DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.017

论著

文章编号:1000-5404(2000)05-0442-03

大鼠视网膜光化学损伤的病理特征

谢伯林[1],王正国[1],朱佩芳[1],严 密[2],张军军[2] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042;[2]华西医科大学第一临床医学院眼科,成都 610041)

提 要:目的 观察绿色荧光灯持续照射后大鼠视网膜损伤的病理形态变化特征。方法 采用(1 900±106.9)lux绿色荧光灯对SD大鼠进行持续24 h照射。分别于光照前,光照后6 h、6 d及14 d进行视网膜光镜和电镜形态学观察、外核层厚度检测。结果 光照前视网膜形态正常,结构层次清楚,内外节排列整齐规则。光照后6 h视网膜外核层变薄,其厚度减少23.91%,内外节排列紊乱;光感受器细胞核肿胀,内节线粒体肿胀,外节水肿,RPE顶端微绒毛消失,溶酶体增多。光照后6 d外核层更薄,其厚度减少46.6%,损伤加重。14 d外核层较6 d增厚,其厚度减少42.4%。光感受器细胞及内节已基本正常,外节再生但盘膜排列稀疏,RPE顶端出现微绒毛。结论 本实验条件下,大鼠视网膜光化学损伤的病理特征是退行性变性过程。

关键词:视网膜;光损伤;大鼠;病理

中图法分类号:R779.1 文献标识码:A

Pathological changes of light-induced retinal damages in rats

XIE Bo-lin, WANG Zheng-guo, ZHU Pei-feng, Yan Mi, ZHANG Jun-jun (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the pathological changes of the retina after 24-hour exposure to green fluorescent light. Methods SD rats were exposed to green fluorescent light of (1 900±106.9) lux for 24 hours. The pathological changes of the retina were examined with light and electron microscope before and 6 hours, 6 and 14 days after exposure. Meanwhile, the thickness of the outer nucleus layer (ONL) was measured with the MIAS-1000 system. Results The retina was morphologically normal with distinct structural layers and regular arrangement of outer and segments was disordered. The nucleus of the cells of the photoreceptors and the mitochondria of the inner segment were swollen and the outer segment edematous. The apical microvilli of RPE disappeared with an increase of lysosomes in RPE. On the 6th day after exposure, the ONL was even much thinner with a 46.6% decrease of the thickness. On the 14th day after exposure, the ONL became a little thicker with a 42.4% decrease of its thickness. The inner segment restored its regular order while the outer segment was vacuolized. The nucleus of the cells of photoreceptors and the inner segment were nearly normal. The outer segment regenerated but the disk arrangement remained loose. The apical microvilli reappeared in RPE. Conclusion The pathological changes of photochemical damages of the retina is a degenerative process as confirmed in our study in the rat.

Key words: retina; photochemical damage; rat; pathology

老年性黄斑变性可能与长期接受强阳光辐射有关,某些强光源的眼科检查仪器及手术显微镜可能导致医源性视网膜光损伤,因而不恰当的自然和人造光源可能引起视网膜损伤[1]。为了评估人类日常生活中经常接触的可见光光谱中段的光线对视网膜损伤的情况,本研究采用绿色荧光灯光照射大鼠,并尽可能模拟

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39170768)

作者简介:谢伯林(1963—),男,江西省人,博士,副主任医师,副教授,主要从事眼底病及眼外伤方面的研究,发表论文10篇,现在成都军区昆明总医院,昆明 650032。电话:(0871)4074648

收稿日期:1999-02-23;修回日期:1999-12-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

正常生活状态的条件下造成光化学损伤, 从形态学、形态计量学方面, 观察本实验条件下大鼠光照射后视网膜的损伤程度及其损伤的病理变化过程, 探讨视网膜光化学损伤的病理特征。

1　材料与方法

1.1　实验动物与分组

选用 Sprague-Dawley(SD)大鼠40只, 雄性, 体重 150~180 g。实验动物及实验使用条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。随机将动物分配于正常对照组和光照后 6 h、6 d 及 14 d 损伤组, 每组 10 只。

