

# 复方卡波姆构建高眼压模型的视网膜形态学改变

庞国龙<sup>1</sup>, 于菲菲<sup>2</sup>, 孙 河<sup>3</sup>

基金项目: 山东省自然科学基金联合专项 (No. ZR2015HL112)  
作者单位: <sup>1</sup> (271000) 中国山东省泰安市中心医院眼科;  
<sup>2</sup> (266000) 中国山东省青岛市海慈医院眼科; <sup>3</sup> (154000) 中国黑龙江省哈尔滨市, 黑龙江中医药大学附属第一医院眼科  
作者简介: 庞国龙, 毕业于黑龙江中医药大学, 博士, 主治医师, 研究方向: 视神经、视网膜疾病。  
通讯作者: 庞国龙. pgl1982@163.com  
收稿日期: 2017-07-26 修回日期: 2018-01-04

## Morphological changes of retina in the rats model of high intraocular pressure induced by carbomer

Guo-Long Pang<sup>1</sup>, Fei-Fei Yu<sup>2</sup>, He Sun<sup>3</sup>

**Foundation item:** Joint Special Project of Shandong Natural Science Foundation (No. ZR2015HL112)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Tai'an Center Hospital, Tai'an 271000, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Qingdao Haici Hospital, Qingdao 266000, Shandong Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital to Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 154000, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Guo - Long Pang. Department of Ophthalmology, Tai'an Center Hospital, Tai'an 271000, Shandong Province, China. pgl1982@163.com  
Received: 2017-07-26 Accepted: 2018-01-04

## Abstract

• **AIM:** To provide the morphological evidence for the compound carbomer building high intraocular pressure model successfully.

• **METHODS:** Totally 50 SD rats were divided into experimental group 40 rats, blank group 10 rats by random number method. The rats in experimental group were randomly divided into 3 groups after the model was successful. Experimental model of high intraocular pressure was sacrificed at 1, 2 and 3wk to observe its pathological structure change and ultrastructure change.

• **RESULTS:** The high intraocular pressure of experimental model in 1, 2 and 3wk all showed the optic nerve and retinal damage. It was to see the optic nerve axon disappear, disorder arrangement of myelin sheath, periodic dissolve or demyelinating degeneration, glial cell proliferation. It showed the cells disordered arrangement of retina, the outer nuclear layer became thick, the inner and outer plexiform layer become thick, the kernel layer became thick, air bubbles, the numbers of ganglion cells reduced, ganglion cells and nerve fiber

layer edema, microglia proliferation, vascular membrane capillaries expansion, inflammatory cells appearing. It was to see the retinal ganglion cells layer with microglia proliferation under the electron microscope, ganglion cells structure fuzzy, organelles structures disappear, cell apoptosis, mitochondrial swelling, cytoplasm vacuoles degeneration, membrane plate of outer segment fracture or dissolved. And the damage degree was proportional to the forming time of high intraocular pressure.

• **CONCLUSION:** The morphology change of high intraocular pressure model about the retina and optic nerve proves that it is successful building the model through anterior chamber injection of compound carbomer solution.

• **KEYWORDS:** compound carbomer; high intraocular pressure model; transmission electron microscopy; ultrastructure

**Citation:** Pang GL, Yu FF, Sun H. Morphological changes of retina in the rats model of high intraocular pressure induced by carbomer. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(2):231-234

## 摘要

**目的:** 通过观察高眼压模型形态学改变, 为复方卡波姆成功构建高眼压模型提供形态学证据。

**方法:** SD 清洁级大鼠 50 只, 用随机数字法随机分为实验组大鼠 40 只、空白组大鼠 10 只。通过前房注射 10 $\mu$ L 复方卡波姆溶液方式造模, 实验组大鼠在模型成功后再次随机分为 3 组, 各组在高眼压 1、2、3wk 时间点分别处死并取材部分大鼠模型, 观察视网膜和视神经病理结构、超微结构变化。

