

碘酸钠对小鼠视网膜形态和功能变化的影响

姜双,徐海月

作者单位:(121000)中国辽宁省锦州市,锦州医科大学附属第三医院眼科

作者简介:姜双,博士研究生,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:姜双. joa810121@126.com

收稿日期:2016-03-01 修回日期:2016-05-17

Study on morphological and functional changes of mouse retina induced by NaIO₃

Shuang Jiang, Hai-Yue Xu

Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Shuang Jiang. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. joa810121@126.com

Received:2016-03-01 Accepted:2016-05-17

Abstract

• **AIM:** To characterize the effects of sodium iodate on mouse retinal morphology and function.

• **METHODS:** Sodium iodate at 35mg/kg (body weight) was administered by tail vein injection into adult 6-8wk C57BL/6J mice. Morphological and functional changes of the retina were assessed at 6h, 1, 3, 5 and 8d after injections by fundus imaging, optical coherence tomography (OCT), ERG and histology. Mice in control group were give tail vein injection of equivalent dose of normal saline. All the eyeballs were removed for paraffin section and H-E staining.

• **RESULTS:** The fundus photographs images at 6h after injection showed obvious changes, which were light red in retina and showed retinal blood vessels radial arranged. At 6h after injection, off-white drusen-like change was found at fundus. While there were no observable changes in OCT image and ERG. At 1d after injection, the fundus lesion aggravated and the drusen increased gradually. There were retinal pigment epithelial (RPE) disorders, photoreceptors and outer nuclear layer (ONL) damage through OCT. At 3d after injection, the retina lesion aggravated further and the retina became edema. At 5d after injection, the retina edema cleared away, the optic nerve became white and the fundus lesions increased. At 8d after injection, the RPE layer, photoreceptors and ONL were destroyed obviously. In the process, ERG showed the amplitudes of a- and b-wave decreased in a time-dependent manner. H-E staining showed that cells in retina of mice in control group were neatly arranged and well-distributed. The outer layer retina of sodium iodate injection group was wave-like,

the normal structure of RPE disappeared and black round sediment could be seen which increased with time. At 8d after injection, there were any normal RPE.

• **CONCLUSION:** The tail vein injection of sodium iodate can well simulate the pathogenesis of age-related macular degeneration which can provide a good animal model for AMD.

• **KEYWORDS:** age-related macular degeneration; sodium iodate; optical coherence tomography

Citation: Jiang S, Xu HY. Study on morphological and functional changes of mouse retina induced by NaIO₃. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(6):1036-1038

摘要

目的:探讨碘酸钠鼠尾静脉注射导致的 C57BL/6J 小鼠视网膜形态和功能的变化。

方法:将 60 只 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠分为正常对照组和碘酸钠组。碘酸钠组经鼠尾静脉注射碘酸钠(35mg/kg), 分别于注射后 6h、1、3、5、8d 进行眼底照相、OCT 和电生理检测;正常对照组注射同等剂量的生理盐水。所有小鼠摘除眼球制作石蜡切片进行 HE 染色。

结果:正常对照组小鼠视网膜呈淡红色,视盘呈黄色,视网膜血管呈放射状走行。鼠尾静脉注射碘酸钠后 6h 即可见到眼底黄白色类似玻璃膜疣样改变,但此时 OCT 和 ERG 尚无明显变化。注射后 1d,眼底改变加重,类玻璃膜疣的改变逐渐增加,OCT 可见 RPE 层色素紊乱,光感受器和外核层受损。注射后 3d,视网膜损伤进一步加重,视网膜出现水肿,注射后 5d 水肿消失,视神经变白,眼底病灶进一步增多。注射后 8d,RPE 层、感光细胞层及外核层结构破坏明显,几乎没有正常结构。在此过程中,ERG 表现为 a 波、b 波振幅下降,并呈时间依赖性加重。HE 染色结果显示,对照组小鼠视网膜各层细胞排列规则整齐,密度均匀。碘酸钠组小鼠外层视网膜呈波浪状改变,RPE 层正常结构消失,可见黑色圆形沉积物,随时间延长,黑色沉积物逐渐增多,至注射后第 8d 时几乎没有正常 RPE 结构。

