

DL- α -AAA 诱发恒河猴特发性黄斑旁毛细血管扩张症

张君^{1,2}, 胡运韬¹, 马志中¹, 盛迅伦³

作者单位:¹(100083)中国北京市,北京大学眼科中心;²(750004)中国宁夏回族自治区银川市,宁夏医科大学附属医院眼科;³(050051)中国山东省青岛市开发区第一医院眼科

作者简介:张君,硕士研究生。

通讯作者:马志中,教授,博士生导师,副主任,研究方向:眼外伤、眼底病、玻璃体视网膜手术、视神经损伤、老年黄斑变性,主要成果:曾获得国家科技进步三等奖、军队科技进步二等奖等,发表论文87篇,现任国际眼外伤学会中国委员,中华眼科学会眼外伤整形学组组长,主编《玻璃体显微手术学》、《眼外伤手术》、《角膜手术》、《手术学全集》(眼科卷)、《外伤性视网膜脱离》、《玻璃体视网膜手术学》等。puh3_yk@bjmu.edu.cn

收稿日期:2009-12-29 修回日期:2010-01-14

Induction of idiopathic perifoveal telangiectasis by DL- α -AAA in rhesus monkeys

Jun Zhang^{1,2}, Yun-Tao Hu¹, Zhi-Zhong Ma¹, Xun-Lun Sheng³

¹Eye Center of Peking University, Beijing 100083, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ³Department of Ophthalmology, the First Hospital of Qingdao Development Zone, Qingdao 050051, Shandong Province, China

Correspondence to: Zhi-Zhong Ma. Eye Center of Peking University, Beijing 100083, China. puh3_yk@bjmu.edu.cn

Received:2009-12-29 Accepted:2010-01-14

Abstract

• AIM: Selective disturbance of macular Müller cells on the neural retina and retinal vasculature in non-human primates. Try to establish the animal model of idiopathic perifoveal telangiectasis (IPT).

• METHODS: Twelve rhesus monkeys (24 eyes) were divided into 6 groups randomly. In the former 3 groups, DL- α -aminoadipic acid (DL- α -AAA) solution 30 μ L of 5, 10, 50mmol/L were injected subretinally respectively, one eye for each rhesus monkey, as 3 experimental groups. The control groups were injected subretinally PBS 30 μ L in other eyes. In the later 3 groups, DL- α -AAA solution 100 μ L of 16, 50, 80mmol/L were injected intravitreally respectively, one eye for each rhesus monkey, as 3 experimental groups. The control groups were injected intravitreally PBS 100 μ L in other eyes. All eyes were examined by fundus color photography, fluorescein angiography, macular autofluorescence, optical coherence tomography (OCT), multifocal electroretinography (mfERG) and optical microscopy at 1st week before the operation and 6th, 12nd week after the operation.

• RESULTS: After 6th week of operation, IPT were happened in the groups of subretinal 5mmol/L, 10mmol/L

and the group of intravitreal 50mmol/L. In the same concentration groups, corresponding pathological changes were found by OCT and optical microscopy. The group of subretinal 50mmol/L and the group of intravitreal 80mmol/L response a more serious pathological changes, but IPT has not occurred in those groups.

• CONCLUSION: DL- α -AAA as an agent-specific interference of Müller cells in retina, the concentration between subretinal 5mmol/L to 10mmol/L and the concentration intravitreal 50mmol/L could induce IPT.

• KEYWORDS: rhesus monkeys; Müller cells; DL- α -AAA; IPT; subretinal injection

Zhang J, Hu YT, Ma ZZ, et al. Induction of idiopathic perifoveal telangiectasis by DL- α -AAA in rhesus monkeys. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(2):244-246

摘要

目的:选择性干扰黄斑区 Müller 细胞,试图建立特发性黄斑旁毛细血管扩张症(idiopathic perifoveal telangiectasis, IPT)动物模型。

