [(17.1±3.7) *vs* 18.5±2.8) mmHg]. The characteristic and repeatable NPN curve of F-VEP was reliably observed on the both eyes of rats at 2 and 6 months. As the positive and negative reflections was designated as P1 and N1, the amplitude of N_1-P_1 was decreased in comparison with that of the control at 2 months [(13.03±3.11) *vs* (21.14±3.10) μV], and even lasted to 6 months ($P<0.05$). There was no significant difference on the latency of P1 between the 2 group, but it was obviously delayed in 6 months[(74.47±8.05) *vs* (59.73±4.16)ms, $P<0.05$]. The decreased number of retina ganglin cells and the reduced density of optic nerve fiber in modal eyes were coincide with the variation of F-VEP. **Conclusion** The F-VEP can objectively reflect the optic nerve function in the intraocular hypertension rats model.

Key words: flash visual evoked potential; intraocular hypertension; glaucoma

建立高眼压动物模型是研究青光眼损害和治疗的第1步[1]。本实验比较正常对照眼与高眼压模型大鼠的闪光视觉诱发电位(flash visual evoked potential, F-VEP)的差异,了解大鼠高眼压模型的视觉电生理的改变特征,以探讨F-VEP对大鼠视神经功能状态反映的可靠性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Sprague-Dawley大鼠35只,雌雄不拘,体

作者简介:马建洲(1973-),男,陕西省蒲城县人,硕士,主治医师,主要从事青光眼和屈光学方面的研究,现在西安解放军第323医院眼科。电话:(029)83762415,E-mail:jianzhoumaalice@163.com

通讯作者:贺翔鸽,E-mail:Xiangge_He@hotmail.com

收稿日期:2006-09-21;修回日期:2007-08-24

质量 200～250 g，由本院野战外科研究所实验动物中心提供。Tono-PenXL 眼压计测量双侧眼压均在 10～20 mmHg，左眼设为对照眼。饲养条件为室温 15～25 ℃，光照 12 h。

1.1.2　主要试剂及仪器　　1% 戊巴比妥钠（上海生物制药厂），电子台秤（无锡衡器厂），0.4% 倍诺喜眼液（日本参天株式会社），润舒滴眼液（正大福瑞达制药），Tono-PenXL 眼压计（美国 Medtronic SALON 公司），532-二极管激光（美国 Alcon 公司），手术显微镜（德国 Zeiss 公司），TGC-350V 视觉电生理检查仪（重庆泰克医电仪器有限公司）。

1.2　方法

1.2.1　高眼压动物模型制作[1]　　1% 戊巴比妥钠麻醉满意后，将大鼠俯卧位固定于手术台上，0.4% 倍诺喜眼液行眼表面麻醉，手术显微镜下，532-二极管激光行右眼角膜缘小梁网和 3/4 象限角巩膜缘静脉光凝，功率 0.45 W/0.7 s，光斑 60～80 个；3 d 后测量眼压不升高者，间隔 4 d 再次采用同样功率和方法激光；激光后 3 d，1 周，1、2、3 个月和 6 个月使用 Tono-PenXL 眼压计观察眼压，有 2 只大鼠眼压升高，饲养 6 个月至实验结束。有 2 只大鼠眼压不升高，予以剔除。将 10 只造模成功的大鼠在第 2、6 个月分别进行视觉电生理检查，其余大鼠用于观察视网膜和视神经的病理改变。

1.2.2　F-VEP 检查　　参照 ISCEV 标准[2]，采用 TGC-350V 视觉电生理检查系统，银-氯化银针电极阻抗 <2 kΩ，用全视野 Ganzfeld 球闪光刺激器，刺激光强 3.12 $cd \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$，放大倍数 20 000 倍，低频 0.1 Hz，高频 300 Hz，采用单刺激模式，刺激频率 1 Hz，记录 250 ms，波形叠加 100 次；大鼠麻醉后置于自制鼠盒固定。电极放置：作用电极置于枕骨粗隆上 0.5 cm，参考电极置于鼻根上部 0.5 cm，地电极置于乳突皮下；采用二通道记录；暗室内自然瞳孔，暗适应 10 min 后，采集对照眼和高眼压模型眼（实验眼）F-VEP 图形。检查 1 眼时，用不透光黑眼罩完全遮盖对侧眼。

1.2.3　病理切片制备　　取第 2、6 个月时各 5 只大鼠，麻醉满意后，将 0.01 mol/L PBS 由左心室灌注，灌注液颜色清亮后，用 4% 多聚甲醛继续灌注，灌注时见大鼠全身肌肉抽搐，肢体伸直僵硬，即为灌注成功的标志，随后双眼缝线，于 6、12 点标记。

摘除带视神经蒂的眼球。视神经长约 1.5 cm，在 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 24 h；流水充分过夜漂洗；乙醇梯度脱水；石蜡包埋；使切面为视神经的横形切面，切片厚度 3 μm，乙醇梯度脱蜡；用 1 ml/L H_2O_2 浸泡 10 min；1% 甲苯胺蓝液染色 12～14 h，自来水冲洗 10 min，电吹风干燥后，中性树胶封片。

