

鼠青光眼模型

范海燕 综述 倪卫杰 审校

Models of glaucoma in rodent animal

Fan Haiyan, Ni Weijie. Department of Ophthalmology, Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201900, China

Abstract Glaucoma is a heterogeneous group of optic neuropathies that shares a similar set of clinical features including optic nerve atrophy and progressive loss of visual field and further results in blindness. To establish suitable animal model is an useful approach to elucidate the etiology and pathology of glaucoma as well as developing novel and more effective therapies. Rodent model of glaucoma has recently become popular as research tool because it is easy to be reformed by transgenic technology and very similar to people's constitution. The modeling method of glaucoma in recent years was reviewed in two aspects: intraocular hypertension and normal intraocular tension.

Key words glaucoma; animal model; mouse; intraocular pressure

摘要 青光眼是一组以特征性视神经萎缩和视野缺损为共同特征的疾病,是主要的致盲性眼病之一,青光眼动物模型的建立为研究该病的发生发展和预后提供了良好的基础。鼠类较容易利用转基因技术改造和繁殖,并且鼠眼的结构在很多方面与人眼相似,近年来青光眼鼠模型得到了越来越多的应用。从高眼压模型和非高眼压模型两个方面对国内外研究者的建模方法做一综述。

关键词 青光眼; 动物模型; 鼠; 眼压

分类号 R 775 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0243-04

青光眼是一组威胁视神经视觉功能,主要与眼压升高有关的临床征群。最典型和最突出的表现是视神经萎缩和视野的缩小、缺损,如不及时采取有效的治疗,视野可以全部丧失,终至失明。近年来随着正常眼压青光眼发病率的升高,人们逐渐认识到除眼压外,还有其他因素参与青光眼的发生。动物模型对其发病机制的研究意义重大。因经济原因及与人类解剖结构的相似性,鼠模型逐渐得到更多的应用,其中一些不引起眼压升高的模型被用来研究某些特殊类型青光眼,而高眼压模型被用来观察与眼压升高相关的病理变化。

1 非高眼压视神经损伤模型

1.1 玻璃体腔内注射兴奋性氨基酸

玻璃体腔内注射兴奋性氨基酸谷氨酸或 NMDA (N-甲基-D-天冬氨酸),可以在不影响眼压的情况下引起视网膜细胞的死亡^[1],这种模型被用来研究兴奋性毒性机制在青光眼中的作用。

谷氨酸和 NMDA 均会引起视网膜神经节细胞 (retinal ganglial cell, RGCs) 死亡,大鼠玻璃体腔注射谷氨酸或 NMDA 20 ~ 200 nmol 后 1 h 就会出现细胞固缩^[2],注射后第 6 d 可见 RGCs 死亡^[3],而小鼠的眼球较小,剂量可减少到 2 ~ 10 nmol。相对于单次快速注射,多次低浓度玻璃体腔内注射兴奋性氨基酸也可以产生相似的视网膜损伤。Vorwerk 等^[4]的研究证明,每隔 5 d 注射 2.5 nmol 的兴奋性氨基酸持续 3 个月后,视网膜的兴奋性氨基酸水平逐渐提高,RGCs 会减少 42%。

Siliprandi 等^[5]发现 NMDA 会导致剂量依赖性胆碱乙酰基转移酶的缺乏,说明神经细胞的功能受到了影响。而 Thy-1 mRNA (一种 RGCs 的特异标志物) 在损伤视网膜的表达显著减少^[6],进一步提示注射 NMDA 除可以损伤 RGCs 外,也会导致视网膜内核层细胞的凋亡。

用玻璃体腔内注射兴奋性氨基酸的方法建立的青光眼模型,建模时间短、可重复性强,其缺点为建立在氨基酸毒性单一机制基础上,而此机制目前国际上尚

有争议。

1.2 视神经损害

视神经损伤特别是视神经离断是另一个引起 RGCs 死亡的常用模型,此模型可以模拟青光眼视神经损伤的病理学变化,但不会影响到视网膜动脉和静脉,因此不会影响视网膜的血供。

