论著

文章编号:1000-5404(2013)24-2614-05

可见光诱导广西巴马小型猪视网膜变性的实验研究

刘 俊,徐海伟,李世迎,孙 成,黎其友,陈泽华,阴正勤 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心,视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室)

[摘要] **目的** 采用可见光持续间断光照建立广西巴马猪的慢性视网膜变性模型,并探索活体鉴定广西巴马猪视网膜功能的方法。**方法** 白色可见光持续间断照射3~4月龄广西巴马小型猪3~6个月,建立小型猪视网膜变性模型。通过对模型猪进行眼底照相、光学相干断层扫描(OCT)、全视野视网膜电图(fERG)和多焦视网膜电图(mfERG)等检测,从形态和功能对光诱导视网膜变性模型进行活体鉴定。**结果** 与光照前相比,光变性巴马小型猪眼底照相无显著可见改变;OCT可见光变性猪视网膜ILM~RPE层厚度显著变薄($P<0.05$);fERG可见光变性猪在暗适应时最大混合反应的a、b波和ops波振幅均有显著下降($P<0.05$),在明适应时b波及P1波波幅也有显著下降($P<0.05$);mfERG可见光变性猪P1波平均振幅密度显著降低($P<0.05$)。**结论** 可见光持续间断光照可诱导广西巴马小型猪视网膜出现结构和功能改变,可作为慢性视网膜变性模型。

[关键词] 小型猪;视网膜变性;光学相干断层扫描;电生理

[中图法分类号] R-332;R774.13 [文献标志码] A

Visible light-induced retinal degeneration in Guangxi Bama miniature pigs

Liu Jun, Xu Haiwei, Li Shiying, Sun Cheng, Li Qiyou, Chen Zehua, Yin Zhengqin (Department of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Visual Damage and Regeneration & Restoration, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To establish a chronic retinal degeneration model with Guangxi Bama miniature pig by exposing to continuous intermittent visible light, and to explore the method for examining retinal function in live Guangxi Bama miniature pigs. Methods Guangxi Bama miniature pigs aged 3 – 4 months were exposed to continuous intermittent white light to induce chronic retinal degeneration. Fundus photography, optical coherence tomography (OCT), full-field electroretinography (fERG) and multifocal electroretinography (mfERG) were used to compare the differences of retinal functions between the normal pigs and light-induced retinal degeneration pigs and to identify optical retinal degeneration *in vivo*. Results As compared to the normal pigs, no significant visible fundus photographic change was found in the light-induced retinal degeneration pigs. Nevertheless, the thickness of retinal internal limiting membrane (ILM) to retinal pigment epithelium (RPE) layer was reduced obviously in OCT ($P<0.05$). Amplitudes of dark-adapted combined rod-cone response's a waves, b waves, and ops waves and light-adapted b waves and P1 waves of fERG also decreased clearly ($P<0.05$). Average amplitude density of P1 waves of mfERG significantly lowered ($P<0.05$). Conclusion Continuous intermittent visible light exposure leads to changes in the structure and function in porcine retinas, producing an appropriate chronic retinal degeneration model.

[**Key words**] miniature pig; retinal degeneration; optical coherence tomography; electrophysiology

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, 2013CB967002) and the National Natural Science Foundation of China (31271051, 81200710). Corresponding author: Yin Zhengqin, Tel: 86-23-68754401, E-mail: yzhengqin@163.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2013CB967002);国家自然科学基金(31271051,81200710)

[通信作者] 阴正勤,电话:(023)68754401,E-mail:yzhengqin@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1457.012.html(2013-09-14)