1.2.4　眼球标本神经节细胞 Nissl 染色　　将标本浸入 4% 多聚甲醛/PBS 溶液中，24 h 固定。冰冻切片机上固定眼球，保持 6、12 点位与视神经蒂在同一水平面，近角膜缘平面处开始连续冰冻切片，厚度 8 μm。冰冻切片入双蒸水 10 s，Nissl 染液中浸泡 8 min，再用双蒸水冲洗，95% 酒精分色 10 s，100% 酒精脱水 1 min，至透明。中性树胶封片，用光学显微镜观察。

1.2.5　电生理观察指标[3]　　记录第 2 个月和第 6 个月实验眼和对照眼的 F-VEP，主要观察 AP_1（N_1-P_1 振幅）和 LP_1（P_1 波潜伏期）的测量值，振幅的大小以微伏（μV）为单位，潜伏期以毫秒（ms）为单位。测量指标：N_1 谷底至 P_1 顶峰为 N_1-P_1 的振幅值（AP_1），起始至 P_1 顶峰的时间为 P_1 峰潜伏期（LP_1），各指标值是 3 次测量的平均值。

1.3　统计学分析

计量资料以 $x \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行配对 t 检验和单因素方差分析。

2　结果

2.1　眼内压的变化及病理改变

2.1.1　眼内压的变化　　激光 3 d 后测量眼内压升高，实验眼眼压显著高于对照眼（$P<0.05$），持续 2 个月后，逐渐下降，第 6 个月时测量眼压已恢复到正常范围内，不同时间眼内压的变化见表 1。

2.1.2　病理切片变化　　冰冻切片 Nissl 染色提示第 2、6 个月时实验眼视网膜神经节细胞数目较对照眼明显减少（图 1）。视神经横断石蜡切片甲苯胺蓝染色结果显示，实验眼第 2 个月时神经纤维密度减低不明显，第 6 个月时视神经纤维密度明显减低（图 2）。结果提示高眼压青光眼模型成功。

表 1　不同时期对照眼、实验眼眼内压测量值（mmHg，$x \pm s$）

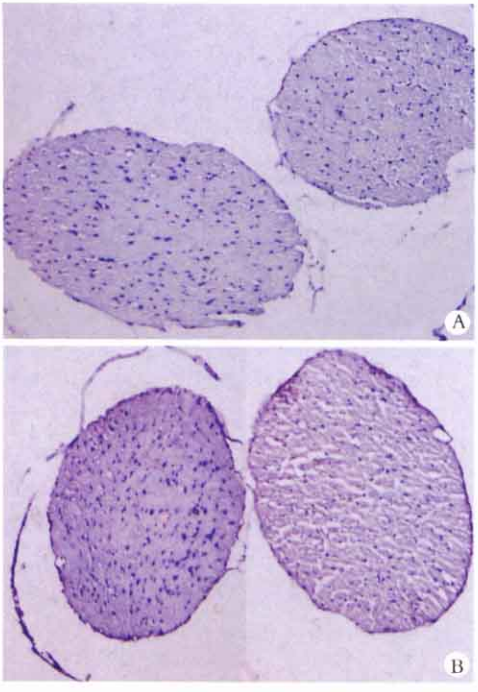
组别	实验前	实验后					
		第 3 天	第 1 周	第 1 个月	第 2 个月	第 3 个月	第 6 个月
对照眼	17.1 ±3.7	17.1 ±3.2	16.2 ±3.3	17.1 ±3.2	17.4 ±4.8	15.7 ±3.7	18.2 ±3.2
实验眼	17.0 ±3.4	22.6 ±5.1[a]	24.5 ±5.1[a]	25.0 ±4.1[a]	24.9 ±4.9[a]	22.5 ±3.8[a]	18.5 ±2.8

a：$P<0.05$，与对照眼比较



A：对照眼；B：实验眼（第 2 个月）；C：实验眼（第 6 个月）

图 1　对照眼和实验眼 RGCs 数目比较　（Nissl ×400）



A:第 2 个月;B:第 6 个月

图 2 对照眼(左侧)和实验眼(右侧)视神经纤维密度比较

(甲苯胺蓝 ×200)

2.2 实验眼与对照眼 F-VEP 比较

在我们的实验条件下记录到的 F-VEP 呈较稳定的 NPN 波形,分别定义 N_1 为初始第 1 个负相波,P_1 为初始第 1 个正相波。第 2、6 个月时,每只大鼠均引出了典型的 NPN 波形,连续测量 3 次,其波形重叠性较好。见表 2。

表 2 第 2、6 个月时 LP_1、AP_1 的观察值($n=10$,$x\pm s$)

