

文章编号:1004-7220(2010)03-0195-05

## 高眼压对青光眼视网膜功能的影响

郭学谦<sup>1</sup>, 田蓓<sup>2</sup>, 孙世杰<sup>1</sup>, 谢楠<sup>3</sup>, 刘志成<sup>1</sup>

(1. 首都医科大学 生物医学工程学院,北京 100069; 2. 首都医科大学附属 北京同仁医院,北京 100041;

3. 国家知识产权局专利审查协作中心 北京 100083)

**摘要:** 目的 研究青光眼持续高眼压对大鼠动物模型视网膜功能的影响。方法 制备青光眼高眼压大鼠动物模型并定时监测眼压;于术前和术后3 w、6 w进行闪光视网膜电图测量和形态学观察。结果 动物模型术后1 d眼压升高到最大值( $3.07 \pm 1.10$ ) kPa,术后1 w至6 w各时段眼压值分别为:( $2.84 \pm 0.90$ ) kPa, ( $2.86 \pm 0.54$ ) kPa, ( $2.76 \pm 0.52$ ) kPa, ( $2.70 \pm 0.51$ ) kPa, ( $2.39 \pm 0.27$ ) kPa, ( $2.09 \pm 0.39$ ) kPa,均明显高于对侧眼眼压;造模3 w、6 w时的视网膜电图a波、b波及振荡电位波的幅值等时域参数均显著降低,且随高眼压的持续呈现进行性下降;常规HE染色,没有发现视网膜有明显的组织学和形态学改变。结论 慢性高眼压在造成视网膜组织学和形态学发生改变之前视网膜的光学功能已经受损,且损伤随高眼压的持续呈现进行性趋势。

**关键词:** 眼压; 青光眼; 闪光视网膜电图; 振幅; 组织学; 形态学

中图分类号: R318 文献标志码: A

## Effect of ocular hypertension on the function of retina of glaucoma

GUO Xue-qian<sup>1</sup>, TIAN bei<sup>2</sup>, SUN Shi-jie<sup>1</sup>, XIE Nan<sup>3</sup>, LIU Zhi-cheng<sup>1</sup> (1. School of Biomedical Engineering, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100041, China; 3. Patent Examination Cooperation Center Of SIPO, Beijing 100083, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of elevated intraocular pressure (IOP) on retina's function of rat. **Method** Chronic glaucoma rat models were built and IOP were measured persistently. Flash electroretinogram (F-ERG) and histological status were measured before and after surgery. **Results** The maximal IOP in rats without anesthesia is ( $3.07 \pm 1.10$ ) kPa in 1 day after surgery. From 1 w to 6 w after surgery, the model-eye-IOPs are ( $2.84 \pm 0.90$ ) kPa, ( $2.86 \pm 0.54$ ) kPa, ( $2.76 \pm 0.52$ ) kPa, ( $2.70 \pm 0.51$ ) kPa, ( $2.39 \pm 0.27$ ) kPa and ( $2.09 \pm 0.39$ ) kPa, respectively, which are significant higher than that of the fellow eye. A series of main parameters including the amplitudes of a-wave, b-wave and oscillatory potentials (OPs) all dramatically decreased in model eyes at 6 weeks and 3 weeks postoperatively. No obvious changes were observed by routine HE staining among the eyes before and after surgery. **Conclusions** The chronic high intraocular pressure could induce the retinal dysfunction before any morphological change occurred, and what's more, the damage showed itself a progressive one.

**Key words:** Intraocular pressure; Glaucoma; Flash electroretinogram; Amplitude; Histology; Morphology

青光眼是全球第二大致盲眼病,是第一大致盲眼病,是以视网膜节细胞凋亡、视神经乳

头损伤和进行性视野缺损为共同特征的视神经退行性损伤疾病<sup>[1]</sup>。目前青光眼的发病机制尚不清楚,

收稿日期:2010-04-13; 修回日期:2010-04-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30600150, 10802053, 30670514);北京市教育委员会科技发展计划项目(KZ200710011010, KM200910025007);北京市属市管高等学校人才强教计划资助项目。

作者简介:郭学谦(1972-),女,副教授;研究方向:生物力学。

通讯作者:刘志成,(010)83911559;E-mail: zliu@cmmu.edu.cn。

但成病后高眼压的持续作用是青光眼致盲的主要危险因素<sup>[2]</sup>。研究持续高眼压对视网膜光学功能的影响是青光眼诊治方法和视神经保护等研究的重要基础。