视网膜变性疾病如视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性等,是一类能导致视网膜细胞丢失和功能障碍的严重致盲性眼病。目前基于小型啮齿类动物如大鼠和小鼠模型的实验性药物治疗、干细胞治疗和基因治疗取得了重要进展[1-7],然而小型啮齿类动物眼睛和人眼在结构和功能上存在巨大差异,上述研究成果向临床过渡尚存在较大困难。这些新的治疗方法向临床转化中迫切需要大动物模型的验证。因此,探索合适的大动物视网膜变性疾病模型进行临床转化研究是一项非常有意义的工作。猪作为一种与人在解剖和生理上相近的大型哺乳动物,已经成为药物代谢、药理实验、疾病病理和诊断治疗等研究中的重要模型动物[8-9]。广西巴马小型猪原产于我国广西巴马瑶族自治县,因其体型矮小、遗传稳定等特性,尤为适合进行临床转化研究。慢性持续光照射是获得视网膜变性动物模型的主要方法之一,很多报道利用光已成功诱导出鼠、兔、猴等光性视网膜变性模型[10-12]。本课题组前期已在病理切片和电镜方面离体验证光诱导小型猪视网膜模型[13],本研究拟在活体上利用眼科不断发展的特有诊断检查设备,初步探索通过眼底照相、OCT、fERG和mfERG的检测,在体从形态和功能两方面对光诱导广西巴马小型猪视网膜变性模型进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验动物、麻醉及光照环境

1.1.1 动物 最初选择广西巴马小型猪12头进行筛选,雌雄不限,3~4月龄,8~12.5 kg,由第三军医大学实验动物中心提供。对12头巴马猪进行裂隙灯(No:704172,Topcon,Japan)、直接检眼镜(YZ6F检眼镜,苏州六六视觉科技股份有限公司)、眼底照相(5MEGA nonmyd α-D Fundus Camera,kowa,Japan)检查,最终选择了4头无视觉损害的动物用于本研究。

1.1.2 动物饲养环境及光照环境 动物饲养于第三军医大学实验动物中心普通级约10 m^2房间饲养室。环境温度维持在15~28 ℃,湿度在50%~70%,饮食饮水及活动不限,通风良好。改造饲养室,用反光铝板和锡箔纸装饰墙面及天花板,用白色瓷砖装修地面,安装12盏65 W白色节能灯(1 W=60 Lm,波长400~700 nm,广东省中山市欧普照明股份有限公司)于动物头部上方,其中6盏集中于动物休息处,其余灯分散安置于房间周边。调节灯管高度,控制在头部测量光照强度为2 500 lux。动物每周用1%的硫酸阿托品眼膏(上海通用药业股份有限公司)散瞳,每日光照时间为12 h,然后关灯,持续间断光照。

1.1.3 动物麻醉 各项实验检查前12 h巴马猪禁食禁水,前30 min先用盐酸塞拉嗪注射液(吉林省华牧动物保健品有限公司,0.15 mL/kg)和盐酸氯胺酮注射液(福建古田药业有限公司,0.1 mL/kg)联合肌肉注射麻醉。待进入检查室后,用氯化钠注射液500 mL和盐酸氯胺酮注射液8 mL/kg,以40滴/min静脉持续滴注,视麻醉效果控制输液速度及调整用量。

1.2 眼底照相

眼底照相机(Kowa nonmyd a-D 5MEGA,Japan)及配套的VK-2 Digital Imaging System,美多丽(复方托比卡按滴眼液,参天制药株式会社,日本),倍诺喜(盐酸奥布卡因滴眼液,参天制药株式会社,日本)。

温生理盐水洗浴角膜,倍诺喜表麻,2:00、4:00、8:00和10:00钟位角膜缘预置巩膜缝线,调整眼球位置与眼底照相机镜头至合适距离,调节屈光,以视盘定位进行成像。所有操作均由同一人完成,观察光照前后有无视网膜渗出、萎缩、出血及血管改变等表现。

1.3 光学相干断层扫描

Topcon 3D OCT-1000 Mark Ⅱ (Topcon,Japan)及配套的3D OCT检查分析软件。

前期准备同眼底照相,调整眼球位置与摄像头距离至合适,选择扫描模式为Macula,扫描方式为Radial-Scan(12),扫描范围为6.0 mm×6.0 mm,分辨率为1 024进行扫描成像,每次检查部位由视盘定位,选择偏颞下方无或少血管区,注意光照前后部位的一致性,所有操作均由同一人完成。