1.2　光损伤条件

采用自制光损伤装置。在光照架的 6 个面分别放置 1 根 40 W 的绿色荧光灯管(波长 510~560 nm)。光照箱中心各方向实测平均照度为(1 900±106.9) lux, 相当于大鼠正常活动时眼球水平的各箱壁的照度为 2 000 lux(ST-Ⅲ型光度计, 北京师范大学光电仪器厂产)。动物房的室温控制在 21~24 ℃之间, 光照箱内平均温度 22~25 ℃。所有实验用大鼠均在 12 h 明(30~50 lux)及 12 h 暗循环光环境适应 10 d, 光照前暗适应 24 h, 然后逐只进入光照箱, 接受 24 h 持续光照射。大鼠未经散瞳及麻醉, 可在光照箱内自由活动, 光照后送回暗环境中饲养, 分别在光照前后不同时间点, 处死动物取材作光镜和电镜检查。

1.3　视网膜形态光镜观察及外核层厚度检测

动物处死后摘除眼球, 立即放入中性福尔马林溶液中固定 48 h, 经逐级酒精脱水, 常规石蜡包埋, 经视乳头颞侧旁开 1 mm 纵向做 5 μm 厚的切片, 在显微镜下观察摄片, 采用 MIAS-1000 图像分析系统测量外核层(Outer nucleus layer, ONL)厚度, 以此作为光感受器细胞丧失的评判指标[3]。对光照后各时间点的测定值与光照前的测定值进行比较, 作单因素方差分析。

1.4　视网膜组织电镜观察

大鼠处死后立即摘除眼球, 用 3% 戊二醛磷酸缓冲液固定 1 周。去除眼前节, 选择距视乳头颞侧旁开 1 mm 区域的眼球壁组织块, 再固定、脱水、包埋、超薄切片、染色, 透射电镜观察摄片。

2　结果

2.1　视网膜光镜观察

正常对照组的视网膜形态正常, 结构层次清楚, 内外节排列整齐规则, 内外节分界清晰。光照后 6 h 损伤组的视网膜外核层变薄, 出现核固缩及一些不规则细胞核。内外节排列紊乱, 分界不清, 见图 1。光照后 6 d 损伤组的视网膜外核层更薄, 出现淡染及碎裂细胞核, 内节无淡染区, 呈整齐丝状排列但仍较疏松, 而外节区变窄, 且出现大空泡, 见图 2。光照后 14 d 损伤组的视网膜外核层较光照后 6 d 厚, 内外节分界仍不清, 内节更致密。整个病理过程, 未显示有炎性细胞反应。

2.2　视网膜外核层(ONL)厚度变化

正常对照组的视网膜 ONL 厚度为(41.83±0.93) μm, 光照后 6 h 损伤组的视网膜 ONL 厚度减少 23.91%[(31.83±11.2) μm, $P<0.001$], 光照后 6 d 损伤组的视网膜 ONL 厚度进一步减少为 46.6%[(22.33±1.01) μm], 光照后 14 d 损伤组的视网膜 ONL 厚度有所回升, 比光照前减少 42.4%[(24.06±1.52) μm]。

2.3　视网膜超微结构观察

正常对照组的光感受器细胞核小, 着色极深。内节线粒体丰富, 呈卵圆形或长梭形。外节盘膜密集呈层板状排列, 与 RPE 顶端微绒毛相嵌排列。光照后 6 h 损伤组可见部分光感受器细胞核肿胀, 着色变浅, 染色质部分或大部溶解, 核膜不完整, 也见核固缩。部分内节胞质肿胀, 质膜断裂, 并可见粗面内质网扩张, 线粒体肿胀呈球状, 排列散乱。外节明显肿胀、呈不规则扩张, 盘膜列紊乱, RPE 微绒毛消失, 溶酶体增加。光照后 6 d 损伤组的光感受器细胞核较大, 除浓集于中心的染色质外, 核浆内散在粗大的染色质。内节线粒体肿胀呈小圆形, 排列紊乱, 见图 3A。外节肿胀更明显, 部分盘膜断裂, 形成含残存断裂盘膜的空泡。RPE 内溶酶体仍多, 有髓样小体形成, RPE 微绒毛开始出现, 见图 3B。光照后 14 d 损伤组的光感受器细胞核无明显改变。内节线粒体已呈卵圆或长梭形, 未见肿胀改变。外节破坏结构大部消失, 盘膜排列疏松, RPE 内仍有较多溶酶体, RPE 顶端已有微绒毛与外节相嵌排列。