视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 是一种非侵入性的视网膜细胞功能在体记录手段, 能够得到视网膜各神经元对光刺激的综合电反应<sup>[3]</sup>, 其中, 闪光视网膜电图 (flash electroretinogram, F-ERG) 是一种常规的 ERG 测量技术, 许多学者通过测量暗适应条件下全视野 ERG 以评价高眼压大鼠模型的视网膜损伤程度, F-ERG 的主要成分有 a 波、b 波和重叠在 b 波上的振荡电位波等, 是评价视网膜功能的重要指标之一。一般认为, F-ERG 的 a 波起源于感光细胞的内段, 其振幅的变化主要反映视网膜感光细胞层的功能变化; b 波起源于视网膜的内核层, 其振幅的变化主要反映视网膜内核层的功能变化<sup>[4]</sup>; 振荡电位 (oscillatory potentials, OPs) 一般被认为起源于内层视网膜, 可能起源于无长突细胞或视网膜抑制性反馈回路中, 其对视网膜血流循环功能变化比较敏感<sup>[5]</sup>; 明适应视锥反应与视网膜视锥细胞的功能密切相关; 闪烁光反应则与双极细胞有关<sup>[6]</sup>。因此, F-ERG 能够比较客观地评价高眼压大鼠模型中视网膜功能的改变情况。

本研究首先通过前房注入硅氧烷类油状液体的实验方法获得慢性高眼压大鼠模型, 并对模型大鼠进行眼压连续监测以确定模型建立效果; 分别于不同时间点对正常大鼠和模型大鼠进行闪光视网膜电图测量和组织形态学检测, 了解高眼压对视网膜形态学和功能学损伤的进程。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的建立

选取体重 220 ~ 250 g、健康雄性、SD 大鼠, 予以 12 h 明暗交替光照, 不限食水, 在室温 18 ~ 25 °C 条件下适应性饲养 1 周。随机选取 30 只大鼠经 10% 水合氯醛 (按 35 mL/g) 进行腹腔注射进行全身麻醉, 盐酸丙美卡因滴眼液行表面麻醉, 手术显微镜下使用微注射器进行左眼前房注入硅氧烷类油状液体 (约 0.1 mL)。右眼不作处理。

### 1.2 大鼠眼压的测量

分别于术前 1 d、术后 1 d、1 w、2 w、3 w、4 w、5 w

和 6 w 对大鼠进行清醒状态下眼压测量。所有眼压值均在同一时段测量。盐酸丙美卡因滴眼液行角膜表面麻醉后, 由专人使用 Tonopen AVIA 眼压笔轻触大鼠角膜中心。每只眼均测量 3 次后, 取平均值作为该眼眼压值。

### 1.3 视网膜电图测量

分别于术前 1 d、术后 3 w、6 w 用 Ronland RETI-port32 视觉电生理仪对大鼠进行闪光视网膜电图 (F-ERG) 测量。所有闪光视网膜电图记录对象均为大鼠左眼, 其中术前 1 d 的测量值作为基线值。记录电极采用环状金丝电极 (3 mm), 参考电极与接地电极均为不锈钢针状电极。

实验前将大鼠完全暗适应 2 h, 记录电极置于大鼠左眼角巩膜缘, 参考电极与接地电极分别置于经过备皮的两眼连线中点及记录眼同侧耳后皮下, 各电极间阻抗始终保持小于 3 kΩ。采用 Ganzfeld Q450 全视野刺激器, 根据国际临床视觉电生理学会标准化方案 (ISCEV)<sup>[7]</sup> 顺序记录视杆反应 (Rod-ERG)、最大混合反应 (Max-ERG)、振荡电位 (oscillatory potentials, OPs), 明适应 10 min 后记录视锥反应 (Cone-ERG) 及 30 Hz 闪烁光反应 (30 Hz Flick-ERG)。

### 1.4 组织形态学观察

大鼠于造模前和造模 3 w、6 w 后分别随机选取 6 只进行形态学观察, 比较模型眼造模前后的变化趋势。大鼠经过量麻醉处死后, 沿大鼠眼球结膜剪开摘除保留视神经 2 mm 的眼球, 10% 甲醛溶液固定 24 h 后, 沿角膜缘剪除角膜, 去除晶状体, 再次进行组织固定后, 进行石蜡包埋, 石蜡切片机进行 4 μm 组织切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色。在光学显微镜下观察视网膜各层组织形态。