**结果:** 实验组模型在 1、2、3wk 时间点均出现高眼压的视神经、视网膜损伤。电镜下正常视神经轴索、髓鞘结构完整, 无明显溶解情况; 高眼压下的视神经轴索消失, 髓鞘排列紊乱, 阶段性溶解或脱髓鞘变性, 胶质细胞增生。光镜下正常视网膜各层结构分明, 各层无明显水肿, 未见炎症细胞; 高眼压下的视网膜细胞排列紊乱, 外核层增厚, 内、外丛状层增厚, 内核层增厚, 出现空泡状结构, 节细胞数目减少, 节细胞层和神经纤维层水肿, 小胶质细胞增生, 血管膜毛细血管扩张, 出现炎症细胞。电镜下正常视网膜细胞器结构较为完整, 无明显细胞增生, 线粒体结构正常, 膜盘结构较为完整; 高眼压下视网膜节细胞层小胶质细胞增生, 节细胞结构模糊, 细胞器结构消失; 细胞凋亡, 线粒体肿胀, 胞浆空泡变性, 视细胞外节膜盘断裂或溶解; 并且损伤程度与高眼压时间呈正比。

**结论:** 高眼压模型的视网膜、视神经形态学改变证明, 复方卡波姆溶液前房注射构建高眼压模型成功。

**关键词:** 复方卡波姆; 高眼压模型; 透射电镜; 超微结构

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.2.06

引用:庞国龙,于菲菲,孙河.复方卡波姆构建高眼压模型的视网膜形态学改变.国际眼科杂志2018;18(2):231-234

## 0 引言

青光眼是我国第二大高致盲性眼病,高血压对视神经造成的不可逆损害,导致患者出现视野缺损、视力下降,甚至盲,严重危害广大患者的视觉健康,影响了患者正常的生产、生活<sup>[1]</sup>。因此,研究青光眼疾病的预防与治疗刻不容缓,在以往研究中,复方卡波姆构建青光眼高眼压模型,眼压明显升高,高眼压状态维持时间大约28d左右,高眼压模型关于眼压这个观察指标已经证实构建成功<sup>[2]</sup>。为从其它角度进一步验证模型的成功,本研究将从形态学方面对复方卡波姆构建高眼压模型进行验证。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SD(SPF级)大鼠[北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK-(京)2012-0001],共50只,鼠龄8~12wk,体质量200.11±12.09g,雌雄各半,雌鼠、雄鼠分开饲养。卡波姆940(北京国人逸康科技有限公司,Carbomer-940,CAS:9007-20-9),0.025%地塞米松(郑州卓峰制药有限公司,生产批号12100611)。本研究符合实验动物保护条例。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 高眼压模型的建立

应用随机数字法随机分为实验组大鼠40只,空白对照组10只大鼠。将卡波姆940配制成含0.3%卡波姆和0.025%地塞米松的复方卡波姆溶液,具体步骤:将150mg卡波姆粉剂放入盛有50mL蒸馏水的100mL烧杯中,并放入12.5mg地塞米松磷酸钠注射液,用玻璃棒搅拌卡波姆并放入超声设备内振荡至全部溶解,用pH校验计调节溶液pH值为4后备用。造模方法:用38G微量注射器在右眼角巩膜缘与角膜顶点中间位置,作一细小穿刺口并抽出10μL房水,排掉房水,用38G微量注射器经此穿刺口注射10μL复方卡波姆溶液至前房,完毕后,先用医用棉签压住穿刺口,接着迅速抽出针头,用棉签继续压穿刺口1min<sup>[2]</sup>,前房可见卡波姆溶液迅速变成白色絮状物,部分分布在瞳孔区,部分分散到周边房角区域,左眼为对照眼,造模完毕。眼压大于21mmHg或眼压高于非手术眼5mmHg,且高眼压连续持续7d以上为造模成功<sup>[3]</sup>。实验组40只大鼠造模成功,其中10只因为角膜软化、凸起、前房积血或较其它模型质量稍差等原因剔除实验。再次随机分3组,每组10只大鼠模型。