方法:恒河猴12只随机分为6组,前3组单眼视网膜下注入 DL- α -AAA (DL- α -氨基己酸) 5, 10, 50mmol/L 30 μ L,后3组单眼玻璃体腔分别注入 DL- α -AAA 16, 50, 80mmol/L 100 μ L。术前1wk及术后6, 12wk行眼底彩色照相、荧光素眼底血管造影、黄斑自发荧光、光学相干断层成像(optical coherence tomography, OCT)、多焦视网膜电图(multifocal electroretinogram, mfERG)检测,并摘除眼球行光镜检查。

结果:视网膜下5, 10mmol/L DL- α -AAA及玻璃体腔50mmol/L DL- α -AAA,给药后6wk均出现IPT且OCT和光镜亦有相应病理改变;视网膜下50mmol/L DL- α -AAA,及玻璃体腔80mmol/L DL- α -AAA,病理损伤严重但未出现IPT。

结论:视网膜下5~10mmol/L DL- α -AAA、玻璃体腔50mmol/L DL- α -AAA均可诱发IPT。

关键词:恒河猴; Müller 细胞; DL- α -AAA; IPT; 视网膜下给药

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.02.014

张君,胡运韬,马志中,等. DL- α -AAA 诱发恒河猴特发性黄斑旁毛细血管扩张症. 国际眼科杂志 2010;10(2):244-246

0 引言

特发性黄斑旁毛细血管扩张症(idiopathic perifoveal telangiectasis, IPT)是一种罕见的潜在致盲性眼病^[1]。由于病源稀少又缺乏病因学的研究。IPT动物模型的创建,无疑成为攻克IPT的研究热点。通过近期研究,发现IPT最初的异常发生于视网膜的神经和胶质成分——Müller细胞^[2]。我们设想通过选择性干扰黄斑区 Müller 细胞以建立IPT动物模型,旨在为今后IPT的实验研究及临床研

究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 成年恒河猴 12 只, 体质量 6 ± 1.5 kg, 雌雄不限, 购自北京大学医学部动物实验中心。

1.2 方法 每只动物随机取单眼分成 6 组, 每组 2 眼。前 3 组视网膜下分别注入 5, 10, 50 mmol/L DL- α -AAA (sigma-aldrich) 30 μ L, 其余对侧眼视网膜下均注入 PBS 30 μ L 作为对照。后 3 组玻璃体腔内分别注入 16, 50, 80 mmol/L DL- α -AAA 100 μ L, 其余对侧眼玻璃体腔内均注入 PBS 100 μ L 作为对照。溶液以 PBS 配制。速眠新、盐酸氯胺酮 1:1 配比全身麻醉, 贝诺喜滴眼液表面麻醉。前 3 组复方托吡酰胺点眼以散大瞳孔, 于角膜缘后 2 mm 处, 颞上方进导纤维照明, 鼻上方进自制视网膜下注药系统, 将 DL- α -AAA 30 μ L 注入黄斑颞下方 2 CD 处, 对照组注入 PBS 30 μ L; 后 3 组于颞上方角膜缘后 2 mm 处 30 G 针头穿刺向玻璃体腔内注入 DL- α -AAA 100 μ L, 对照组注入 PBS 100 μ L。每组注液后均前房穿刺放出少许房水降低眼压至正常。每眼注药前 1 wk 和注药后 6, 12 wk 行眼底彩色照相、荧光素眼底血管造影、黄斑自发荧光、光学相干断层成像 (optical coherence tomography, OCT)、多焦视网膜电图 (multifocal electroretinogram, mfERG) 检测; 术后 12 wk 处死动物摘除眼球, 40 g/L 多聚甲醛溶液固定, 视网膜组织石蜡包埋, 切片 5 μ m HE 染色行光镜检查。

统计学分析: 用 SPSS 13.0 统计学软件对数据 (均值 \pm 标准差) 进行处理。

2 结果

所有实验猴眼均未发生眼内炎及玻璃体混浊。眼底彩色照相所有眼均无玻璃体积血, 但前 3 组有明显视网膜下浅脱离。视网膜下 5, 10 mmol/L 给药组光镜下可见外丛状层破坏明显; 50 mmol/L 组可见感光细胞层和外丛状层破坏明显 (图 1); 玻璃体腔 16 mmol/L 给药组未见明显异常; 50, 80 mmol/L 组感光细胞层和外丛状层破坏明显。