结论:碘酸钠经鼠尾静脉注射后,可以很好地模拟年龄相关性黄斑变性的发病过程,视网膜出现明显的形态和功能变化,为年龄相关性黄斑变性的研究提供一个较好的动物模型。

关键词:年龄相关性黄斑变性;碘酸钠;光学相干断层成像 DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.6.08

引用:姜双,徐海月.碘酸钠对小鼠视网膜形态和功能变化的影响.国际眼科杂志 2016;16(6):1036-1038

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)是一种神经退行性疾病,是发达国家

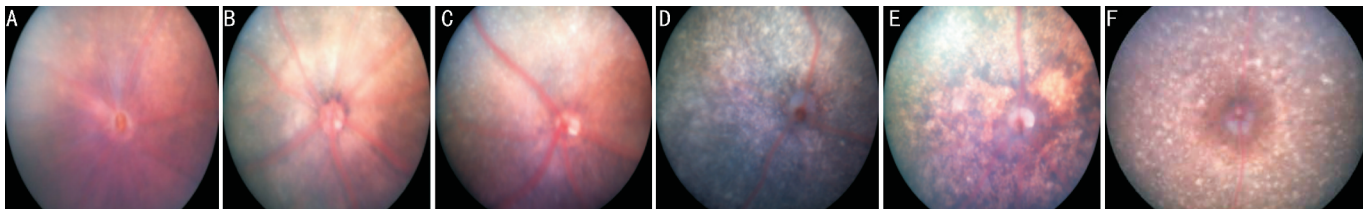


图1 不同时间点两组小鼠眼底照相图片 A:正常对照组;B:碘酸钠组 6h;C:碘酸钠组 1d;D:碘酸钠组 3d;E:碘酸钠组 5d;F:碘酸钠组 8d。

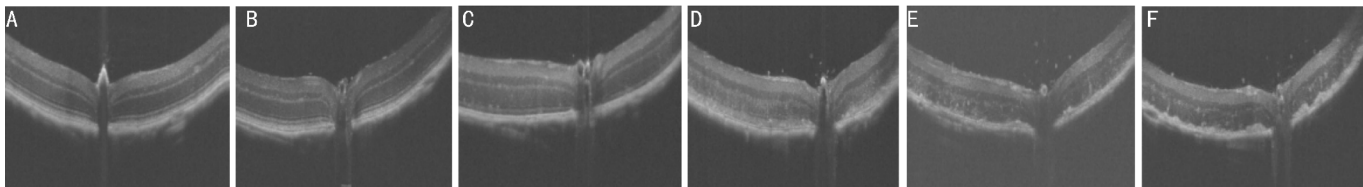


图2 不同时间点两组小鼠 OCT 图片 A:正常对照组;B:碘酸钠组 6h;C:碘酸钠组 1d;D:碘酸钠组 3d;E:碘酸钠组 5d;F:碘酸钠组 8d。

65 岁以上人群致盲的主要原因^[1]。AMD 分为干性和湿性两种,干性即 AMD 的早期阶段,主要特点是在视网膜色素上皮细胞层和 Bruch 膜内存在异常代谢产物即玻璃膜疣 (drusen) 的沉积;湿性的主要特点是形成脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV)。目前针对湿性 AMD 的治疗主要是抗新生血管药物的应用,但对于干性 AMD 尚无确切有效的治疗方法,而将疾病限制在早期阶段、防止其发展为湿性对于提高患者的治疗效果、减轻患者家庭及社会的经济压力具有十分重要的意义。因此,找到适合研究干性 AMD、简单经济、可重复性强的动物模型迫在眉睫。