雷季良等^[7]将鼠麻醉后固定在手术台上,在显微镜或解剖镜下剪开结膜囊,剪断 1~2 条眼外肌,向后分离并暴露视神经,于眶内部眼球后 1~5 mm 处将其离断,从而建立视神经损伤动物模型,这种方法损伤了视神经的所有轴突,从而导致时间依赖性的 RGCs 死亡,在手术后 1 周约 50% 的 RGCs 死亡,而术后 2 周所有的 RGCs 会消失,失去视觉功能。大鼠视神经离断后 4 个月,视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 完全消失^[8-9]。此法属完全性视神经损伤,简单易行,可保证实验动物致伤量一致。

Yoles 等^[10]的研究表明,视神经损伤也可以用外力挤压视神经的方法获得,这种方法可以对视神经产生不同程度的损伤,较视神经离断更加接近青光眼的病程,常被用来研究 RGCs 的变性病理过程及筛选视神经保护的药物。但尚无统一的方法来标准化此过程,如何提高模型使用的重复性有待解决。

1.3 内皮素诱导视神经损伤

内皮素-1 是一种由血管上皮细胞产生的肽类物质,可引起血管收缩,曾有报道其与青光眼发病有关。研究证明,在血压正常的原发性开角型青光眼患者,尤其是进行性视野缺损的患者内皮素-1 的水平明显比正常人高,玻璃体内或视神经周围注射内皮素-1 会导致视网膜局部缺血^[11-13]。家兔和灵长类动物眶内注射内皮素-1 导致视网膜局部缺血的模型已建立,近来,Chauhan 等^[14]对模型进行修改并用于大鼠,内皮素-1 经由渗透泵注入球后,RGCs 会呈时间依赖性凋亡。内皮素-1 引起视神经损伤的机制尚未完全清楚。

2 压力增高模型

2.1 自发性高眼压

一些特殊种系的小鼠,年老时会自发性眼压升高并产生类似于青光眼的视网膜疾病。其中,以 DBA/2J 和 AKXD-28/Ty 的纯系小鼠最适于进行青光眼的研究。

DBA/2J 鼠在 7~8 个月时会发生自发性高眼压,John 等^[15]发现小鼠虹膜萎缩,色素播散,虹膜前粘连,眼压升高,形成了进行性继发性闭角型青光眼模型,类似于人的色素播散综合征和角膜虹膜内皮综合征。长

期高眼压可引起 DBA/2J 小鼠 RGCs 凋亡,同时会有视盘神经纤维层变薄以及视盘变大。同一小鼠的两只眼以及同龄的不同小鼠的眼压变化并不相同,随着房水生成系统的退化,DBA/2J 小鼠的眼压会在其 10~12 个月时有所下降。两种纯系小鼠模型的主要不同点在于 AKXD-28/Ty 小鼠无色素播散,只有虹膜基质的萎缩,并且其 RGCs 和视神经对高眼压更敏感^[16-17]。

2.2 光照法

一种较温和的引起眼压升高的方法是使动物 24 h 暴露于光照的环境中,影响了动物的昼夜节律从而刺激房水分泌^[18]。这种低的光照强度并不会引起视网膜光毒性,并且缓慢升高的眼压更接近青光眼患者的眼压变化。与临床上青光眼患者类似,但需要很长时间才能引起视网膜的变化^[19],因此,这种模型对于青光眼视网膜病变的研究并无重大意义。但可用来研究疾病相关因子,结合其他引起眼压升高的方法研究眼压升高与视网膜病变的关系。

