

急性高眼压对大鼠包含黑视素的视网膜神经节细胞的影响

王怀洲 洪洁 王宁利

The effects of acuter intraocular pressure elevation on melanopsin-containing retinal ganglion cells

Wang Huaizhou, Hong Jie, Wang Ningli. Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Abstract Objective Melanopsin-containing retinal ganglion cells (mcRGCs) play an important role in non-image-forming visual function. Researches showed that retinal ischemia/reperfusion induced by acute ocular hypertension results in the decrease of total RGCs. But whether mcRGCs are affected is below clear. This study was to investigate the effects of acute intraocular pressure (IOP) elevation on mcRGCs in rats. **Methods** A transient ischemic insult was induced in retinas of 6 male Wistar rats by elevating the IOP through the anterior chamber infusion of normal saline solution (NS) in the height of 133 cm (with the pressure 13.3 kPa) for 75 minutes in the right eyes to create the retinal ischemia, and then the IOP was recovered for the reperfusion of retina. In the left eyes, puncture of anterior chamber without NS infusion was performed as control. Seven days later, the eyeballs were enucleated and retinas were isolated. The cell bodies, dendrites, and axons of mRGCs were detected with an antibody against melanopsin by free floating immunohistochemistry. Stacked images of scanning laser microscopy allowed view of all the processes by putting the images at different focal planes into one image. Other RGCs on the same retina were labeled with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). mcRGCs were counted at a magnification of 200 × and the average mcRGCs and other RGCs density were calculated under the scanning laser microscopy. The use of animals followed the Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** Compared with the left eyes, the densities of both mcRGCs and other RGCs in the right eyes were reduced on 7 days after acute IOP elevation (23.48 ± 2.24 vs 33.61 ± 1.53 , $3353.02 \pm 114.38/\text{mm}^2$ vs $3952.99 \pm 19.92/\text{mm}^2$, respectively), showing statistically significant differences between them ($t = -6.20$, $P = 0.003$; $t = -4.474$, $P = 0.011$). The structure alteration of RGCs following the acute ocular hypertension included the decrease and break of dendrites branch and dendrites field under the fluorescence microscope. **Conclusion** Retina ischemia induced by high IOP results in the loss and structure change of mcRGCs. The mcRGCs of rat show more vulnerable to the acute IOP elevation than other RGCs.

Key words melanopsin; retinal ganglion cells; intraocular pressure; retinal ischemia/reperfusion

摘要 目的 观察高眼压是否会对大鼠包含黑视素的视网膜神经节细胞(mcRGCs)产生损伤。**方法** 利用前房灌注制作急性高眼压诱导的视网膜缺血再灌注模型,利用免疫组织化学法显示 mcRGCs 及普通神经节细胞,观察其密度的改变。**结果** 急性高眼压后 7 d, mcRGCs 和其他神经节细胞的密度较正常组明显下降,密度分别为 (23.36 ± 2.22)、(33.36 ± 1.53)、(3353.02 ± 114.38) 个/ mm^2 和 (3952.99 ± 19.92) 个/ mm^2 , 存活率分别为 67.03% 和 84.82%。mcRGCs 2 级及以上的细胞树突分支减少,树突野范围变小,部分损伤严重的细胞只有胞体着色。**结论** 缺血再灌注可以造成大鼠 mcRGCs 密度下降以及树突分支结构的改变,此类细胞的损伤程度重于其他的神经节细胞的损伤程度。

关键词 黑视素; 神经节细胞; 高眼压; 视网膜缺血再灌注

分类号 R 774.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)07-0558-05

本课题为国家自然科学基金资助(30571991)

作者单位:100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室

通讯作者:王宁利(Email:wningli@trhos.com)