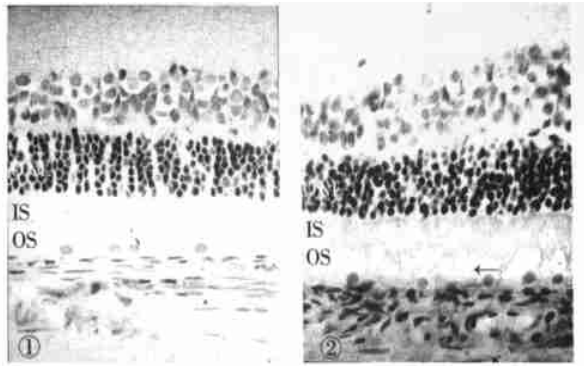


图 1　光照后 6 h 视网膜外核层变化

外核层(ONL)变薄, 细胞排列较正常稀疏, 出现较多淡染不规则或碎裂的细胞核(箭头)　(HE×400)

Fig 1　Changes of ONL 6 hours after light exposure

Outer nucleus layer (ONL) became thinner. Arrangement of cells sparse and the nucleolus weakly stained, irregular or disintegrated (arrow)　(HE×400)

图 2　光照后 6 d 视网膜外核层变化

视网膜外核层(ONL)更薄, 而外节(OS)变窄, 且出现大空泡(箭头)　(HE×400)

Fig 2　Changes of ONL 6 d after light exposure

ONL more thinner than that at 6 h. The outer segment (OS) became narrow and with big vacuole (arrow)　(HE×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

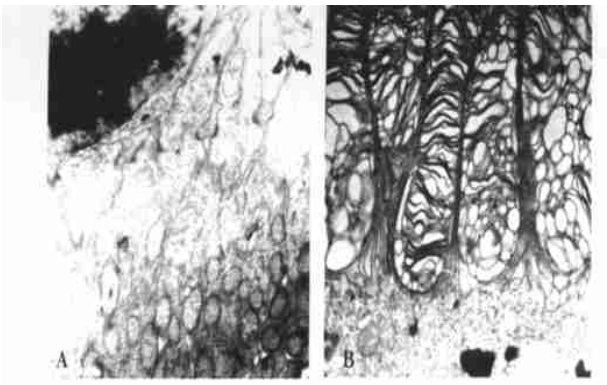


图 3 光照后 6 d 光感受器变化

A: 细胞核较大, 核浆内散在粗大的染色质。内节线粒体肿胀呈小圆形, 排列紊乱 (TEM× 5 000); B: 外节盘膜肿胀断裂及空泡形成, RPE 内溶酶体明显增多 (TEM× 5 000)

Fig 3 Changes of photoreceptor 6 days after light exposure

A: Nuclei of photoreceptor rather big, large chromatin scattered in nucleoplasm. Mitochondria of inner segment swollen, round shape and irregular arranged (TEM× 5 000); B: Disk at the outer segment breaken and vacuolized, lysosomes increased in retinal pigment epithelium (TEM× 5 000)

3 讨论

光对视网膜的损伤有 3 种方式[3]: ①热损伤: 波长较长部分的可见光及红外光(550~1400 nm)可引起视网膜局部温度升高, 使细胞内包括生命酶系统在内的蛋白质变性损伤。②机械损伤: 短脉冲光如 Q 开关或 YAG 激光的高能冲击波, 可造成局部原浆的瞬变而机械地干扰组织细胞的正常结构和功能。③光化学损伤: 近紫外光及波长较短的可见光(400~550 nm)的照射不引起明显的温度升高, 而是引起连锁的有害化学反应, 导致细胞结构破坏。光化学损伤在视网膜光损伤中最具有重要性和普遍性。