1 材料和方法

1.1 材料 6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 60 只,体质量为 18~24g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。碘酸钠粉末 (NaIO_3) 购于索莱宝公司,戊巴比妥钠粉 (Sigma),复方托吡卡胺滴眼液 (参天制药株式会社),右旋糖酐羟丙甲纤维素滴眼液 (爱尔康)。眼底照相和 OCT 检测设备为 Phoenix,电生理为重庆艾尔曦公司。

1.2 方法

1.2.1 碘酸钠注射 适应性喂养 1wk 后,将实验小鼠随机分为两组:正常对照组和碘酸钠组,每组 30 只。造模前用 PBS 新鲜配置 1% 碘酸钠,通过鼠尾静脉注射 1% 碘酸钠 (35mg/kg),对照组注射同等剂量的 PBS。

1.2.2 眼底照相和 OCT 检测 取正常对照组和注射后 6h、1、3、5、8d 的碘酸钠组小鼠,1% 戊巴比妥钠 (0.6mL/100g) 腹腔麻醉,麻醉后固定小鼠,复方托吡卡胺滴眼液散瞳,右旋糖酐羟丙甲纤维素滴眼液保护角膜,置于角膜接触镜前,调整进光角度,进行眼底照相和 OCT 检测 (正常对照组不分时间点)。

1.2.3 ERG 检测 取正常对照组和注射后 6h、1、3、5、8d 的碘酸钠组小鼠,检测前暗适应 12h,1% 戊巴比妥钠 (0.6mL/100g) 腹腔麻醉,麻醉后固定小鼠,复方托吡卡胺滴眼液散瞳,右旋糖酐羟丙甲纤维素滴眼液保护角膜,安放电极,进行 ERG 检测。

1.2.4 HE 染色 取正常对照组和注射后 6h、1、3、5、8d 的碘酸钠组小鼠,麻醉后取眼球,4% 多聚甲醛固定 24h,梯度酒精脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,沿平行眼轴方向进行切片,厚 4 μm ,脱蜡、HE 染色、脱水、透明并封片。

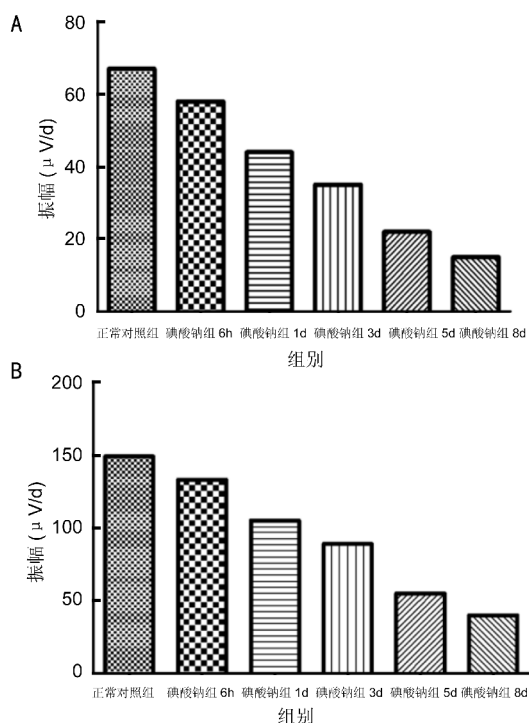


图3 不同时间点两组小鼠 ERG a波、b波振幅比较 A:a波; B:b波。

2 结果

2.1 眼底照相和 OCT 检测 正常对照组小鼠视网膜呈淡红色,视盘呈黄色,视网膜血管呈放射状走行。碘酸钠注射后 6h 视网膜即出现散在的黄白色渗出灶,类似玻璃膜疣 (drusen) 的改变,但 OCT 中尚没有很大的变化。注射后 1d,视网膜病灶逐渐增多,OCT 可见 RPE 层出现数个高反射点。注射 3d 后可见视网膜出现水肿增厚,视网膜颜色呈灰白色,OCT 可见 RPE 层色素紊乱,光感受器和外核层受损。注射后 5d 视网膜水肿消失,视网膜颜色恢复正常,视盘颜色变白,视神经萎缩。注射后 8d 视网膜呈青灰色,布满黄白色类“drusen”改变,OCT 可见 RPE 层、IS-OS 层消失,视网膜各层出现高反射点,视网膜变薄 (图 1~2)。