眼球除了具有视物能力之外,还有非形觉功能。研究显示,哺乳动物的视网膜中有一类特殊的神经节细胞——包含黑视素的视网膜神经节细胞(melanopsin-containing retinal ganglion cells, mcRGCs)^[1-2]。这类细胞具有内源性的光感受性,可以感受光线的明暗变化,产生信号后经视网膜下丘脑传导束传递到视交叉上核、顶盖前核和膝间小叶等中枢,具有调控昼夜节律、瞳孔对光反射等非形觉功能^[3-6]。高血压诱导的缺血再灌注模型可以造成 RGCs 数量的进行性下降^[7],在此过程中,关于 mcRGCs 是否受到损伤的研究尚未见报道。本研究采用 Wistar 大鼠视网膜缺血再灌注模型,观察高眼压对 mcRGCs 的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选用 Wistar 大鼠 5 只,雄性;体重 220 ~ 240 g,中国科学院生物物理研究所动物中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗鼠 melanopsin 抗体,(美国 ABR 公司);荧光标记的山羊抗兔二抗、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)(美国 Molecular Probes);封片剂(美国 Vector Laboratories)。MZ 95 立体显微镜、DM 4000B 荧光显微镜、TCS SP2 共焦显微镜、QWIN 图像分析工作站(德国 LEICA 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 高眼压诱导的视网膜缺血再灌注模型的制作

20% 水合氯醛(50 mg/kg)腹腔注射麻醉 Wistar 大鼠,右眼角膜爱尔凯因滴眼液表面麻醉。将生理盐水溶液瓶置于距小鼠心脏 133 cm 高度(约 13.3 kPa 压力),通过输液管连接到 29 G 注射针头。大鼠俯卧位,在立体显微镜下将 29 G 针头从角膜缘穿刺入右眼前房,观察未伤及虹膜、晶状体后开启输液控制阀,前房压力升高,穿刺口无漏水者为穿刺成功,否则弃用。此时可见视网膜及虹膜逐渐苍白,证实视网膜及眼前节缺血的存在。维持灌注状态 75 min 后,拔出针头,前房压力恢复正常,眼底恢复红色,说明视网膜血管已得到再灌注。左眼行同样的前房穿刺,但不给予升高的压力。实验结束后双眼涂红霉素眼膏,待大鼠清醒后放入笼中饲养^[8-11]。

1.2.2 心内灌注、取材 在前房灌注后第 7 天,给予大鼠 20% 水合氯醛 1.5 mL 腹腔注射,过量麻醉致死,立即打开胸腔,暴露心

脏。剪开右心耳,将输液器针头从左心尖插入,灌注 37 ℃ 生理盐水 200 mL,此时可以看到从右心耳流出的液体变澄清。标记眼球 12 点位置后摘除双侧眼球。

1.2.3 视网膜取材 将眼球取出后,立即置于 0.01 mol/L PBS 溶液中。在立体显微镜下,去除眼前节组织,保留眼杯。将眼杯倒置,轻压眼球后极部,利用显微镊轻拉周边巩膜组织,使视网膜脱离,完整剥离出视网膜。去除玻璃体后,在视网膜的 4 个方向分别剪 4 个口。将视网膜置于 4 ℃ 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min,然后用 0.01 mol/L PBS 溶液冲洗 3 次^[3]。

1.2.4 视网膜铺片的染色 将视网膜置于 0.5 mL 的 eppendorf 管,加入 1:500 的兔抗鼠 melanopsin 抗体溶液,4 ℃ 冰箱过夜。将视网膜以 1 × PBS 溶液冲洗 3 次后,加入 1:500 的荧光标记的山羊抗兔二抗溶液,37 ℃ 恒温箱避光孵育 2 h。将视网膜以 0.01 mol/L PBS 溶液冲洗 3 次,加入 1:10 000 的 DAPI 溶液,室温 1 h,避光。冲洗 3 次后,将视网膜平铺于载玻片上,玻璃体面朝上,滴加封片剂,加盖玻片,封固。避光,4 ℃ 冰箱保存。调整荧光显微镜滤光片使 Alexa Fluor 488 显色,选取距视盘上下左右 1.5 mm 和 2.5 mm 的 8 个点,在 200 倍镜下,计数每个视野内黑视素阳性的所有神经节细胞的数量,将计数细胞的总量除以 8 个视野的面积,得到 mcRGCs 密度,代表其平均密度(图 1)。