1.4 全视野视网膜电图

视觉电生理诊断系统(RETI-scan,Germany),ERG-jet角膜接触镜电极(Roland Consult Stasche&Finger HmbH,Deutschland)。参考电极、接地电极均为不锈钢自制针状电极,各电极自身阻抗均小于5 kΩ。海诺特(医用透明质酸钠凝胶,杭州嘉伟生物制品有限公司)。

先将猪在检查室暗适应20 min。开睑器打开双侧猪眼,角膜上滴加海诺特凝胶安放角膜接触镜电极,参考电极置于两侧外睑缘尾侧5 mm处皮下,地电极置于两眼之间的鼻骨中部皮下,1 min后开始记录暗适应反应波。交替记录单眼,每项检查重复3次,暗适应完成后明适应10 min,然后开始记录明适应反应波。

1.5 多焦视网膜电图

多焦视觉电生理系统VERIS(Science6.3.2,Edi Inc.,USA)。记录电极(Burian-Allen ERG Electrode,Hansen Ophthalmic Development Lab,USA)。

当瞳孔散大至约7 mm以上时滴加海诺特凝胶安放BA电极,接地电极置于两眼之间的鼻骨中部皮下,根据实时眼底红外监控定位视乳头后按照ISCEV人的刺激参数和指标开始记录。每只眼重复检查3次。

1.6 数据分析

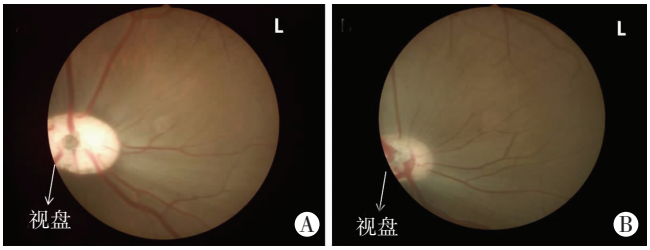
对光照前后的OCT扫描结果,用系统自带软件分析选定的视盘旁6.0 mm×6.0 mm区域的ILM-RPE视网膜细胞厚度变化。将波形稳定、干扰小的fERG结果输入到EXCEL 2007,a波振幅从基线开始到波谷,b波振幅从a波波谷到b波波峰,峰时均从闪光开始到波峰,从光照前后视杆反应、最大混合反应、ops波、视锥反应和flicker闪烁光反应分别对振幅和峰时进行分析。根据猪眼视网膜视锥细胞分布特点[14],参照ISCEV

和文献[15-16]报道的方法,将视网膜分3个区域:视乳头区、视条纹区、周边其他区,取波形稳定、干扰小的mfERG结果输入EXCEL2007。采用SPSS 11.0软件对4头猪共8只眼光照前后OCT的ILM~RPE厚度值、mfERG P1波平均振幅密度和潜伏期、fERG各反应波光照前后的波幅及峰时均值进行配对样本t检验($n=8$),检验水准0.05。

