

应用 OCT 对衣霉素诱导视网膜损伤大鼠模型的检测评估

张博仪¹, 张亚琼¹, 车慧欣²

基金项目:辽宁省自然科学基金项目(No. 2014022022); 2015年辽宁省大学生创新训练计划项目(No. 201510160000042)

作者单位:¹(121000)中国辽宁省锦州市,锦州医科大学第一临床学院;²(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:张博仪,在读本科。

通讯作者:车慧欣,硕士研究生,硕士研究生导师,主任医师。
chehuixin@163.com

收稿日期:2017-02-13 修回日期:2017-06-08

Evaluation of OCT on retinopathy induced by tunicamycin in rats

Bo-Yi Zhang¹, Ya-Qiong Zhang¹, Hui-Xin Che²

Foundation items: Natural Science Foundation of Liaoning (No. 2014022022); Student Innovation Training Program of Liaoning 2015 (No. 201510160000042)

¹The First Clinical College, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Hui-Xin Che. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. chehuixin@163.com.

Received: 2017-02-13 Accepted: 2017-06-08

Abstract

• AIM: To evaluate the morphological and functional changes of retinas induced by treatment of tunicamycin with optical coherence tomography (OCT) in rats.

• METHODS: Totally 60 SD rats were randomly divided into 3 groups (20 in each group), 0.5mg/kg (in low dose group), 1.5mg/kg (in high dose group) tunicamycin were injected into vitreous cavity and saline (9g/L NaCl) were injected in the same dose as a control group. Changes of retinas were observed by OCT on the 1, 7 and 14d after treatment of tunicamycin. Then the rats were sacrificed, retinas were taken out and embedded by the paraffin, tissue sections and the HE staining were performed.

• RESULTS: OCT results suggested that tunicamycin played damage effects on retinal morphology and structure which appeared a time- and dose- dependent. Fundus photography results suggested that 2wk after tunicamycin treatments, with the gradually changing of tunicamycin concentration, peripheral retinal and macular region became pale color gradually, edema

occurred in optic disk, retinal vessels appeared thinner in the high dose group, optic nerve came out atrophy. Fluorescein angiography confirmed that tunicamycin injection in vitreous cavity 2wk later, retinal vessels injury occurred, resulted in leaking of intravascular contrast agent from peripheral to the central part of the retinas. Electrophysiological data showed that retinal electrogram occurred disorder induced by tunicamycin, such as the amplitude of a wave, b wave decreased gradually, even closed to zero, which was very different from control significantly ($P < 0.05$). HE staining of paraffin sections showed that retina injuries induced by tunicamycin were in dose - time dependent, which was consistent with the results of OCT.

• CONCLUSION: Clinical retinal diseases could be simulated by retinal damage animal model induced by tunicamycin treatment. OCT detection offered real-time images of the retinal cross-section, which provided a helpful non-invasive method for detecting and evaluating the retinal damages.

• KEYWORDS: tunicamycin; retinopathy; optical coherence tomography

Citation: Zhang BY, Zhang YQ, Che HX. Evaluation of OCT on retinopathy induced by tunicamycin in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(7):1237-1241

摘要

目的:利用光学相干断层扫描仪(OCT)评价衣霉素损伤的大鼠视网膜形态及功能形态改变。

方法:SD大鼠60只,随机分为3组(每组20只):对照组、低剂量组和高剂量组,各组分别应用微量注射器行大鼠眼球玻璃体腔内注射,剂量均为0.3 μ L,对照组给予9g/L生理盐水、低剂量组给予浓度0.5mg/kg衣霉素、高剂量组给予浓度1.5mg/kg衣霉素进行玻璃体腔内注射。在造模后每天散瞳观察眼底,第1、7、14d通过OCT、眼底照相、眼底荧光、视网膜电图及HE染色观察不同浓度下视网膜各层形态学变化。