在距视盘 3 mm 处近周边视网膜,每个象限取 3 个点,共焦显微镜 400 倍镜下扫描,照片用 QWIN 图像分析工作站进行分析,计算神经节细胞层细胞的平均密度(图 2)。本实验采用左右眼对照,右眼 RGCs 密度/左眼 RGCs 密度 × 100% = RGCs 存活率(%)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学分析。各测试指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。左右眼间的视网

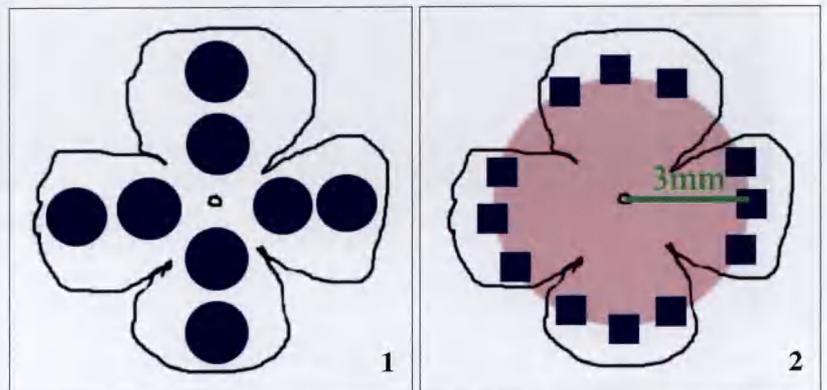


图 1 黑视素阳性细胞计数点示意图
Fig. 1 Schematic diagram of mcRGCs count

图 2 RGCs 层细胞计数点示意图
Fig. 2 Schematic diagram of RGCs count

膜 mcRGCs 密度及神经节细胞密度的比较采用配对 *t* 检验,2 种不同类型的 RGCs 存活率的比较采用独立样本的 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 右眼视网膜 mcRGCs 密度的变化

经过急性高眼压诱导的视网膜缺血再灌注后,视网膜上 mcRGCs 密度下降,部分细胞可见明显的结构改变,树突突然中断、变细,二级以上的树突分支明显减少,树突野范围缩小(图 3)。

实验组右眼视网膜 mcRGCs 密度与左眼比较,差异有统计学意义 ($t = -6.20, P = 0.003$)。右眼 mcRGCs 的存活率为 67.03%。说明急性高眼压诱导的视网膜缺血再灌注对 mcRGCs 造成了一定的损伤(表 1)。

2.2 右眼 RGCs 密度的变化

经过急性高眼压诱导的视网膜缺血再灌注后,RGCs 层细胞数量明显减少,细胞排列较正常眼紊乱(图 4)。右眼 RGCs 层细胞的密度与左眼 RGCs 的密度比较差异有统计学意义($t = -4.474, P = 0.011$),左眼 RGCs 存活率为 84.82%(表 1)。

表 1 眼压升高后大鼠左右眼间 RGCs 密度的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{个}/\text{mm}^2$)

Table 1 Comparison of cell density between left and right eyes of rats ($\bar{x} \pm s, \text{cells}/\text{mm}^2$)

	Cell density	
	mcRGCs	RGCs
Left eyes	33.36 ± 1.53	3 952.99 ± 19.92
Right eyes	23.36 ± 2.22	3 353.02 ± 114.38
<i>t</i>	-6.200	-4.474
<i>P</i>	0.003	0.011

(Paired *t* test)