#### 1.2.2 眼压的测量

基础眼压测量在卡波姆注射的前1d进行,时间选在上午10:00。复方卡波姆溶液注射后每隔1d测量1次眼压,即第1wk内1、3、5、7d测眼压,1wk后改为每隔3d测1次眼压,时间统一选在上午10:00;其中右眼基础眼压值为12.14±1.02mmHg,1wk眼压值为27.11±3.11mmHg,2wk眼压值为28.23±4.31mmHg,3wk眼压值为30.02±2.01mmHg<sup>[2]</sup>。

#### 1.2.3 一般状况

一般状况包括大鼠的体质量、精神状态、角膜情况、前房情况、眼压变动、死亡情况等,如果术后大鼠出现角膜软化、凸起和前房渗出、积血等情况,则将该大鼠从本研究中剔除。

表1 各组大鼠视网膜全层厚度值 ( $\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$ )

组别	眼数	视网膜全层厚度
空白组	6	156.33±10.50
注射后1wk	6	177.00±5.29 <sup>b</sup>
注射后2wk	6	200.66±9.50 <sup>b,d</sup>
注射后3wk	6	147.00±4.35 <sup>b,f</sup>

注:<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 空白组;<sup>d</sup> $P<0.01$  vs 注射后1wk组;<sup>f</sup> $P<0.01$  vs 注射后2wk组。

#### 1.2.4 光镜标本采集

前房注射卡波姆后1、2、3wk,每个时间点实验各组随机选择6只大鼠通过腹腔注射过量水合氯醛的方法处死。4%甲醛溶液心脏灌注后,缝线标记12:00和3:00位,摘除双侧眼球,在4%甲醛溶液中固定24~48h后,石蜡包埋,进行切片和HE染色,切片位置统一选取颞侧视网膜,位于视神经与黄斑区连线,距离视神经约3mm,纵向切取获得。使用光学显微镜对大鼠眼球病理切片拍照,CMIAS系列数码医学图像分析系统测量视网膜厚度(选择内界膜到视网膜色素上皮层测量)和其他相关数据分析。

#### 1.2.5 透射电镜标本采集

前房注射卡波姆后1、2、3wk,每个时间点实验各组随机选择4只大鼠通过腹腔注射过量水合氯醛的方法处死。3%戊二醛溶液心脏灌注后,缝线标记12:00和3:00位,使用镊子迅速取出大鼠眼球并保留较长的视神经(约4mm)。将眼球连同视神经迅速放入3%戊二醛固定液在4℃条件下固定过夜。用刀片取颞侧视网膜距视神经约3mm,修剪视网膜为2mm×3mm大小的标本条,视神经取距离球后1.5mm的视神经为标本。

统计学分析:应用SPSS16.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用组间独立样本 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 光镜下视网膜病理形态学观察

光镜下可见大鼠正常视网膜结构同人类相似,结构呈分层状。外核层细胞数最多,有3~5层;内核层细胞数较少,有2~4层;节细胞为单层,形态呈圆形或椭圆形,细胞核多偏于外侧,细胞分布均匀、紧密,形态、大小相似。可以清楚地看到内界膜、神经纤维层、神经节细胞层、内丛状层和内核层、外丛状层、外核层等,各层次无明显水肿和细胞减少(图1A)。高眼压大鼠的视网膜在高眼压早期表现为增厚,考虑为高眼压条件下视网膜应激性水肿,细胞体积增大,导致视网膜增厚,随着高眼压时间延长,视网膜开始逐渐变薄,考虑随着高眼压长期压迫,长期缺血、缺氧导致视网膜逐渐萎缩、变性,细胞体积缩小,因而视网膜在后期变薄(图1B~D,表1)。前房注射卡波姆后1wk高眼压大鼠视网膜显微结构各层结构欠清晰,细胞排列紊乱,外核层增厚,内、外丛状层增厚,内核层增厚,出现少许空泡状结构,节细胞数目开始减少,节细胞层和神经纤维层水肿,小胶质细胞增生,血管膜毛细血管扩张,少量炎症细胞(图1B)。前房注射卡波姆后2wk高眼压大鼠视网膜显微结构可见各层结构不清,细胞排列更加紊乱,外核层继续增厚,内、外丛状层继续增厚,内核层增厚,空泡状结构增多,节细胞数目继续减少,节细胞层和神经纤维层明显水肿,小胶质细胞增生明显,血管膜毛细血管扩