2 结果

2.1 巴马猪光照前后眼底比较

将同一头巴马小型猪光照前及光照后同一部位进行眼底照相,可见光照3个月后小型猪眼底与光照前相比,无明显的渗出、出血、萎缩等异常表现(图1)。

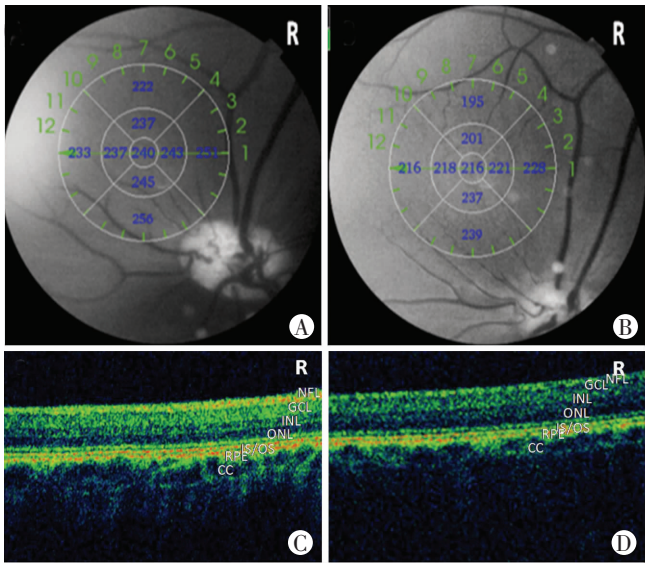


A:光照前眼底;B:光照3个月后眼底;L:示左眼

图1 光照前后眼底图像变化

2.2 巴马猪光照前后OCT的比较

以视盘为定位,测量视盘旁6.0 mm×6.0 mm无血管区ILM~RPE层视网膜厚度,可见与光照前[(239.0±3.1)μm]相比,光照后ILM~RPE层视网膜厚度[(215.7±4.8)μm]显著变薄($P<0.05$,图2)。



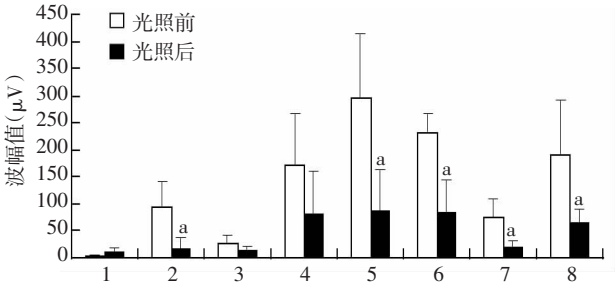
A:光照前OCT机实时扫描所得眼底图像;B:光照3个月后OCT机实时扫描所得眼底图像;圆形区域为6.0 mm×6.0 mm测量内界膜到RPE层厚度的区域;C、D:光照前后视网膜各层断层扫描影像;CC:脉络膜层;RPE:色素上皮层;IS/OS:感光细胞内外节;ONL:外核层;INL:内核层;GCL:节细胞层;NFL:神经纤维层;R:示右眼

图2 OCT检查光照前后视网膜厚度的变化

2.3 巴马猪光照前后fERG的比较

分析各反应振幅,与光照前相比,可见在暗适应时,光照后暗适应0.01视杆反应a、b波均无统计学差异($P>0.05$),而最大混合反应(暗适应3.0)的a、b波均较光照前显著下降($P<0.05$);明适应的a波无统计学差异,而b波及P1波波幅显著下降($P<0.05$);同时,暗适应ops波振幅也显著下降($P<0.05$,图3)。

分析各反应峰时,与光照前相比,光照后暗适应0.01视杆反应的b波显著提前($P<0.05$),暗适应3.0最大混合反应的b波显著延迟($P<0.05$),明适应3.0视锥反应b波显著提前,其余均无统计学差异($P>0.05$)。



a:$P<0.05$,与光照前比较;1:a波振幅暗适应0.01;2:a波振幅暗适应3.0;3:a波振幅明适应3.0;4:b波振幅暗适应0.01;5:b波振幅暗适应3.0;6:b波振幅明适应3.0;7:ops波OS2振幅暗适应3.0;8:P1波振幅明适应3.0