组别	第 2 个月		第 6 个月	
	LP_1(ms)	AP_1(μV)	LP_1(ms)	AP_1(μV)
对照眼	60.26 ±4.12	21.14 ±3.10	59.73 ±4.16	22.01 ±4.43
实验眼	62.61 ±2.27	13.03 ±3.11[a]	74.47 ±8.05[ab]	12.79 ±2.30[a]

a:$P<0.05$,与对照眼比较;b:$P<0.05$,与第 2 个月比较

从表 2 可见,实验眼与对照眼比较:第 2 个月时 AP_1(N_1-P_1 振幅)降低($P<0.05$);LP_1(P_1 波潜伏期)差别不大($P>0.05$);而第 6 个月时 AP_1 仍然减低,P_1 波潜伏期明显延长($P<0.05$)。随着时间变化,对照眼的 LP_1 和 AP_1 均无明显差异($P>0.05$);第 6 个月压实验眼 AP_1(N_1-P_1 振幅)与第 2 个月实验眼 AP_1 相比较,无显著性差异($P>0.05$);而实验眼第 6 个月的 LP_1(P_1 波潜伏期)较第 2 个月明显延长($P<0.05$)。说明 F-VEP 可以客观反映高眼压模型的视功能变化。

3 讨论

由于视觉电生理检查可客观的评价视功能的损伤程度,故目前已在眼科的基础研究和临床诊疗中广泛应用。F-VEP 是用光刺激视网膜后,通过视路传递,在枕叶视皮层诱发的电活动,是一种评价神经功能状态较为成熟、客观、有效的方法,主要反映视网膜神经节细胞(retinal ganglial cells, RGCs)到视皮层的功能状态[4]。VEP 检测青光眼的研究表明:人类青光眼损害表现在图形视觉诱发电位(P-VEP)的潜伏期延长和振幅减低;青光眼视野缺损越严重,P-VEP 改变就越明显。同时 P-VEP 的振幅可以反映 RGCs 的数量,并作为青光眼视功能损害的客观指标。而 F-VEP 对于人类来说,虽波形变化大而灵敏度稍差,但其潜伏期的长短仍然可以反映视神经髓鞘的功能状态,波幅的大小可反映轴索的功能状态[5]。所以对于大鼠来说,F-VEP 是评价视神经功能的一个较好手段。本实验采用全视野闪光反射球作刺激,强度容易控制,引出了重复性好的波形,使评价大鼠视功能成为可能。但是由于设备、刺激和记录方法的不同,F-VEP 波峰的极性、潜伏期、波幅可能有很大的差异。另外由于大鼠的 F-VEP 存在个体差异,所以本实验采用自身对照,将个体差异减少到最小。

高眼压是青光眼最重要的危险因素。青光眼视功能损害的病理基础是 RGCs 的进行性凋亡及视神经纤维的丢失[4]。在我们的研究中:高眼压模型眼第 2 个月时的 AP_1 明显低于对照组,同期病理切片提示 RGCs 数目明显减少,证明高眼压导致 RGCs 的损害。功能上表现在 F-VEP 的 AP_1 值减低,但 LP_1 无明显变化,说明髓鞘功能尚能维持;实验眼第 6 个月时的 AP_1 较第 2 个月无明显降低,P_1 波潜伏期却延长,但是第 6 个月病理切片提示与第 2 个月比较 RGCs 数目无明显差异,而第 6 个月实验眼的视神经髓鞘密度较对照眼和第 2 个月则明显减低,表明第 2 个月后 RGCs 丢失减慢,但轴索损伤加重,从而出现对应视功能的改变,表现为 F-VEP P_1 波潜伏期明显延长。所以,在本研究中 F-VEP 的改变与视网膜视神经的病理改变一致,客观的反映了慢性高眼压视神经损伤的过程和程度。

Akabane 等[6]认为 F-VEP 波形的波幅可以很敏感地反映视神经损伤的程度,并预测恢复可能性的大小,重要波形的波幅下降超过 50%,即可认为是不可逆的损伤。本实验的波峰降幅均低于 10 μV,即 50% 以内,表明此模型为可逆性损伤,说明此动物模型可用于观察高眼压模型视神经保护效应的研究。

参考文献:

[1] Levkovitch-Verbin H, Quigley H A, Martin K R, *et al*. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(2): 402 - 410.

[2] 吴乐正, 吴德正. 临床视觉电生理[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 330 - 349.

[3] 周文炳. 临床青光眼[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 144.

[4] 牛建军, 王仕军, 王 一, 等. 视神经急性损伤后 Long Evans 大鼠闪光视觉诱发电位的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(5): 405 - 407.

[5] 潘映福. 临床诱发电位学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 375.

[6] Akabane A, Saito K, Suzuki Y, *et al*. Monitoring visual evoked potentials during retraction of the canine optic nerve: protective effect of unroofing the optic canal[J]. J Neurosurg, 1995, 82(2): 284 - 287.

(编辑 陈聪连)