结果:OCT结果提示衣霉素对视网膜形态及结构有损伤作用,呈现出时间-剂量依赖性;眼底照相结果提示在衣霉素注射2wk后,随着衣霉素浓度的变化,视网膜周边及黄斑区颜色逐渐苍白,视盘区水肿,高剂量组出现视网膜血管变细,视神经萎缩;荧光素造影结果提示:衣霉素注射玻璃体腔2wk后,视网膜血管功能损伤,逐渐出现周边至中央部血管造影剂渗漏;电生理表明,衣霉素诱导的视网膜电图紊乱,a波、b波逐渐地振幅降低,甚至变平,具有明显的统计学意义($P < 0.05$);石蜡切片HE染色结果

提示衣霉素对视网膜各层的损伤呈现剂量-时间依赖性,与OCT结果相一致。

结论:衣霉素可以通过诱导视网膜损伤模拟视网膜疾病模型,OCT可以动态观察视网膜的损伤改变,作为一种非侵入性检查手段对于评价视网膜损伤具有一定积极意义。

关键词:衣霉素;视网膜损伤;光学相干断层扫描仪

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.7.09

引用:张博仪,张亚琼,车慧欣.应用OCT对衣霉素诱导视网膜损伤大鼠模型的检测评估.国际眼科杂志2017;17(7):1237-1241

0 引言

视网膜(retina)由色素上皮层和神经上皮层组成,其中色素上皮层由色素上皮细胞组成,并具有参与视网膜膜内外屏障的形成,运输营养物质、清除代谢废物,支持和营养光感受器细胞等作用。视网膜的损伤尤其是视网膜色素上皮层(retinal pigment epithelium, RPE)的损伤可引起患者视力的急剧下降,患者生活质量明显下降。年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)作为一种神经退行性疾病,是目前发达国家65岁以上人群的主要致盲眼病^[1],干性AMD早期主要以视网膜色素上皮层变性、萎缩及玻璃膜疣的形成特征;干性AMD晚期随着色素上皮层的破坏释放出VEGF等因子,促进脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)的形成,进一步加剧干性AMD进展为湿性AMD。本研究通过光学相干断层扫描仪(OCT)、眼底照相、眼底荧光血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)、视网膜电图及HE等对衣霉素诱导的视网膜损伤动物模型进行分析,模拟AMD发生发展过程,为早期发现及减缓干性AMD转化为新生血管型AMD奠定基础,并进一步揭示了AMD的发病机制,为AMD的预防及治疗提供新思路。此外,还可以通过动物模型实验研究,探讨能够有效及时发现及检测损伤程度的监测手段,这对于早期的发现及干预研究也具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠60只,体质量为180~250g,健康成年雌性,由锦州医科大学动物实验中心提供(整个动物实验经锦州医科大学动物伦理委员会审查批准,该实验符合动物伦理学标准)。衣霉素Tunicamycin购于沈阳远信宝成公司,戊巴比妥钠粉剂购于Abcam,羟糖苷滴眼液、散瞳剂托吡卡胺滴眼液和1g/L荧光素钠购于爱尔康及参天制药株式会社,眼底照相、FFA和小动物OCT(加拿大OptoProbe公司),小动物电生理仪(重庆艾尔曦公司)。

1.2 方法

1.2.1 衣霉素玻璃体腔注药造模 SD大鼠60只,随机分为3组(每组20只):对照组、低剂量组和高剂量组,各组分别应用微量注射器行大鼠眼球玻璃体腔内注射,剂量均为0.3μL,对照组给予9g/L生理盐水、低剂量组给予浓度0.5mg/kg衣霉素、高剂量组给予浓度1.5mg/kg衣霉素进行玻璃体腔内注射。在造模后每天用复方托吡卡胺滴眼液散瞳观察眼底,于注药后1、7、14d给予OCT检测,于注药后14d对大鼠眼底照相、荧光造影、电生理及石蜡切块HE染色检测视网膜形态及功能的变化。