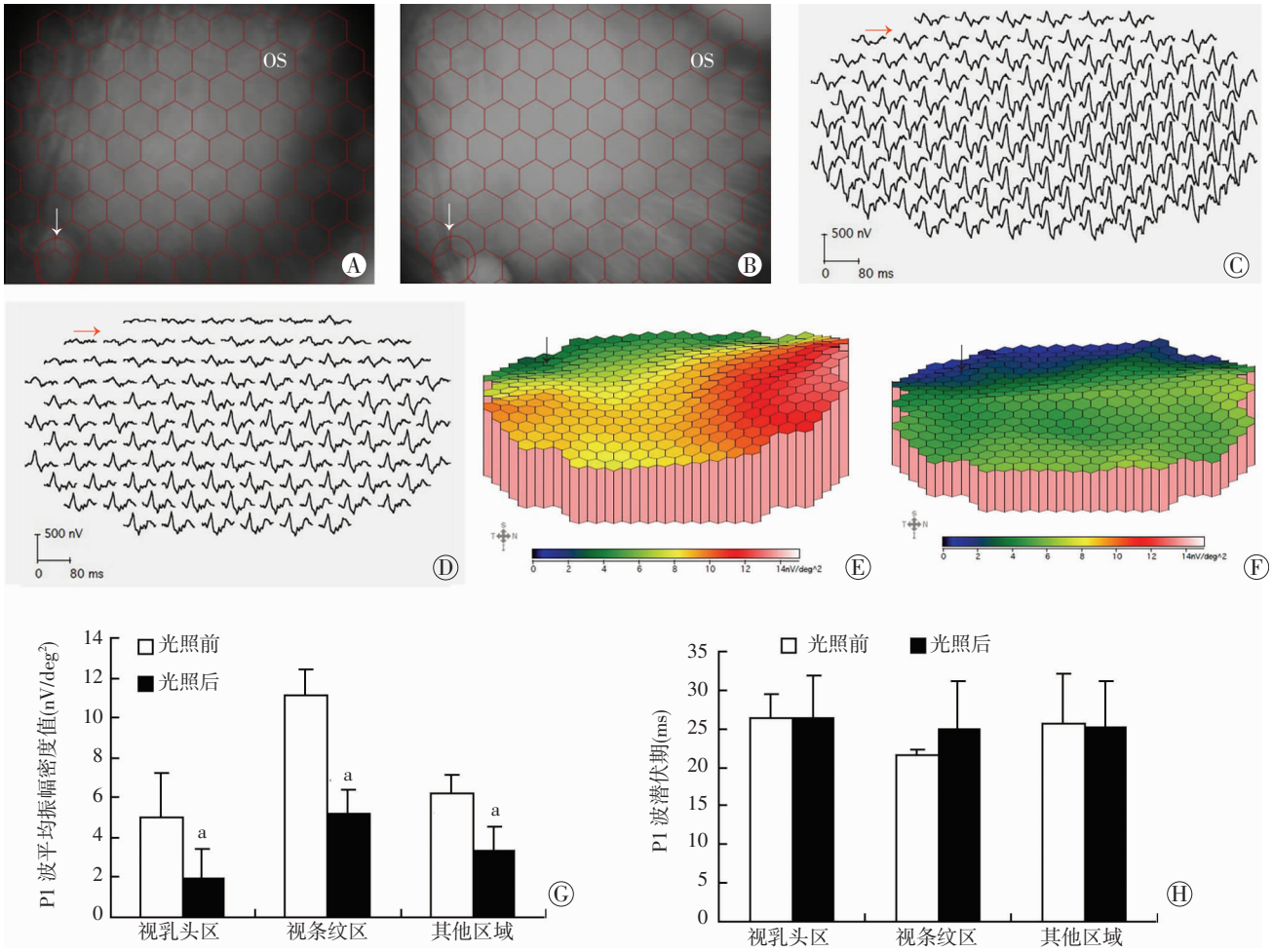
图3 光照前后fERG各反应振幅的变化

2.4 巴马猪光照前后mfERG的比较

以小型猪眼视网膜视盘为定位,进行mfERG检测,从Trace图、3D图均可见,与光照前相比,光照后波幅明显减小。各反应P1波平均振幅密度与潜伏期结果显示,与光照前相比,光照后视乳头区的平均振幅密度显著降低($P<0.05$),视条纹区和周边区域的平均振幅密度显著降低($P<0.05$);而3个区域的潜伏期均无显著变化($P>0.05$)。见图4。

3 讨论

视网膜变性疾病是世界范围内主要的致盲性眼病之一[17],一旦发生,均不可逆,给患者、家庭及社会带来了严重的负担。如何有效进行预防和治疗,是研究的热点。动物模型是探索治疗中必不可少的研究工具,目前主要用于视网膜变性疾病研究的动物模型是RCS(royal college of surgeons)大鼠和rd小鼠,然而由于鼠类眼球明显偏小,且只有约1%的感光细胞是视锥细胞[18]等,因此在临床转化方面有局限性。猪是与人在视网膜结构和细胞分布等都比较接近的大型哺乳动物,用猪作为模型不仅能更好进行大动物的过渡性研究,更能模拟人的眼球各部分特点探索更好的手术器械和方法。然而目前缺乏先天性遗传性视网膜变性