### 1.5 统计学分析

各参数均以均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm sd$ ) 表示, SPSS 11.5 软件进行统计分析。采用配对 *t* 检验和单因素方差分析进行显著性检验, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义,  $P < 0.01$  表示差异非常显著。

## 2 实验结果

### 2.1 眼压监测结果

通过 30 只大鼠术前双眼眼压测量, 得到 (14 点 ~ 16 点) 大鼠正常眼压值为  $(1.69 \pm 0.09)$  kPa ( $n = 60$ )。

分别于术前 1 d、术后 1 d、3 d、1 w 及以后每周对大鼠双眼眼压进行监测, 观察模型眼和对侧未处理眼眼压变化趋势(表 1)。术前 1 d, 左、右眼眼压分别(1.69 ± 0.12) kPa、(1.70 ± 0.13) kPa, 两眼之间无明显差异( $P > 0.05$ )。术后 1 d, 大鼠模型眼眼压即显著升高( $P < 0.01$ )且达到观察全程的最大值, 为对侧眼眼压的 1.72 倍( $P < 0.01$ )。术后 1 w 眼压开始趋于稳定, 且术后 1 w 至 4 w 为眼压一段平稳期, 模型眼与对侧眼眼压相比升高约 1.4 ~ 1.5 倍。术后各时间点, 模型眼眼压均明显高于对侧眼眼压( $P < 0.01$ )。至术后 6 w 时, 模型眼眼压维持在(2.09 ± 0.39) kPa, 约为术前该眼眼压的 1.15 倍( $P < 0.01$ )。

## 2.2 视网膜电图测量结果

由 Roland RETIpot32 系统直接测量得到大鼠的 F-ERG 时域参数。所有被测大鼠均能引出典型的

表 1 大鼠眼压监测 ( $\bar{x} \pm sd$ )

Tab.1 Intraocular pressure (IOP) in control and operated rat eyes ( $\bar{x} \pm sd$ )

时间点	眼压/kPa		
	对侧眼(右)	模型眼(左)	眼压升高倍数
-1 d	1.70 ± 0.13	1.69 ± 0.12	—
1 d	1.79 ± 0.17	3.07 ± 1.10	1.72 *
1 w	1.91 ± 0.23	2.84 ± 0.90	1.49 *
2 w	1.90 ± 0.32	2.86 ± 0.54	1.51 *
3 w	2.03 ± 0.29	2.76 ± 0.52	1.36 *
4 w	1.90 ± 0.29	2.70 ± 0.51	1.42 *
5 w	1.93 ± 0.27	2.39 ± 0.27	1.24 *
6 w	1.82 ± 0.21	2.09 ± 0.39	1.15 *

注: 用配对  $t$ -检验进行统计学分析, \*  $P < 0.01$  模型眼眼压与对侧眼眼压

ERG 波形, 5 种波形潜时及幅值详见表 2。

表 2 大鼠术前及术后闪光视网膜电图参数的变化 ( $\bar{x} \pm sd$ )

Tab.2 Changes of parameters of flash electroretinogram (F-ERG) before and after surgery ( $\bar{x} \pm sd$ )

参数	( $n = 20$ ) 术前 1 d	术后 3 w	( $n = 20$ ) 术后 6 w
Rod-ERG			
b 波潜时/ms	59.3 ± 6.1 (10.3)	59.9 ± 6.6 (11.0)	60.6 ± 6.9 (11.4)
b 波幅值/ $\mu$ V	103.1 ± 25.5 (24.7)	51.5 ± 12.5 (24.3) **	27.7 ± 11.5 (41.5) ** $\Delta$
Max-ERG			
a 波潜时/ms	20.3 ± 2.3 (11.3)	21.7 ± 2.5 (11.5)	21.1 ± 2.3 (10.9)
a 波幅值/ $\mu$ V	102.1 ± 20.7 (20.3)	55.8 ± 10.7 (19.2) **	27.3 ± 5.9 (21.6) ** $\Delta$
b 波潜时/ms	47.7 ± 3.9 (8.2)	48.1 ± 4.0 (8.3)	56.7 ± 5.2 (9.2) ** $\Delta$
b 波幅值/ $\mu$ V	206.2 ± 38.2 (18.5)	108.9 ± 19.7 (18.1) **	50.2 ± 9.8 (19.5) ** $\Delta$
OPs			
OP2 潜时/ms	31.5 ± 2.3 (7.3)	31.6 ± 2.2 (7.0)	32.4 ± 1.5 (4.6)
OP2 波幅值/ $\mu$ V	51.3 ± 16.2 (31.6)	26.1 ± 10.0 (38.3) **	11.8 ± 6.7 (56.8) ** $\Delta$
总幅值/ $\mu$ V	124.6 ± 46.8 (37.6)	63.1 ± 17.6 (27.9) **	24.6 ± 11.0 (44.7) ** $\Delta$
Cone-ERG			
a 波潜时/ms	19.1 ± 3.3 (17.3)	19.0 ± 3.4 (17.9)	20.9 ± 4.6 (22.0)
a 波幅值/ $\mu$ V	35.1 ± 7.4 (21.1)	17.7 ± 4.8 (27.1) **	12.5 ± 4.7 (37.6) ** $\Delta$
b 波潜时/ms	46.3 ± 7.4 (16.0)	47.5 ± 5.2 (10.9)	47.2 ± 3.4 (7.2)
b 波幅值/ $\mu$ V	60.0 ± 12.7 (21.2)	39.4 ± 17.5 (44.4) **	38.5 ± 13.4 (34.8) **
30 Hz Flick-ERG			
平均幅值/ $\mu$ V	2.27 ± 0.7 (30.8)	1.96 ± 0.8 (40.8)	1.5 ± 0.4 (26.7) **