2.3 巩膜上静脉注射高渗生理盐水

巩膜上静脉注射高渗生理盐水可引起大鼠房水流出系统的硬化,从而使房水流出阻力增大导致眼压升高^[20]。用一特制的 C 型塑料环暴露大鼠 1 条巩膜上静脉,同时压迫大多数巩膜上静脉,将 50 μ L 高渗盐水注入暴露静脉,由于大多数巩膜上静脉被压迫,注入的高渗盐水多流入巩膜静脉窦以及前房,炎症以及瘢痕的形成使这些组织硬化,7~10 d 后 50% 大鼠会发生高眼压,程度与大鼠个体对于高渗盐水反应的差异有关,对于部分大鼠二次注射是必需的。这种方法引起的高眼压是可以保持的,有报道可以延长至 200 d^[21]。但是手术需要特制的微注射器装备,对术者操作技术要求较高。

2.4 激光光凝房水流出通道

激光光凝小梁网配合荧光染料前房注射引起的慢性眼压升高最初用于大鼠,这种方法可引起 RGCs 死亡、神经纤维层变薄以及视神经萎缩^[22]。WoldeMussie 等^[23]用激光光凝大鼠角膜缘静脉及距角膜缘 0.5~0.8 mm 的巩膜上静脉,眼压升高 2 倍,并维持 2 个月。Levkovitch-Verbin 等^[24]研究证明激光照射小梁网或巩膜上静脉均可引起大鼠眼压升高、RGCs 死亡以及视神经病变,而且这种损伤并不局限在 RGCs 层,视网膜的各层厚度均减少。激光光凝法产生的眼部损伤与临床患者相似,但由于鼠眼体积较小,对操作者技术要求高,需要专门的激光设备,不适合实验室的普遍推广。

2.5 视网膜缺血及再灌注模型

血管功能不全是青光眼视网膜病变的重要影响因素,许多研究者借助视网膜缺血的动物模型分析相关病变并试图找出有效的神经保护措施。其中最常用的是急性视网膜缺血模型,Bfichi 等^[25]在大鼠前房内注入生理盐水,眼压升高至 110 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),当眼压超过血管收缩压,眼内血液流动就会停止。这种方法可引起视网膜局部或全部缺血,从而导致 RGCs 死亡,同时伴有视网膜神经纤维层变薄,严重程度与缺血的时间相关,当血液重新灌注后,损伤并没有终止,并持续加重。

缺血也会引起视神经的损伤,可见线粒体的破裂、轴突的退化、髓鞘的坏死等^[26]。ERG 的 a 波和 b 波振幅明显下降。用计算机化的瞳孔测量法进行评估,缺血眼的瞳孔光反射幅度增加、潜伏期延长,而反射的最大速率下降^[27-28],证明视网膜和视神经的功能损伤。此模型的缺点在于不能区分是高眼压还是视网膜缺血导致 RGCs 的减少。

2.6 烧灼眼外静脉

烧灼 2 条或更多的眼外静脉会引起眼压升高,眼压升高的程度与烧灼静脉的数量有关。Shareef 等^[29]烧灼大鼠 3 条巩膜上静脉,增加了小梁网后的阻力而达到升高眼压的目的。Ko 等^[30]研究证明这种方法引起的视网膜损伤不仅引起 RGCs 的死亡,还会使神经纤维层变薄以及视神经退行性变,具体表现为 ERG 的 a 波和 b 波时间依赖性下降以及瞳孔光反射的减弱,但这种方法引起的眼压升高程度没有光凝法明显。

烧灼眼外静脉法和其他方法比较起来操作简单,缺点是影响了眼部血供,可能会引起眼内局部缺血。Mittag 等^[31]的研究证明,该方法所引起的高眼压是暂时的,会在 2~3 个月后恢复到正常水平,可能与新生血管的产生有关,为了减少新生血管的产生,反复结膜下注射 5-氟尿嘧啶是必需的。