本实验采用波长为 510~560 nm 的绿光作为致伤光源, 是因为绿光位于人类日常生活中经常接触的可见光光谱的中段, 其研究结果接近于可见光对视网膜的损伤。实验前, 动物在 12 h 明及 12 h 暗循环光环境适应 10 d, 在持续 24 h 光照期间动物能自由活动, 不麻醉、不散瞳等, 其目的在于模拟正常生活状态, 减少人为因素对实验结果的影响。

实验中观察到, 大鼠视网膜外核层于光照后 6 h 已显著变薄, 形态计量学研究证实其厚度较光照前减少 23.91%, 统计学处理差异非常显著 ($P < 0.01$)。这些结果说明, 从光照开始到光照后 6 h 的 30 h 期间, 已有外核层细胞丧失。细胞形态观察发现, 该期外核层细胞出现核固缩及一些不规则细胞核, 证实外核层细胞减少是由于部分细胞变性坏死所致。光照后 6 d 见外核层进一步变薄, 形态计量学也发现其厚度减少 46.6%, 此期出现淡染及碎裂细胞核, 说明该层的变薄是由于变性坏死细胞进一步吸收所致。光照后 14 d, 形态学及形态计量学观察均证实外核层较光照后 6 d 增厚, 且细胞密度明显增加, 显示外核层细胞有再生修复能力, 此时已进入再生修复期, 但尚示完成恢复正常。

本研究还发现, 光照前光感受器内外节分界清楚, 排列整齐。光照后 6 h, 内外节失去正常整齐排列的结构, 两者分界不清, 出现不规则淡染区, 可能是由于内节和外节水肿所致。光照后 6 d, 内节淡染区消失, 排列较整齐, 但仍较疏松。外节区呈现巨大空泡, 可能是由于内节受损坏死部分吸收, 而外节尚未吸收, 且进一步水肿所致。光照后 14 d, 内节结构更致密, 外节部分被吸收后再生尚不完全。

有报道, 视网膜光损伤的主要损伤部位通常是在光感受器[4], 但也有人研究认为主要损伤在视网膜色素上皮细胞、Müller 细胞及视网膜全层的线粒体[5]。但主要损伤部位与致伤光源的波长、能量及不同的照射计划等关系密切[6]。本实验观察发现光照后光感受器细胞核固缩, 核肿胀, 染色质溶解等改变, 内节胞质水肿, 线粒体肿胀和内质网扩张, 外节盘膜水肿等出现; 从而证实在本实验条件下, 视网膜光损伤的主要损伤部位是在光感受器。值得注意的是在整个病理过程中, 未显示有炎性细胞反应, 提示本实验条件下, 大鼠视网膜光化学损伤的病理过程是一个退行性变性过程。

参考文献:

[1] Cruickshanks K J, Klein R, Klein B E. Sunlight and age related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study[J]. Arch Ophthalmol, 1993, 111(4): 514—518.

[2] Michon J J, Li Z I, Shioura N, *et al*. A comparative study of methods of photoreceptor morphomeyty[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32(2): 280—284.

[3] Noell W K. Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes[J]. Vision Res, 1980, 20(12): 1 163—1 171.

[4] Szczesny P J, Walther P, Muller M. Light damage in rod outer segments: The effects of fixation on ultrastructural alterations[J]. Curr Eye Res, 1996, 15(8): 807—814.

[5] Van Best J A, Putting B J, Oosterhuis J A, *et al*. Function and morphology of the retinal pigment epithelium after light-induced damage[J]. Microsc Res Tech, 1997, 36(2): 77—88.

[6] Tso MOM. Experinment on visual cells by nature and man: In search of treatment for photoreceptor degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, 30(2): 2 430—2 454.

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net