2.2 ERG 检测结果 碘酸钠注射后 6h 开始出现 ERG 改变,主要表现为 a 波、b 波振幅下降,并呈时间依赖性加重,注射后 3d 时 a 波和 b 波的振幅下降至正常时的 1/2

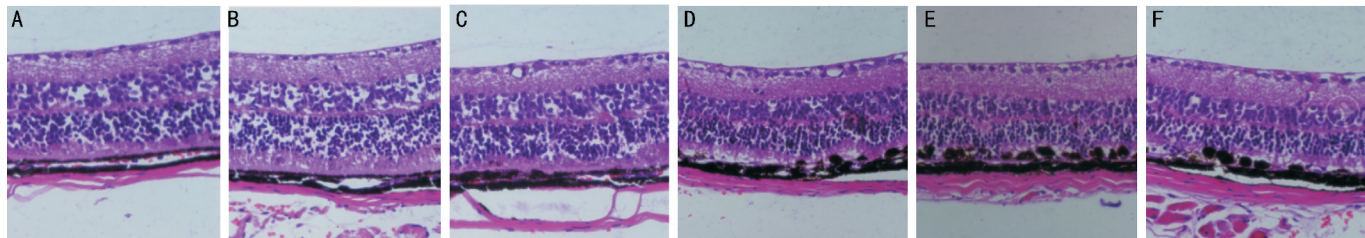


图4 不同时间点两组小鼠视网膜石蜡切片 HE 染色 A:正常对照组;B:碘酸钠组 6h;C:碘酸钠组 1d;D:碘酸钠组 3d;E:碘酸钠组 5d;F:碘酸钠组 8d。

左右,到第8d时 a 波、b 波振幅几乎下降到正常时的 1/3 (图3)。

2.3 HE 染色结果 HE 染色结果显示,对照组小鼠视网膜各层细胞排列规则整齐,密度均匀。碘酸钠组小鼠外层视网膜呈波浪状改变,RPE 层正常结构消失,可见黑色圆形沉积物,随时间延长,黑色沉积物逐渐增多,至注射后第8d 时几乎没有正常 RPE 结构(图4)。

3 讨论

年龄相关性黄斑变性 (age - related macular degeneration, AMD) 是一种中心视功能损伤为主要表现的“不可避免”性的视网膜疾病,是发达国家老年人群视力严重下降,甚至致盲的首要原因^[1]。干性 AMD 又称萎缩性 AMD,其早期表现为视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞内脂褐素沉积、RPE 与脉络膜 Bruch 膜之间有玻璃膜疣形成;晚期表现为 RPE 细胞及光感受器细胞的地图样萎缩,部分患者可出现脉络膜新生血管,并发展为湿性 AMD,最终导致失明。干性 AMD 被认为是疾病的早期阶段,其发病机制尚未完全明确,临床上对其仍缺乏有效的预防和治疗手段。近年来越来越多的研究集中于干性 AMD,因此找到适合疾病研究、可重复性好的动物模型十分重要。

碘酸钠是一种无机氧化剂,可以使视网膜细胞发生氧化应激反应,从而导致细胞重要的蛋白和 DNA 受到破坏,使细胞的形态、结构和功能发生改变,甚至发生损伤和死亡。碘酸钠可以使视网膜抗氧化系统受损,视网膜 SOD 和 CAT 活性下降^[2]。