1.2.2 OCT检测及眼底照相 取正常对照组(正常对照不分时间点)和注射低剂量组、高剂量组(不同时间点1、7、14d)的衣霉素实验组三组大鼠,10g/L戊巴比妥钠(0.6mL/100g)腹腔麻醉后固定大鼠,复方托吡卡胺滴眼液散瞳,羟糖苷滴眼液滴眼保持角膜湿润,置于角膜接触镜前,调整进光角度,进行眼底照相和OCT检测。

1.2.3 FFA 各实验组及对照组大鼠腹腔注射1g/L荧光素钠0.1mL,用托吡卡胺滴眼液散瞳后,将眼底血管造影检查仪器(Retinal Imaging System, OPTO-RIS, OptoProbe)调整到最佳状态。大鼠眼睛置于机器前,收集图像,对图像进行分析。

1.2.4 电生理检查 各组大鼠进行暗适应12h,10g/L戊巴比妥钠腹腔麻醉,将大鼠固定于操作台上,滴人工泪液保持角膜湿润,安放电极,暗室内进行视网膜电图(ERG)检测。

1.2.5 HE染色 各组大鼠麻醉后取眼球,40g/L多聚甲醛固定24h后蔗糖梯度脱水,石蜡包埋,沿眼轴方向切片,厚度约5μm,常规脱蜡梯度酒精复水后,进行苏木素伊红染色,再进行常规梯度酒精脱水,二甲苯透明后,中性树胶封片,显微镜下观察。

2 结果

2.1 OCT观察视网膜结构及形态的变化 通过OCT分别在大鼠不同给药浓度后1、7、14d时观察视网膜结构及形态的变化。结果表明在给药1d时,三组均未出现明显形态学结构变化;给药7d时,视网膜低剂量组出现RPE层紊乱,高剂量组视网膜出现RPE层结构紊乱,外核层点状高反射,并出现神经上皮层浅脱离;给药14d时,低剂量组视网膜色素上皮层高反射信号,RPE结构紊乱严重,IS/OS结构消失,高低反射呈波浪状改变,高剂量组OCT外核层细胞波浪状改变和外核层厚度减少,视网膜变薄并出现明显神经上皮层脱离,见图1。

2.2 眼底照相及眼底荧光血管造影检查情况 通过OCT结果发现在给药后第14d高剂量组出现色素上皮层的紊乱、渗出以及神经视网膜层脱离,推测衣霉素在此浓度下对视网膜造成典型的视网膜损害。故在第14d后观察不同浓度下大鼠眼底照相及眼底荧光血管造影检查的变化。正常对照组提示大鼠眼底照相视网膜呈淡红色,视盘呈黄色,视网膜血管呈放射状走行;低剂量组:眼底照相视网膜血管略变细,视网膜颜色变淡;高剂量组:视网膜水肿较重,出现视神经萎缩。眼底照相及眼底荧光血管造影显示:在注药第14d,正常对照组FFA检查结果正常,低剂量组晚期点状荧光渗漏,高剂量组晚期出现明显的荧光渗漏,见图2。

2.3 HE染色结果 大鼠石蜡切片HE染色,注药后14d正常对照组大鼠视网膜各层细胞排列整齐,结构清晰,形态规则;低剂量组第14d出现视网膜结构紊乱,视网膜外层呈波浪状改变;高剂量组第14d外层结构消失,可见黑色圆形沉积物,视网膜厚度变薄且出现神经上皮层脱离,各层结构紊乱、消失。且各组HE染色结果与同期OCT检查的结构改变结果相一致,见图3。