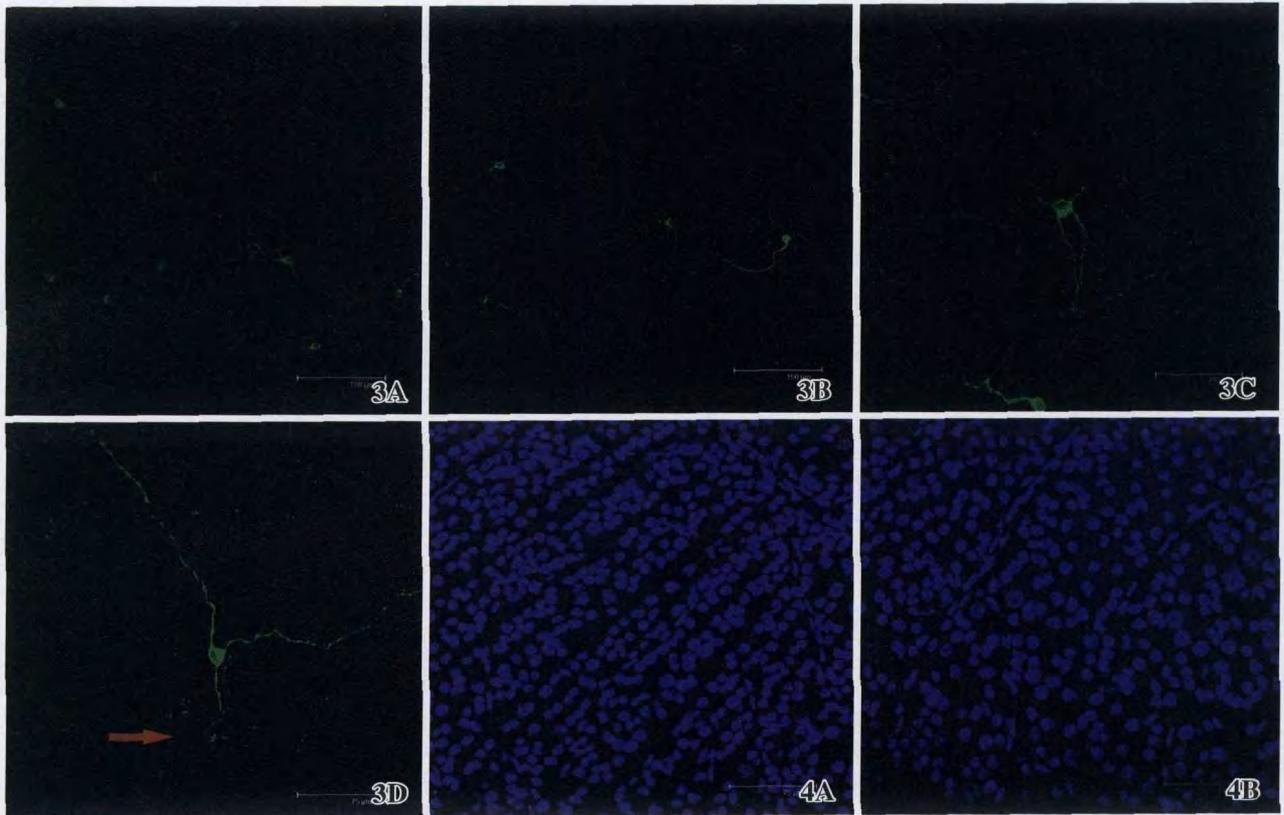


图 3 视网膜铺片显示,急性高眼压后 mcRGCs 密度下降,树突结构改变 A:正常视网膜 B:高眼压后的视网膜($\times 20$,标尺 150 μm) C:正常单个细胞 D:高眼压后单个细胞树突中断,分支明显减少(箭头)($\times 40$,标尺 75 μm) 图 4 共焦显微镜下 RGCs 层 DAPI 阳性细胞 A:正常眼视网膜 B:急性高眼压后 RGCs 数量减少、排列紊乱($\times 40$,标尺 75 μm)