注:  $\bar{x} \pm s$  (cov), 变异系数(cov) = 标准差( $s$ )/均值( $x$ ) \* 100%; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. 术前 1 d;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta P < 0.01$ , vs. 术后 3 w

5种波形所测得参数分析如下:

(1) 暗适应视杆反应 Rod-ERG: b波潜时术前1 d(正常组)和术后3 w、6 w没有明显改变( $P > 0.05$ ), b波幅值呈明显下降( $P < 0.01$ )。说明视杆细胞功能随眼压呈进行性下降。

(2) 暗适应最大混合反应 Max-ERG: a波主要反映视网膜感光细胞层的功能变化, b波主要反映视网膜内核层(双极、müller细胞的整合情况)的功能变化。a波潜时没有明显变化, 幅值随眼压持续进行性降低( $P < 0.01$ ); b波潜时在6 w时明显高于正常组( $P < 0.01$ ), 幅值随眼压持续进行性降低( $P < 0.01$ )。反映了慢性高血压作用下, 视网膜光感受器层即在第一级神经元水平上功能受损。

(3) 振荡电位 OPs: OPs是由一组有节律的小波所组成, 它们重叠在b波的上升支上, 反映内核层至内丛状层功能。OP2潜时没有明显变化; OP2、OPs的幅值与正常组相比均明显降低( $P < 0.01$ ), 并随眼压持续进行性降低。

(4) 明适应视锥反应 Cone-ERG: Cone-ERG的a、b波的幅值与正常组相比明显降低( $P < 0.01$ ), 其潜时没有明显变化。

(5) 30 Hz 闪烁光反应(Flick-ERG): 反映双极细胞功能。平均幅值在6 w时明显低于正常组( $P < 0.01$ )。

### 2.3 组织形态学观察结果

光学显微镜下可见, 各组视网膜 HE 染色可见主要特征: RGCs 为圆形或椭圆形, 核色浅; 内丛状层疏松; 内核层为3~5层细胞组成; 外核层为8~10层圆形细胞, 排列疏松。大鼠视网膜各层组织结构如图1所示, 6 w造模眼(c)与3 w造模眼(b)及正常眼(a)之间, 在视网膜各层厚度、细胞形态、组成和排列等方面的定性比较未见明显差异。

## 3 讨论

本研究通过前房注入黏性物质成功地建立了慢性高血压大鼠模型。通过对大鼠术后眼压的监测, 至6 w时仍可维持较高眼压水平, 且眼压变化趋势平稳, 有利于开展高血压对视网膜功能进行性损伤的实验研究。

本研究中, 慢性高血压模型大鼠 F-ERG 中各波的幅值随高血压持续时间而进行性降低, 尤其是暗

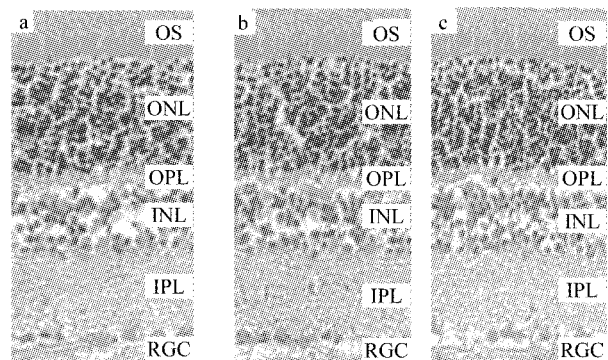


图1 大鼠造模前术后组织形态学观察( $\times 100$ ) (a)正常眼(b)3w造模眼(c)6w造模眼(OS: 外界膜; ONL: 外核层; OPL: 外丛状层; INL: 内核层; IPL: 内丛状层; RGC 节细胞层)