2.4 ERG检查情况 第14d ERG检查结果显示:正常对照组ERG检查结果正常;低剂量组出现a波、b波振幅下降,并呈时间依赖性加重,晚期出现a波消失,b波振幅下降至正常的1/2。高剂量组晚期出现a、b波均消失,见图4、5。

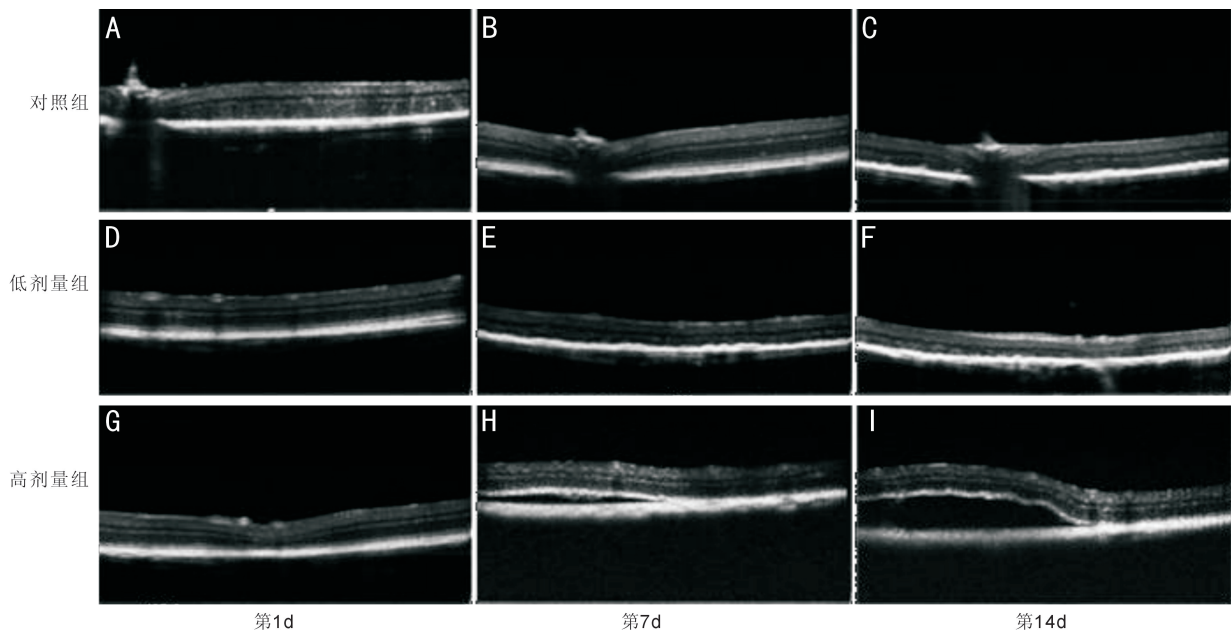


图1 玻璃体腔注射不同浓度衣霉素后不同时间点三组大鼠 OCT 的变化。

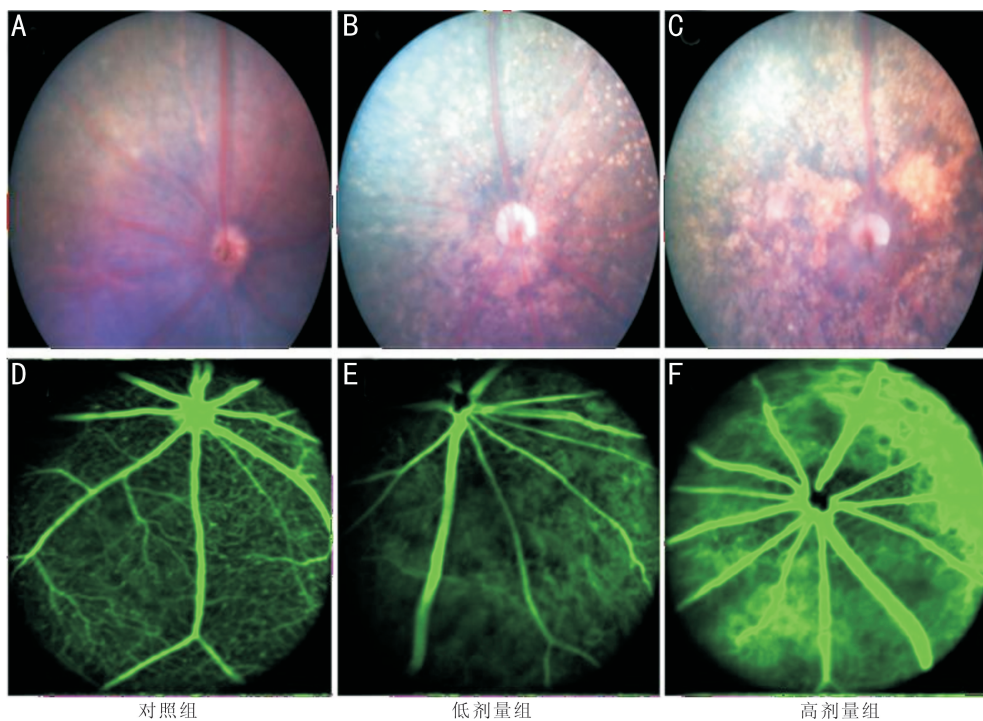


图2 不同剂量三组大鼠第14d眼底照相图片及眼底荧光血管造影图片 A、B、C:眼底照相图片;D、E、F:眼底荧光血管造影图片。

3 讨论

AMD 是一种导致视力严重损伤的视网膜眼病,分为干性和湿性两种类型。干性 AMD 又称萎缩性 AMD,其主要表现 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,疾病晚期出现地图样萎缩;部分患者晚期出现脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成,发展为湿性 AMD,最终可导致失明。AMD 是全世界发病率第三位的致盲眼病,也是西方国家老年人群中发病率首位的致盲眼病^[2];在中国随着社会的老龄化,AMD 的发病率也逐渐升高^[3],该疾病已成为我国老年人群不可逆视力损伤的主要原因^[4-9]。由于湿性 AMD 致盲率高且其治疗效果不理想,病程发展呈不可逆性,因此对

AMD 早期干预治疗就显得尤为重要,越来越多的研究也集中到早期的干性 AMD 的发病机制的研究中。本研究中,构建大鼠视网膜衰老损伤模型,进而对该模型动物的眼底视网膜形态及功能学检测,并辅助离体组织的观察比较,对干性 AMD 早期的病程改变进行观察,以探讨疾病早期筛查诊断的有效方法,为临床早期筛查诊断干性 AMD 提供借鉴。

衣霉素 (Tunicamycin, TM) 可引起细胞发生内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS),是目前体外用于诱导细胞内质网应激较经典的药物^[10-11],TM 诱导内质网应激在心血管疾病导致的心肌细胞凋亡过程中发挥了重要作用,成为近期研究的热点^[12-14]。本研究采用 TM 眼内注