A、B:分别为光照前后 mfERG 检查实时眼底红外监控图;C、D:分别为光照前后 mfERG 检查波形图;E、F:分别为光照前后 mfERG 检查 3D 示意图;OS:均为左眼,箭头示视盘位置;G:光照前后 P1 波平均密度变化;a:$P<0.05$,与光照前比较;H:光照前后 P1 波潜伏期变化

图4 光照前后 mfERG 波形变化及定量分析

的猪模型,转基因猪成本又较高,所以通过物理和化学的方法是经济又方便地建立视网膜变性动物模型的方法。大部分视网膜变性疾病都与年龄相关[19],而慢性光诱导视网膜变性恰好能模拟人随着时间进展不断发生视网膜变性的特点,同时两者病理特点相似。视网膜变性疾病主要病理特征是视网膜上的色素上皮细胞、感光细胞、神经节细胞等的凋亡,Dureau[20]最早报道进行光诱导猪视网膜变性,但是其仅发现外核层细胞厚度变薄而未发现功能上的改变。而本课题组[13]研究证明光变性猪发生了感光细胞的线粒体肿胀、嵴断裂,因此,在年龄相关性视网膜变性的研究中慢性光诱导的方法具有独特的优势。由于巴马猪是在光照环境中活动不限,因此每头猪的损伤部位和损伤程度不一样,为了更好的用于下一步移植实验的研究就需要先对猪进行活体的鉴定,以明确模型建立是否成功。

本研究采用了眼底照相、OCT、fERG、mfERG 4 种方法在体对光照前后形态和功能进行分析。OCT 技术从 1991 年开始由 Huang David 等最早应用,经过时域 OCT 到频域 OCT 的发展,其能利用弱相干光干涉的基本原理在活体对眼视网膜形态进行分析。本研究发现光照后内界膜到 RPE 层的厚度明显变薄,说明光变性猪视网膜细胞发生了损伤,同时从断层扫描影像也可看出 RPE 层高反射区和感光细胞层低反射区的变化。但是由于技术受限,无法定性定量的分析单独的感光细胞层细胞等的损伤,相信随着 OCT 光学相干显微成像技术的进一步发展,分辨单个细胞将成为可能。巴马猪的 fERG 检查参照 ISCEV 标准[21]进行了 5 项反应的检测,由于猪眼位于侧面,所以采用 mini-Ganzfld 刺激器分开进行左右眼的检测更为精确。从暗适应最大混合反应 a、b 波和明适应 b 波、P1 波波幅的下降可以提示视网膜光感受器细胞、内层视网膜细胞发生了损伤;ops 波的下降提示视网膜的血液循环

障碍,可能与光变性后各种免疫应激反应等相关。光照前后 fERG 峰时波动较大,可能与样本量较小以及测量中各种不可控制的干扰因素相关。虽然猪眼光感受器细胞密度与人类相似[14],但是猪眼的视锥细胞存在一个密度较高的位于视盘上方的视条纹带,为使每个刺激六边形里的刺激相近,因此研究[22]认为 mfERG 检测采用 103 个等大的六边形进行刺激更为合理,本研究采用此方法,同时将视盘定位到下方,这样就能实时定位监控,明确检查的一致性。mfERG 主要反映视锥细胞的功能,本研究中,从 Trace 图和 3D 图明显可见的波幅降低以及 P1 波平均振幅密度数据的明显减小,提示可能视锥细胞光照后发生了明显的损伤。

综上所述,慢性光诱导小型猪视网膜发生了明显的细胞损伤和功能下降,模型建立成功,对于下一步探索人视网膜变性疾病特别是年龄相关性黄斑变性干细胞移植疗法的研究提供了较好的模型。相信随着眼科各种新设备的不断更新发展,在活体对显微形态的观察会更加精密,与功能学的进一步结合将为视网膜变性疾病的早期诊断和疗效观察评价提供更大的便利。

参考文献:

[1] Seiler M J, Aramant R B. Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants[J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(6): 661-687.