Fig. 3 Images of representative retina A: control eyes show the normal retina (scale bar: 150 μm) B: The density of mcRGCs is decreased and the structure change of dendrites is displayed in the right eye (scale bar: 150 μm) C: The normal mcRGCs (scale bar: 150 μm) D: The break of dendrites and decrease of dendrites branches are visualized by immunohistochemistry with the melanopsin antibody (scale bar: 75 μm) Fig. 4 Images of DAPI positive staining in RGCs layer of retina under the confocal microscope (scale bar: 75 μm) A: The number and arrangement of RGCs are normal in the left eye B: The number of RGCs is decreased and the arrangement of RGCs is disorder in the right eye after acute hypertention

2.3 mcRGCs 与其他神经节细胞损伤的关系

mcRGCs 的存活率 (67.03%) 低于其他神经节细胞 (84.82%), 二者之间差异有统计学意义 ($t = -3.21, P = 0.033$), 说明 mcRGCs 对高压损伤的抵抗能力较差, 更容易受到高眼压的损伤。

3 讨论

本研究利用急性升高眼压诱导了视网膜缺血再灌注大鼠模型, 通过对 mcRGCs 及其他神经节细胞密度的观察, 首次证实急性高眼压诱导的视网膜缺血再灌注可以造成大鼠 mcRGCs 的丢失和结构改变。本实验还提示, 大鼠 mcRGCs 相对于其他的神经节细胞, 对高眼压更敏感。

高眼压诱导的视网膜缺血再灌注模型是一个 RGCs 损伤和保护研究的常用动物模型。既往研究显示, 缺血再灌注可以造成 RGCs 的原发性损伤和继发性损伤, 损伤的程度与缺血持续的时间有关^[11-13]。缺血再灌注损伤后 3~4 h 即可出现神经节细胞的快速死亡, 这些早期的死亡既有坏死, 也有凋亡。继发性损伤可能以凋亡的形式进行, 可持续 1~3 个月。

根据胞体的大小和树突野的范围, 大鼠 RGCs 大致可分为 12 种类型^[14]。mcRGCs 是功能上非常特殊的一类, 具有内源性光感受性, 是非形觉通路的光感受器, 也是视杆细胞、视锥细胞参与非形觉功能的中间通路。但其在视网膜的分布和形态学特征同其他神经节细胞并无明显不同, 主要位于 RGCs 层, 胞体大小和树突野的范围同大鼠 C3 类的神经节细胞类似^[3,5]。本研究结果证实 13.3 kPa 灌注 75 min 的急性高眼压确实造成了视网膜的损伤, 表现为神经节细胞层细胞密度下降, 同以往的研究结果一致, 但我们发现这种损伤同样影响了 mcRGCs, 造成其密度的下降和形态结构的改变。高眼压损伤后, mcRGCs 树突分支减少, 主要是 2 级和更高级的分支, 部分细胞可见轴突和树突中断、直径突然变细等现象。从胞体起至树突末梢的树突丛变薄。既往研究显示, 高眼压诱导的视网膜缺血再灌注后, 视网膜变薄, 主要是内核层和内丛状层的变薄。mcRGCs 的树突主要分布在内丛状层, 因此其树突分支减少、树突野缩小, 也可造成树突丛变薄, 进而使得内丛状层变薄。

DAPI 可标记出 RGCs 层所有的细胞核以进行计数。在大鼠的 RGCs 层, 主要的细胞为 RGCs, 还有异位的无长突细胞以及胶质细胞和血管内皮细胞^[15]。其中血管内皮细胞和胶质细胞由于形态异常, 在图像分析时可排除。高眼压诱导的视网膜缺血再灌注同样