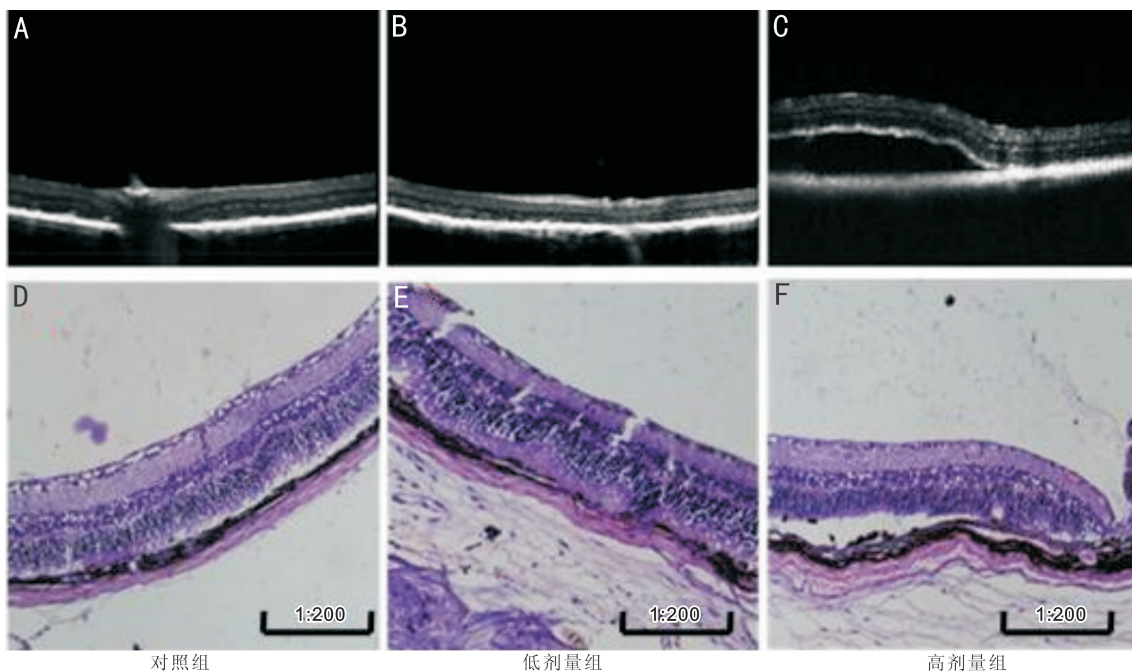


图3 注药后第14d大鼠OCT图片与注药第14d三组大鼠石蜡切片HE染色结果相比较 A:正常对照组的大鼠眼底OCT扫描图像;眼底视网膜各层次结构清晰,无损伤、结构完整;B:低剂量组眼底OCT图像,可见视网膜外层结构出现紊乱,有少量高亮信号产生,提示可能有渗出;C:高剂量组眼底OCT扫描图像,可见视网膜脱离,与RPE层之间出现较大的空隙;D:正常对照组眼底组织HE染色,可见视网膜及脉络膜各层次清晰,结构完整;E:低剂量组眼底组织HE染色,可见RPE层(呈棕褐色或黑色细胞层)变薄,视网膜外层结构紊乱;F:高剂量组眼底组织HE染色,显示RPE层及视网膜外层结构紊乱,甚至出现视网膜脱离。

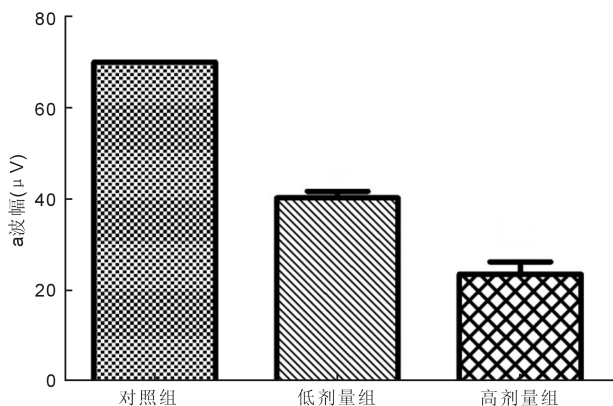


图4 三组不同剂量大鼠ERG a波振幅比较图片 通过定量分析3组模型鼠ERG a波振幅的变化,与正常组相比较,低剂量组与高剂量组振幅逐渐减低,组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

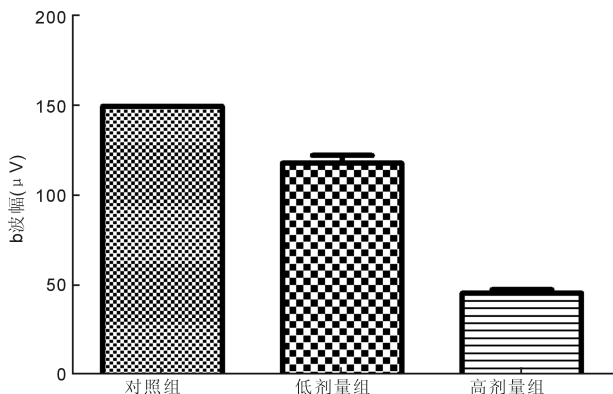


图5 三组不同剂量大鼠ERG b波振幅比较图片 通过定量分析3组模型鼠ERG b波振幅的变化,与正常组相比较,低剂量组与高剂量组振幅逐渐减低,组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