国外已有多项研究采用碘酸钠鼠尾静脉注射模拟 AMD 的发病过程,所采用碘酸钠的剂量有所不同^[3-6],有学者采用 60mg/kg 的碘酸钠进行鼠尾静脉注射,其损伤迅速、程度严重,注射后 6h 视网膜即出现不可逆性改变。另有学者试图采用小剂量的碘酸钠造模,研究表明 15mg/kg 的碘酸钠注射不能造成视网膜损害,而 35mg/kg 能导致视网膜出现高反射点,进而外核层、IS/OS 层结构损害,而这种改变在损伤后 3mo 有一定的恢复^[7]。同样有学者试图用 10、20、30mg/kg 的碘酸钠进行鼠尾静脉注射,发现 20mg/kg 和 30mg/kg 的剂量导致视网膜出现结构和功能的显著改变,同时 RPE 特异性蛋白表达减少,而 10mg/kg 的剂量视网膜结构和功能未出现变化^[8]。大多数学者都着重研究碘酸钠导致的外层视网膜损害,也有学者关注了碘酸钠导致的视网膜内层的损害。Tao 等^[9]研究表明:碘酸钠导致视网膜 RPE 层、感光细胞层损害后,后续就会出现内层视网膜的损害。

基于前人研究结果和我们的预实验结果,我们发现 40 ~ 75mg/kg 的给药量视网膜反应过于迅速,损伤严重,

完全不可逆,对于研究疾病的治疗效果不利。而 15 ~ 30mg/kg 的给药量视网膜损伤较轻,视网膜变化不明显,模型建立时间较长,不利于实验的重复。因此,我们选择了 35mg/kg 碘酸钠进行鼠尾静脉注射,结果发现 35mg/kg 的给药量在注射后 6h 开始出现眼底的变化,在 1d 时出现 OCT 和电生理的改变,随时间的进展眼底形态和视功能改变逐渐加重,呈时间依赖性。与其他学者不同的是,我们在实验过程中发现,视网膜在注药后第 3d 出现水肿,注药后 5d 恢复,水肿恢复后视盘颜色苍白,视神经萎缩,这也加重了小鼠视功能的损害。小鼠视功能的变化从碘酸钠注射后第 1d 开始,a 波、b 波振幅下降,且随时间的延长逐渐降低,呈典型的时间依赖性。

本研究采用碘酸钠进行鼠尾静脉注射,通过眼底形态学、功能学的观察和组织切片的染色,模拟年龄相关性黄斑变性的发病过程,为进一步研究 AMD 的发病机制和治疗提供适合的动物模型。但本研究的观察时间较短,未对其眼底改变进行长期研究,同时没有对碘酸钠的作用机制进行探讨,这些都将在以后的实验中进行进一步研究。

参考文献

- 1 Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, et al. Age - related macular degeneration-emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med* 2006;38(7):450-471
- 2 朱颖婷,邓新国,高杨,等. 碘酸钠诱导大鼠视网膜损伤的病理改变和 SOD、CAT 的变化. *中国病理生理杂志* 2010;26(9):1851-1854
- 3 Carido M, Zhu Y, Postel K, et al. Characterization of a mouse model with complete RPE loss and its use in RPE cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;(5):5431-5444
- 4 Franco LM, Zulliger R, Wolf Schnurrbusch UE, et al. Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low dose NaIO₃. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(8):4004-4010
- 5 Guan Y, Cui L, Qu Z, et al. Subretinal transplantation of rat MSCs and erythropoietin gene modified rat MSCs for protecting and rescuing degenerative retina in rats. *Curr Mol Med* 2013;13(9):1419-1431
- 6 Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, et al. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by NaIO₃ in mice. *Curr Eye Res* 2002;25(6):373-379
- 7 Machalińska A, Lejkowska R, Duchnik M, et al. Dose - Dependent Retinal Changes Following NaIO₃ Administration: Application of Spectral - Domain Optical Coherence Tomography for Monitoring of Retinal Injury and Endogenous Regeneration. *Curr Eye Res* 2014;39(10):1033-1041
- 8 Wang J, Iacovelli J, Spencer C, et al. Direct Effect of NaIO₃ on Neurosensory Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(3):1941-1953
- 9 Tao Z, Dai J, He J, et al. The Influence of NaIO₃ - Induced Retinal Degeneration on Intra - retinal Layer and the Changes of Expression Profile/Morphology of DA - ACs and mRGCS. *Mol Neurobiol* 2013;47(1):241-260