Fig.1 Histological status of rats before and after surgery by routine HE staining( $\times 100$ )

适应 a 波、b 波幅值均值与正常组相比下降了至少45%, 而6 w时幅值最少下降了70%左右, 而明适应 a 波、b 波和 flick 波幅值在术后也有一定程度的下降; 潜时方面, 仅有最大混合反应中 b 波潜时在6 w时较正常组及3 w时显著延长( $P < 0.01$ ), 其他波形成份的潜时在各时间点均没有变化, 由此可推断暗适应反应, 也就是说杆细胞对高血压更为敏感, 这也与大鼠感光细胞中杆细胞(97%~99%)占绝大多数有关。

术后3 w及6 w, 组织学观察结果表明: 视网膜各层组织厚度、细胞形态等均未发生明显改变。以上结果与崔馨等<sup>[8]</sup>在激光诱导的慢性高眼大鼠模型中观察到的现象相近。同时, 也有学者<sup>[9-10]</sup>认为组织形态学的变化是高血压水平与持续时间的累积作用, 只有当两者的共同作用达到一定程度后, 才会出现视网膜组织学方面的改变。而在本模型中, 眼压是中度升高, 持续时间6 w, 可能没有达到视网膜出现组织形态学改变的程度。当然, HE作为一种常规染色方法, 在检测组织学变化上不足够敏感, 不能排除视网膜神经元或许已出现的形态学改变及少量凋亡。

本研究中, 根据 F-ERG 和组织形态学观察发现, 视网膜内层和外层在形态学出现明显改变之前, 已出现功能学方面的改变。本研究中的压力水平和持续时间与 Chauhan 等<sup>[11]</sup>经注射高渗盐水诱导的高眼压模式相似, 笔者不仅观察了视网膜内层的形态学变化, 还发现了内层也出现了功能学改变;

Grozdanic 等<sup>[9]</sup>及 Bayer 等<sup>[12]</sup>虽然都得到了高眼压作用下视网膜内、外层均会受到影响,但前者认为外层先出现改变而后者认为内层对损伤更敏感,而我们的研究结果却暂时可以认为两者几乎同时受损且程度相近。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Solon Thanos, Rita Naskar. Correlation between retinal ganglion cell death and chronically developing inherited glaucoma in a new rat mutant[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79(7):119-129.
- [ 2 ] Iok-Hou Pang, Abbot FC. Rodent Models for Glaucoma Retinopathy and Optic Neuropathy[J]. *J Glaucoma*, 2007, 16(5):483-505.
- [ 3 ] Brad F, Bang VB, Tohn CM, *et al.* Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(6):1854-1862.
- [ 4 ] Yoko I, Jacky MKK, Joseph C, *et al.* Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2003, 44(5):1982-1992.
- [ 5 ] 刘东敬,陈晓明,盘如刚,等. 大鼠慢性高眼压模型的建立及玻璃体游离谷氨酸变化的实验研究[J]. *眼科研究*, 2008, 26(5):344-347.
- [ 6 ] Gil BS, Sharon B, George NL, *et al.* Pattern electroretinography in a rat model of ocular hypertension: functional evidence for early detection of inner retinal damage[J]. *Experimental Eye Research*, 2005, 81(9):340-349.
- [ 7 ] 视觉电生理国际标准化委员会. 视网膜电图国际标准, 1989.
- [ 8 ] Thom WM, John D, GERALYN P, *et al.* Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(10):3451-3459.
- [ 9 ] Sinisa DG, Young HK, Donald SS, *et al.* Functional evaluation of retina and optic nerve in the rat model of chronic ocular hypertension[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79(7):75-83.
- [ 10 ] Lijun J, William OC, Elaine CJ, *et al.* Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(11):3415-3419.
- [ 11 ] Balwantray CC, Jinyi P, Michele LA, *et al.* Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(9):2969-2976.
- [ 12 ] Bayer AU, Danias J, Brodie S, *et al.* Electroretinographic abnormalities in a rat glaucoma model with chronic elevated intraocular pressure[J]. *Exp Eye Res*, 2001, 72(6):667-677.