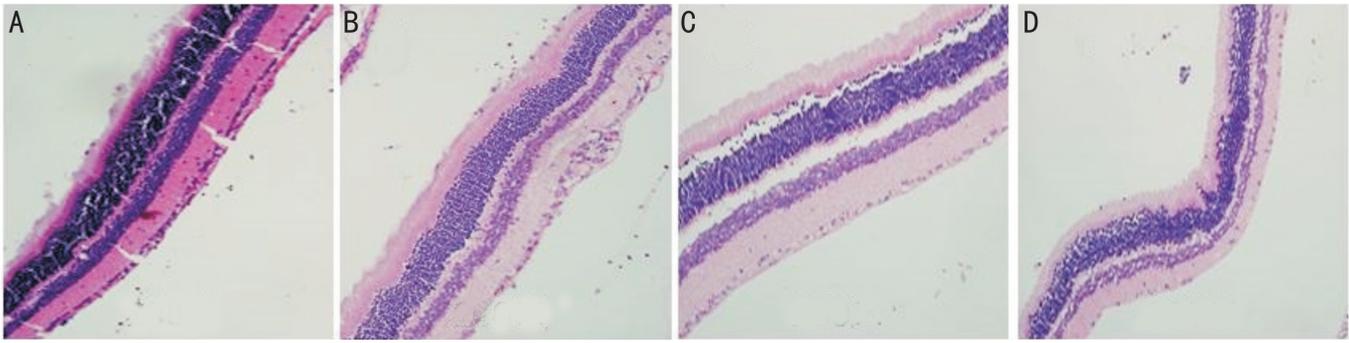


图1 光镜下视网膜病理形态学变化(HE×200) A:空白组;B:注射后1wk组;C:注射后2wk组;D:注射后3wk组。

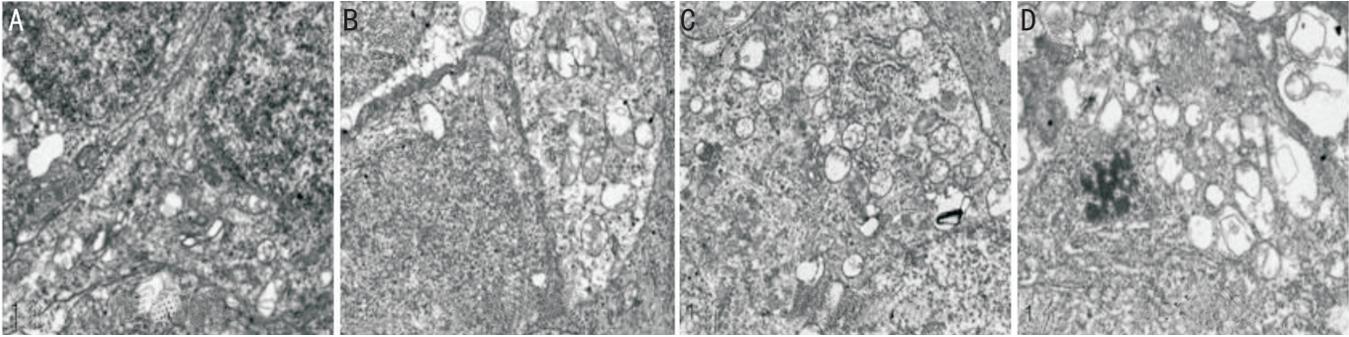


图2 大鼠视网膜神经节细胞层超微结构变化(×11500) A:空白组;B:注射后1wk组;C:注射后2wk组;D:注射后3wk组。

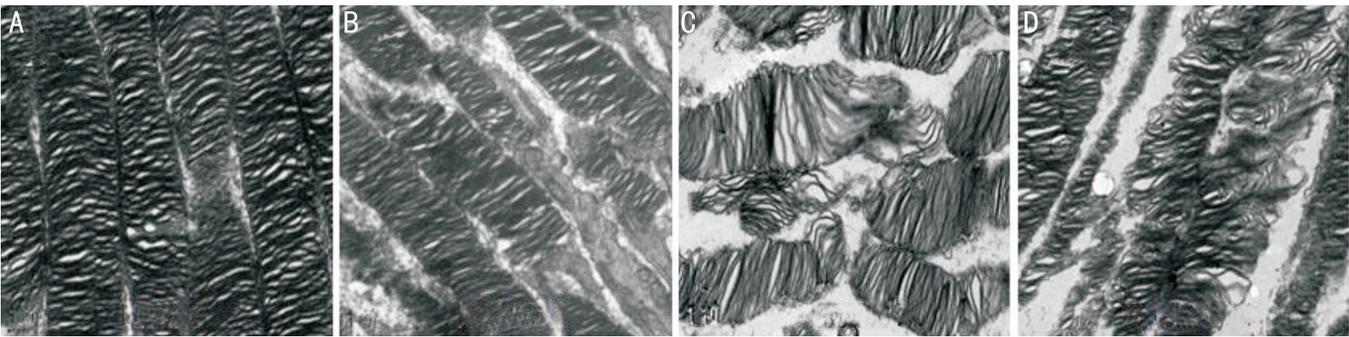


图3 大鼠视网膜膜盘超微结构变化(×11500) A:空白组;B:注射后1wk组;C:注射后2wk组;D:注射后3wk组。

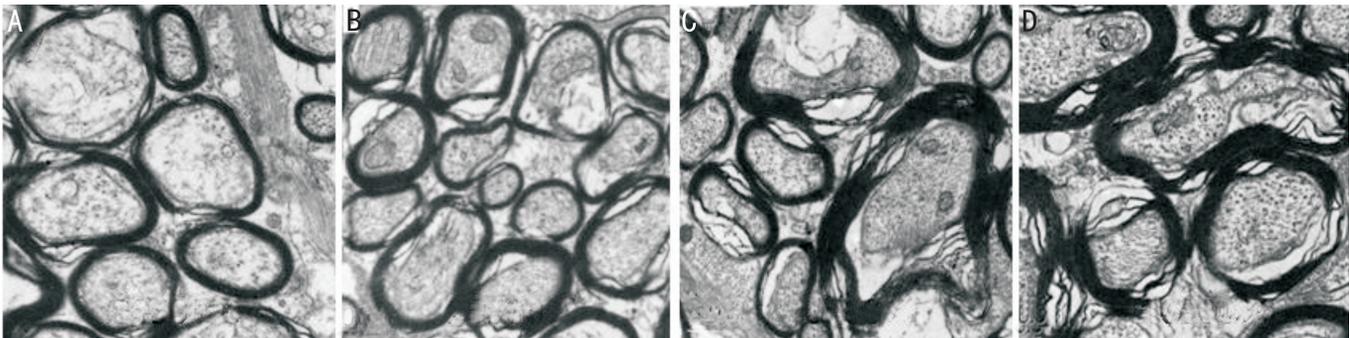


图4 大鼠视神经超微结构变化(×20500) A:空白组;B:注射后1wk组;C:注射后2wk组;D:注射后3wk组。

张明显,中等量炎症细胞(图1C)。前房注射卡波姆后3wk高眼压大鼠视网膜显微结构可见各层结构混乱,细胞萎缩、排列无序,外核层较前变薄,细胞各层均变薄,内核层较前变薄,大量空泡状结构,节细胞数目明显减少,节细胞层和神经纤维层萎缩、变薄,小胶质细胞大量增生,血管膜毛细血管扩张明显,大量炎症细胞(图1D)。

## 2.2 透射电镜下病理形态学观察

### 2.2.1 大鼠视网膜超微结构变化

空白组大鼠可见节细胞、神经胶质细胞结构正常,视细胞内节中线粒体丰富,呈圆形、卵圆形或椭圆形,可见峭,视细胞外节形态结构正常,膜盘排列紧密(图2A、3A)。高眼压1、2、3wk大鼠视网膜可见节细胞层小胶质细胞增生,节细胞结构模糊,细