2.7 眼外静脉结扎

最近研究证明持续结扎大鼠巩膜上静脉会引起轻度的眼压升高,晚期可产生 RGCs 选择性死亡以及视神经乳头凹陷,实用性尚需进一步评估^[32]。

2.8 前房注射透明质酸钠

过度的细胞外基质聚集,例如葡萄糖胺聚糖,曾有研究者证明其可以减少房水外流从而产生青光眼,前房内注入透明质酸钠可维持高血压 5 d 左右,大鼠前房内重复注射透明质酸钠,可以产生显著而持久的高眼压,但注射点周围有局部的角膜水肿^[33]。长期的高眼压可引起 RGCs 死亡以及视神经萎缩,并可引起暗视野 ERG a 波和 b 波以及振荡电位的下降^[34]。初步

研究证明此模型模拟了原发性开角型青光眼的某些特征。但是重复前房注射可能会影响动物的健康。

2.9 前房注射其他物质

最近 Urcola 等^[35]研究证明前房重复注射乳汁微粒可导致大鼠眼压缓慢升高,并可持续较长时间,RGCs 数量水平减少与眼压升高呈正相关。罗学港等^[36]用生理盐水加压灌注大鼠前房,使眼压升高到 70 mmHg,并在二道生理记录仪监测下维持 3 h,造成高眼压模型。缺点和上述的透明质酸酶前房注射相似。

3 小结

鼠模型已成为青光眼实验研究的重要工具,帮助人们了解青光眼的病因、病理和分子生物学的改变,同时为降眼压药物和视神经保护药物的研究和筛选提供依据。在具体研究中应根据实验目的选择合理的造模方法。

参考文献

- 1 Dreyer EB, Grosskreutz CL. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG) [J]. *Clin Neurosci*, 1997, 4: 270 - 273
- 2 Li Y, Schlamp CL, Poulsen GL, et al. p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate [J]. *Mol Vis*, 2002, 8: 341 - 350
- 3 Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 1004 - 1008
- 4 Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, et al. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37: 1618 - 1624
- 5 Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, et al. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina [J]. *Vis Neurosci*, 1992, 8: 567 - 573
- 6 Huang W, Fileta J, Guo Y, et al. Downregulation of Thy 1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma [J]. *Curr Eye Res*, 2006, 31(3): 265 - 271
- 7 雷季良, 陈白羽, 栾丽菊. 视神经损伤动物模型的建立 [J]. *解剖学杂志*, 2005, 28(1): 107 - 108
- 8 Kielczewski JL, Pease ME, Quigley HA. The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection on amacrine cells in the rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 3188 - 3196
- 9 Isenmann S, Engel S, Gillardon F, et al. Bax antisense oligonucleotides reduce axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo by reduction of bax protein expression [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6: 673 - 682
- 10 Yoles E, Schwartz M. Degeneration of spared axons following partial white matter lesion; implications for optic nerve neuropathies [J]. *Exp Neurol*, 1998, 153: 1 - 7
- 11 Sugiyama T, Moriya S, Oku H, et al. Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies [J]. *Surv Ophthalmol*, 1995, 39: S49 - 56