可以造成无长突细胞的损伤。因此虽然利用 DAPI 染色计数得到的神经节细胞层的细胞密度较高, 但其存活率则基本可以代表 RGCs 的存活率。DAPI 染色得到的 RGCs 数量的结果应同以往研究中利用甲酚紫染色结果一致。本实验正常 RGCs 层的细胞密度, 同既往研究结果基本一致^[12,16-17]。当然, 通过免疫组织化学染色观察到的 mcRGCs 是一类单纯的细胞, 而 DAPI 染色观察到的细胞是一个细胞群体, 二者之间的比较只是一个相对粗略的观察。通过存活率的比较, 可以看到 mcRGCs 更容易受到损伤。

本实验利用急性高眼压诱导的视网膜缺血再灌注大鼠模型, 通过对 mcRGCs 和其他神经节细胞损伤程度的对比分析, 证明了高眼压诱导的视网膜缺血再灌注可以造成大鼠 mcRGCs 损伤和细胞密度、结构改变, 其损伤程度较其他神经节细胞稍重。提示急性闭角型青光眼患者除了其视功能受到损伤以外, 其非形觉通路的感光神经元也受到损伤, 意味着在严重的双眼急性闭角型青光眼患者, 其生物节律、瞳孔对光反射等功能可能发生严重障碍。结合本研究以及其他相关的研究结果^[18-19], 基本可以证实, 青光眼确实产生了非形觉通路的损伤。

本研究提示在临床青光眼患者的治疗过程中, 不仅要关注其视功能是否恢复, 也要关注患者的昼夜节律和睡眠障碍等非形觉功能的改变, 这样才能真正提高患者的健康水平, 改善患者的生活质量。

(志谢: 感谢中国科学院生物物理研究所视觉科学实验室何士刚教授及其视觉科学实验室的所有成员)

参考文献

- 1 The News and Editorial Staffs. Breakthrough of the year: The runners-up [J]. *Science*, 2002, 298: 2297 - 2303
- 2 He S, Dong W, Deng QD, et al. Seeing more clearly: Recent advances in understanding retinal circuitry [J]. *Science*, 2003, 302: 408 - 411
- 3 Hatter S, Liao HW, Takao M, et al. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity [J]. *Science*, 2002, 295: 1065 - 1070
- 4 Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. Photoreceptive net in the mammalian retina [J]. *Nature*, 2002, 415: 493
- 5 Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock [J]. *Science*, 2002, 295: 1070 - 1073
- 6 Hatter S, Lucas RJ, Mrosovsky N, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive system account for all major accessory visual functions in mice [J]. *Nature*, 2003, 424: 76 - 81
- 7 Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, et al. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37: 2002 - 2014
- 8 Buchi ER, Suivaizdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: An experimental model for quantitative study [J]. *Ophthalmologica*, 1991, 203: 138 - 147

9 Buchi ER. Cell death in the rat vein after a pressure-induced ischemia-reperfusion insult; an electron microscopic study. I; Ganglion cell layer and inner nuclear layer [J]. *Exp Eye Res*, 1992, 55: 605 - 613

10 周逸峰, 陶黎明, 张继文, 等. 急性眼内压升高对猫视网膜神经节细胞的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2002, 22: 469 - 472

11 杨新, 李健民. 大鼠实验性高血压视网膜缺血再灌注损伤模型的建立及其机制 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23: 126 - 129

12 Lafuente MP, Villegas-Perez MP, Selles-Navarro I, et al. Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult [J]. *Neuroscience*, 2002, 109: 157 - 168

13 Lafuente MP, Mayor-Torroglosa S, de Imperial JM, et al. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine [J]. *Exp Neurol*, 2002, 178: 243 - 258

14 Sun WZ, Li N, He SG. Large-scale morphological survey of rat retinal ganglion cells [J]. *Vis Neurosci*, 2002, 19: 483 - 493

15 Masland RH. The fundamental plan of the retina [J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4: 877 - 886

16 Kermer P, Klocker N, Labes M, et al. Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39: 1063 - 1066

17 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]. *Graef's Arch Clin Exp*, 1996, 234: 445 - 451