胞器结构消失;可见部分核细胞异染色质凝集,细胞呈凋亡形态,部分细胞核膜消失,线粒体肿胀,胞浆空泡变性。内核层双极细胞线粒体肿胀,内丛状层个别突触膨大处水肿,突触小泡数量明显减少。视细胞外节多数膜盘断裂或溶解;内节水肿明显,线粒体减少并可见一些由蜕变细胞形成的泡状结构。伴随眼压时间的延长,上述超微结构病变相应加重(图2B和图3B为1wk,图2C和图3C为2wk,图2D和图3D为3wk)。

### 2.2.2 大鼠视神经超微结构变化

空白对照组大鼠视神经髓鞘较为完整,排列整齐,轴浆均匀,轴浆内可见线粒体,线粒体结构清晰,双层膜完整,可见结构嵴存在(图4A)。高眼压1、2、3wk大鼠视神经纤维普遍发生病

变,可见轴索消失,髓鞘排列紊乱,阶段性松解、溶解、萎缩成团或脱髓鞘变性,胶质细胞明显增生,并且高血压时间越长,以上病变程度相应加重(图4B~D)。

### 3 讨论

本研究通过前房注射复方卡波姆溶液的方式,成功构建了大鼠慢性高眼压模型。类似的研究, Kim 等<sup>[4]</sup>通过0.3%卡波姆溶液大鼠前房注射构建实验性慢性高眼压模型,得出结论,0.3%卡波姆溶液前房注射是一种有效的和可重复的制作大鼠慢性高眼压和青光神经退行性疾病的方法,本实验同其实验方法大致相同,得出的实验数据基本相似,再次证明了该实验的可重复性; Shen 等聚苯乙烯微球前房注射制备小鼠慢性高眼压模型,运用聚苯乙烯微球前房注射建立小鼠慢性高眼压模型,取得成功,并且出现了青光眼的视神经视网膜损伤<sup>[5]</sup>,同本研究的方法有相似之处,不同之处在于前房注入物有所不同;本课题组已发表的文章《复方卡波姆构建慢性高眼压模型的实验研究》<sup>[2]</sup>,从眼压的角度证实了模型的构建成功,为从多角度验证模型的可靠性,本研究在前述研究的基础上从形态学观察视神经、视网膜在高眼压情况下病变的程度,进一步在形态学方面验证模型的构建成功。

实验中我们发现,电镜下大鼠模型视网膜在高眼压早期表现为增厚,视网膜在晚期变薄。并且以上改变随着高眼压时间的延长而逐渐加重,同高眼压时间呈正相关。该结果提示,在高眼压早期由于眼压上升视网膜处于应激状态,通过细胞增生、肥大等方式来抵御高眼压的影响,但是随着高眼压时间的延长,长期的缺血、缺氧,细胞逐渐萎缩甚至凋亡,因此晚期视网膜是变薄的。透射电镜下高眼压大鼠模型视网膜伴随眼压时间的延长,超微结构病变相应加重,同时间呈正相关,且视神经超微结构同样出现高眼压时间越长病变程度相应加重的结果。以上形态变化相互印证,表明该实验结果可靠性强,这与 Kim 等<sup>[4]</sup>研究结果基本相似,其结果同样出现了视神经、视网膜的损伤,证明了该模型的可重复性强,不仅模型眼压升高较为理想,并且视网膜、视神经损害均有出现。经检索近10a文献,鲜有文献介绍透射电镜下的高眼压视网膜、视神经损伤,本研究通过透射电镜对高眼压模型的视神经、视网膜损伤进行观察,进一步丰富了对高眼压下视神经、视网膜的形态学认识。