射模拟视网膜氧化应激损伤的发病过程,探讨不同剂量TM注射随着时间的改变视网膜损害的程度不同,以寻求新的研究视网膜损伤的监测手段建立必要的实验模型。

OCT是近年来进入眼科的又一项新技术,集现代光学、声学、电子学、计算机等领域最新成就于一体,应用测量光回波时间延迟的原理去获得被测活体组织结构的分层影像^[15]。可在不损伤机体情况下获得视网膜组织横断面的结构图像,使病情的实时连续观测成为可能,并为病情的及时诊断提供依据。因此我们采用OCT检测技术,并结合眼底照相、眼底荧光血管造影技术和电生理检测技术评价活体大鼠的视网膜损伤的形态学和功能学改变,最终与组织切片HE染色结果相比较,进一步明确视网膜损伤病变的不同时期的病理改变。研究结果发现,低剂量TM眼内注射后1d眼底观察无明显改变,OCT检查亦无明显改变;第7d以后观察眼底逐渐出现视网膜黄白色渗出,视网膜水肿,视网膜颜色变白,血管变细,甚至最后出现渗出性神经上皮层脱离。OCT检查结果亦可显示:早期RPE层出现数个高反射点,第14d逐渐出现RPE层结构紊乱,IS/OS结构消失,外核层出现高低反射呈波浪状改变,视网膜变薄及神经上皮层浆液性脱离改变。本研究在第14d比较了OCT与HE染色两项检查结果,显示正常组、低剂量组及高剂量组三组的组织切片HE染色显示的组织结构改变与OCT扫描显示的结构改变相对应一致。因此本研究结果提示,OCT能够实时监测大鼠视网膜退化损伤的形态动力学改变,为我们提供更好地理解视网膜变性的早期和晚期各阶段衣霉素引起的视网膜病理损伤的发生发展过程。

使用OCT成像技术,我们可以发现各种各样的视网膜损伤异常的过程并与组织病理学结果相对照。因此,利

用 OCT 检测技术可以帮助我们敏锐地监测视网膜损伤的组织结构改变过程,在损伤的视网膜形态学分析前瞻性观察研究方面为我们提供一个有价值的无创实时的实验检测手段,并在视网膜疾病诸如 AMD 等疾病进一步的发病机制研究中具有很大的促进意义。

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 Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, *et al.* Sunlight and the 102 year incidence of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 2004;122(5):750-757
- 3 马敏旺,陈松.老年性黄斑变性流行病学研究进展.中华眼底病杂志 2006;22(5):357-360
- 4 邹海东,张哲,许讯,等.上海市静安区曹家渡街道年龄相关性黄斑变性的患病率调查.中华眼科杂志 2005;41(5):15-19
- 5 何明光,许京京,吴开力,等.广东省斗门县老年黄斑变性流行病学调查.中华眼底病杂志 1998;14(7):122-124
- 6 黄晓波,邹海东,王宁,等.上海市北新泾街道老年人年龄相关性黄斑变性的患病率调查.上海交通大学学报(医学版) 2012;32(2):155-159

- 7 赵欣,田碧琪,郝云赫.北京西长安街社区 50 岁以上人群年龄相关性黄斑变性患病率调查.国际眼科杂志 2011;11(4):1364-1368
- 8 李慧丽,犹爱林,万迪玲,等.重庆市主城区年龄相关性黄斑变性患病率调查.中国实用眼科杂志 2009;27(5):1425-1429
- 9 罗中伶,陈国平,唐仁泓.长沙市机关人员年龄相关性黄斑变性患病率调查.眼科研究 2008;26(11):822-823
- 10 Lefterova MI, Mullican SE, Tomaru TA, *et al.* Endoplasmic reticulum stress regulates adipocyte resistin expression. *Diabetes* 2009;58(8):1879-1886
- 11 YacoubWasef SZ, Robinson KA, Berkaw MN, *et al.* Glucose, dexamethasone and the unfolded protein response regulate TRB3 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291(6):1274-1280
- 12 Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2005;52(2):381-395
- 13 Glembofski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res* 2007;101(10):975-984
- 14 Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, *et al.* Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003;22(53):8608-8618
- 15 李小英.光学相干断层扫描对老年性黄斑变性的诊断意义.中国药物与临床 2015;2(15):251-253