[2] Lim L S, Mitchell P, Seddon J M, *et al*. Age-related macular degeneration[J]. Lancet, 2012, 379(9827): 1728-1738.

[3] Schwartz S D, Hubschman J P, Heilwell G, *et al*. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report[J]. Lancet, 2012, 379(9817): 713-720.

[4] Sin H P, Liu D T, Lam D S. Lifestyle modification, nutritional and vitamins supplements for age-related macular degeneration[J]. Acta Ophthalmol, 2013, 91(1): 6-11.

[5] Ferrara N, Damico L, Shams N, *et al*. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration[J]. Retina, 2006, 26(8): 859-870.

[6] Martin D, Maguire M G, Ying G S, *et al*. Ranibizumab and Bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration[J]. N Engl J Med, 2011, 364(20): 1897-1908.

[7] Thumann G. Prospectives for gene therapy of retinal degenerations[J]. Curr Genomics, 2012, 13(5): 350-362.

[8] Ross J W, Fernandez-de-Castro J P, Zhao J G, *et al*. Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(1): 501-507.

[9] Scott P A, Kaplan H J, Sandell J H. Anatomical evidence of photoreceptor degeneration induced by iodoacetic acid in the porcine eye[J]. Exp Eye Res, 2011, 93(4): 513-527.

[10] Kozaki J, Takeuchi M, Takahashi K, *et al*. Light-induced retinal damage in pigmented rabbit-2. Effect of alpha-tocopherol[J]. Nihon Ganka Gakkai Zasshi, 1994, 98(10): 948-954.

[11] Tso M O. Photic maculopathy in rhesus monkey. A light and electron microscopic study[J]. Invest Ophthalmol, 1973, 12(1): 17-34.

[12] Inoue Y, Tsuruma K, Nakanishi T, *et al*. Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in light-induced photoreceptor degeneration in mouse retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(6): 3815-3829.

[13] Li S Y, Yin Z Q, Chen S J, *et al*. Rescue from light-induced retinal degeneration by human fetal retinal transplantation in minipigs[J]. Curr Eye Res, 2009, 34(7): 523-535.

[14] Hendrickson A, Hicks D. Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina[J]. Exp Eye Res, 2002, 74(4): 435-444.

[15] Hood D C, Bach M, Brigell M, *et al*. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition)[J]. Doc Ophthalmol, 2012, 124(1): 1-13.

[16] Voss-Kyhn M, Kiilgaard J F, Lopez A G, *et al*. The multifocal electroretinogram (mfERG) in the pig[J]. Acta Ophthalmol Scand, 2007, 85(4): 438-444.

[17] Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, *et al*. Global data on visual impairment in the year 2002[J]. Bull World Health Organ, 2004, 82(11): 844-851.

[18] Jeon C J, Strettoi E, Masland R H. The major cell populations of the mouse retina[J]. J Neurosci, 1998, 18(21): 8936-8946.

[19] Bull N D, Martin K R. Concise review: toward stem cell-based therapies for retinal neurodegenerative diseases[J]. Stem Cells, 2011, 29(8): 1170-1175.

[20] Dureau P, Jeanny J C, Clerc B, *et al*. Long term light-induced retinal degeneration in the miniature pig[J]. Mol Vis, 1996, 2: 7.

[21] Marmor M F, Fulton A B, Holder G E, *et al*. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update)[J]. Doc Ophthalmol, 2009, 118(1): 69-77.

[22] Voss-Kyhn M C. Multifocal electroretinography (mfERG) in porcine eyes: establishment, sensitivity and functional implications of induced retinal lesions[J]. Acta Ophthalmol Scand, 2007, 85(3): 1-24.

(**收稿**:2013-06-28;**修回**:2013-07-24)

(编辑 张 维)