复方卡波姆诱发大鼠青光眼模型的优点:(1)眼压升高相对平稳,并且高眼压状态能保持足够长的时间,非常适合研究青光眼性视乳头形态学改变,RGCs和轴索损害等病理、生理过程,以及药物干预对其保护作用等。(2)该模型眼压表现为平稳上升,我们分析原因为伴随着房水的持续分泌,房水的pH值也不断升高,使得前房内卡波姆凝胶的黏稠度持续增加,加大了房水流出难度。(3)运用卡波姆构建大鼠青光眼模型方法相对容易,价格较低,且易于操作和控制,对操作人员的操作技能要求相对较低,适合推广应用。(4)眼压升高持续时间近1mo,按人与大鼠寿命折算,相当于人高眼压1.5a,完全可用于进行各种抗青光眼药物降压作用和视神经、视网膜保护作用药物的研究。

根据国内外的文献资料可知,常见的啮齿类动物高眼

压模型还有 DBA/2J 小鼠、激光光凝小梁网致使房水流出通道受阻以及巩膜上静脉注射高渗生理盐水模型等<sup>[6-8]</sup>。DBA/2J 小鼠模型是常见的慢性遗传性鼠高眼压模型, DBA/2J 小鼠生长到7~8mo时眼压开始升高,这就导致实验时间非常漫长<sup>[9]</sup>,导致很多研究受限。有学者运用二极管激光或氩激光光凝小梁网在大鼠上诱发高眼压模型,但是激光光凝的方法要求有良好的激光基础,操作技术要求高,而且要求实验室必须有专门的激光设备<sup>[10]</sup>,激光设备价格昂贵,且专门用于实验,一般实验室很难配备,因此很难普及。也有文献采用巩膜上静脉注射高渗生理盐水诱发的大鼠高眼压模型<sup>[11]</sup>,但这种模型需要熟练的显微操作技术,学习曲线较长,相比之下,卡波姆注射诱导大鼠高眼压模型具有费用低、操作相对容易、对实验仪器要求少等特点,具有极大的优势。

综上实验所见,复方卡波姆溶液前房注射构建的高眼压模型,视网膜、视神经显微结构发生了高眼压的相应病变,表明前房注射复方卡波姆溶液的方法可以有效地诱发大鼠眼压升高,并且发生青光眼性视神经病变,复方卡波姆溶液前房注射构建大鼠慢性高眼压模型在眼压和形态学方面均得到验证,其可应用于青光眼新药物疗效的研究、青光眼视神经保护的研究,以及针刺对视神经的保护<sup>[12]</sup>,乃至针刺是否可以降低眼压方面的前瞻性研究,可在青光眼基础实验研究中应用。

### 参考文献

- 葛坚. 问题和争论是学科发展的动力-原发性闭角型青光眼分类争论的启示. 中华眼科杂志 2006;42(11):964-966
- 孙河, 庞国龙, 尹丽颖. 复方卡波姆前房注射构建大鼠慢性高眼压模型的实验研究. 中国中医眼科杂志 2014;24(3):157-162
- 徐岩, 陈祖基, 宋洁贞. 复方卡波姆诱导的兔高眼压模型与其它兔高眼压模型比较研究. 中华眼科杂志 2002;38(3):172-175
- Kim HG, Park JW, Park SW. Experimental chronic ocular hypertension by anterior chamber injection of 0.3% carbomer solution in the rat. *Clin Experiment Ophthalmol* 2013;41(4):404-412
- 沈策英, 陈兰兰, 姜利斌. 前房注射聚苯乙烯微球诱导小鼠慢性高眼压研究. 中华实验眼科杂志 2014;32(4):292-297
- Moreno MC, Marcos HJ, Oscar Croxatto J, et al. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res* 2005;81(1):71-80
- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, et al. Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4337-4346
- Fortune B, Bui BV, Morrison JC, et al. Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1854-1862
- Libby RT, Anderson MG, Pang IH, et al. Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci* 2005;22(5):637-648
- Ben-Shlomo G, Bakalash S, Lambrou GN, et al. Pattern electroretinography in a rat model of ocular hypertension: functional evidence for early detection of inner retinal damage. *Exp Eye Res* 2005;81(3):340-349
- Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, et al. Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(7):3161-3177
- 党鸿, 辛晓蓉. 青光眼视神经损伤机制的研究进展. 眼科新进展 2016;36(7):680-683