18 Wang HZ, Lu QJ, Wang NL, et al. Loss of melanopsin-containing retinal ganglion cells in a rat glaucoma model [J]. *Chin Med J*, 2008, 121: 1015 - 1019

19 Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, et al. Glaucoma alters the circadian timing system [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(12): e3931. Epub 2008 Dec 12

(收稿: 2009-01-21 修回: 2009-05-18)

(本文编辑: 王莉红)

· 病例报告 ·

氯丙嗪性白内障一例

孙丽颖 于建国

患者,女,57岁,因双眼视力逐渐下降2年就诊。既往有精神病史10年,口服氯丙嗪375 mg/d,总量约1368 g。患者全身情况良好。眼科检查:双眼视力0.3,眼压正常,眼睑呈灰蓝色(图1),角膜内皮可见棕色及灰白色颗粒沉着(以中央居多),前房深度正常,瞳孔直径3 mm,对光反射灵敏。晶状体前囊可见棕黄色颗粒附着,前囊下皮质呈棕黄色多角形混浊,宽度为3~4 mm,中央区较厚,可达晶状体1/4厚度(图2)。眼底视网膜色素轻度紊乱,眼球运动正常。诊断:双眼药物性白内障。嘱其停用氯丙嗪,改用其他安定药物。于局部麻醉下行右眼白内障超声乳化联合人工晶状体植入术,植入+22.0 D人工晶状体。术后1周右眼视力0.6+,眼部情况稳定。

然光线瞳孔区域,晶状体前囊及皮质浅层呈典型星形混浊外观^[2]。角膜病变主要累及中下部内皮层或后弹力层,可见淡棕色或灰白色点状沉着物。氯丙嗪引起的眼部损害还包括眼睑及球结膜的色素沉着,其发病率为0.1%~1%,且发生在大剂量使用氯丙嗪者(至少800 mg/d,持续20~24个月),表现为眼睑呈蓝灰色或紫色,睑裂暴露部球结膜呈铜棕色^[2]。氯丙嗪对视网膜的毒性相对较低,大剂量长期用药(2.5 g/d, 24个月)可致视网膜色素紊乱及轻度黄斑色素变化。

为防止此病的发生,每日氯丙嗪用量应尽量<400 mg,凡用量>300 mg/d、治疗超过2年的精神病患者,应每半年做1次常规眼科检查。仅有角膜和晶状体混浊,而无视功能损害时氯丙嗪可在医师的观察下继续使用;如有皮肤或视网膜色素沉着或不能解释的视功能损害,则应尽可能减少药量或用其他安定药物代替,同时应佩戴有色眼镜,尽量减少阳光的直接照射,避免药物的光毒性反应,最大限度地保护视功能^[3]。

参考文献

1 Shahzad S, Suleman MS, Shahab H, et al. Cataract occurrence with antipsychotic drugs [J]. *Psychosomatics*, 2002, 43: 354 - 359

2 惠延年. 眼科学 [M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 124

3 Alfred TS, Arthur CK, Wai - Man Chan, et al. Chlorpromazine - induced refractile corneal deposits and cataract [J]. *Arch Ophthalmol*, 1999, 117: 1662 - 1663

(收稿: 2009-03-23)

(本文编辑: 王莉红)



图1 眼睑呈灰蓝色 图2 晶状体浅层皮质呈棕黄色多角形混浊

讨论:氯丙嗪属吩噻嗪类药物,临床上主要用于各种精神分裂症和躁动症。氯丙嗪引起的眼部并发症以晶状体和角膜混浊为主。接受500 mg/d氯丙嗪治疗超过3年的患者引起晶状体和角膜改变者占20%~35%^[1]。晶状体混浊为双侧性和轴性,绝大多数病例双眼的病变程度相同,混浊范围均不超过自