- 12 Noske W, Hensen J, Wiederholt M. Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1997, 235: 551 - 552
- 13 Tezel G, Kass MA, Kolker AE, et al. Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma [J]. J Glaucoma, 1997, 6: 83 - 89
- 14 Chauhan BC, LeVatte TL, Jollimore CA, et al. Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45: 144 - 152
- 15 John SW, Smith RS, Savinova OV, et al. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39: 951 - 962
- 16 Morrison JC, Johnson EC, Cepurna WO, et al. Microvasculature of the rat optic nerve head [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40: 1702 - 1709
- 17 Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, et al. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric [J]. BMC Neurosci, 2006, 7: 66
- 18 Sugimoto E, Aihara M, Ota T, et al. Effect of light cycle on 24-hour pattern of mouse intraocular pressure [J]. J Glaucoma, 2006, 15: 505 - 511
- 19 Pang IH, Wang WH, Clark AF. Acute effects of glaucoma medications on rat intraocular pressure [J]. Exp Eye Res, 2005, 80: 207 - 214
- 20 Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, et al. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage [J]. Prog Retin Eye Res, 2005, 24: 217 - 240
- 21 Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, et al. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage [J]. Exp Eye Res, 1997, 64: 85 - 96
- 22 Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink [J]. Jpn J Ophthalmol, 1998, 42: 337 - 344
- 23 WoldeMussie E, Ruiz G, Wijino M, et al. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brim onidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42: 2849 - 2855
- 24 Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, et al. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 402 - 410
- 25 Bfichi ER, Suivaizdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study [J]. Ophthalmologica, 1991, 203: 138 - 147
- 26 Adachi M, Takahashi K, Nishikawa M, et al. High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1996, 234: 445 - 451
- 27 Grozdanic S, Betts DM, Allbaugh RA, et al. Characterization of the pupil light reflex, electroretinogram and tonometric parameters in healthy mouse eyes [J]. Curr Eye Res, 2003, 26: 371 - 378
- 28 Barnett NL, Grozdanic SD. Glutamate transporter localization does not correspond to the temporary functional recovery and late degeneration after acute ocular ischemia in rats [J]. Exp Eye Res, 2004, 79: 513 - 524
- 29 Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, et al. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats [J]. Exp Eye Res, 1995, 61: 379 - 382
- 30 Ko ML, Hu DN, Ritch R, et al. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 2967 - 2971
- 31 Mittag TW, Danias J, Pohorenc G, 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: 3451 - 3459
- 32 Yu S, Tanabe T, Yoshimura N. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation [J]. Exp Eye Res, 2006, 83: 758 - 770
- 33 Benozzi J, Nahum LP, Campanelli JL, et al. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 2196 - 2200
- 34 Moreno MC, Marcos HJ, Oscar-Croxatto J, et al. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid [J]. Exp Eye Res, 2005, 81: 71 - 80
- 35 Urcola JH, Hernandez M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death [J]. Exp Eye Res, 2006, 83: 429 - 437
- 36 罗学港, 刘浩忠. 生理盐水加压灌注眼前房引起大鼠急性高眼压 [J]. 眼科研究, 1987, 5(4): 222

(收稿: 2008-04-23 修回: 2008-10-22)

(本文编辑: 尹卫靖)

· 调查报告 ·

全基因组扫描高度近视一家系

王俊妨 林 婴 杨正林 张明华 翟宝进

高度近视是指屈光度 > -6.0 D 的屈光不正, 又称恶性近视或病理性近视, 伴有眼轴的延长和眼基质的改变, 视力呈进行性下降, 可伴有弱视、青光眼、白内障、玻璃体混浊、视网膜脱离等多种并发症, 是致盲的主要原因之一^[1]。高度近视有家族性并有明显的遗传倾向, 虽在人群中患病率高, 但是多由后天因素引起, 加上高度近视具有遗传异质性, 给高度近视的分子遗传学研究带来了一定困难^[2]。高度近视具有种族特异性, 本

研究对中国原发性近视眼家系进行分子遗传学研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象与标本采集 先症者, 男, 26 岁, 双眼高度近视, 并伴有眼底病变。其父亲及祖母均有相同疾病。该家系 5 代 9 人发病, 我们纳入了患者及其一级亲属 11 人, 采用 EDTA 二钾抗凝剂抗凝, 抽取 10 mL 静脉血。酚-氯仿提取法提取外周血白细胞 DNA, -20°C 保存。

1.2 主要试剂与仪器 PCR 扩增试剂 (大连 Takara 公司); STR 引物、HD、500LIZ™ Size Standard (美国 ABI 公司); 合成引物 (成都朝晖生物技术有限公司); 低温离心机 (德国 Eppendorf); PCR 扩增仪 (MJ 公司); ABI-3100 测序仪 (美国 ABI

作者单位: 300162 天津武警医学院附属医院检验科 (王俊妨、张明华、翟宝进); 610072 成都, 四川省人民医院人类分子生物学与遗传研究中心 (林婴、杨正林)

通讯作者: 翟宝进 (Email: wjxyylk2008@yahoo.com)