2.1 FFA 检查 各组均可见黄斑旁微血管瘤, 其中视网膜下 5, 10 mmol/L 给药组及玻璃体腔 50 mmol/L 给药组出现 IPT 表现 (图 2)。

2.2 OCT 检查 术后 12 wk 视网膜下药液被完全吸收。其中视网膜下 5 mmol/L 给药组可见小血管扩张; 10, 50 mmol/L 组可见轻微黄斑囊样扩张; 玻璃体腔 16 mmol/L 给药组未见明显异常; 50 mmol/L 组可见黄斑前膜 (图 3); 80 mmol/L 组可见小血管扩张。

2.3 mfERG 检查 各实验组黄斑区 b 波振幅的变化随术后时间的进展呈下降趋势 (图 4)。

3 讨论

特发性黄斑旁毛细血管症特征表现为视网膜透明度下降和黄斑旁血管异常。由于 IPT 具有潜在的致盲性且相关研究较少, 吸引了众多眼科研究者。近年来, 通过高速血管造影、OCT 和组织病理学对该研究的应用, IPT 血管异常的本质及其对黄斑区的影响已有了更为深刻的了解^[1-4]。发现 Müller 细胞功能的异常优先于毛细血管内皮细胞变性。Müller 细胞有 5 个主要功能: (1) 神经元支架; (2) 神经元代谢; (3) 视觉形成; (4) 维持细胞外机制的稳态; (5) 调节视网膜血管发生^[5-10]。这 5 个功能无一不与 IPT 的病理过程相关。依据该原理, 对 Müller 细胞进行选择性的干扰, 人们得到了视网膜上毛细血管扩张的动物

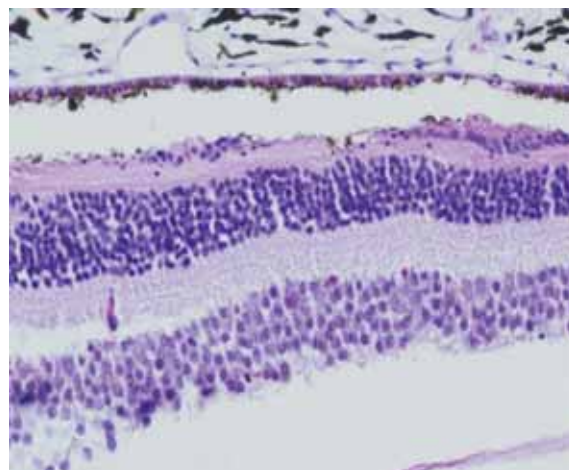


图 1 视网膜下注入 DL- α -AAA 后外核层及感光细胞层破坏明显 (HE $\times 800$)。

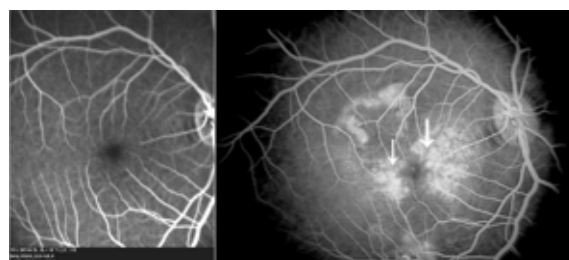


图 2 玻璃体腔注入 DL- α -AAA 后可见黄斑旁荧光渗漏 (箭头所示为渗漏的扩张血管)。

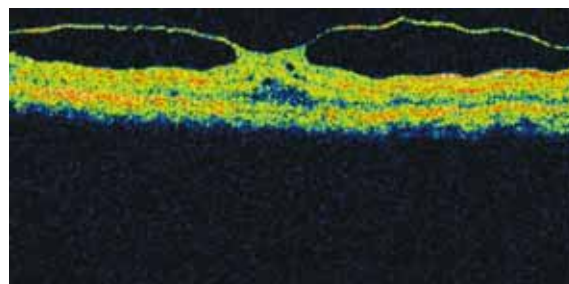


图 3 玻璃体腔注入 DL- α -AAA 后可见黄斑前膜和黄斑囊样扩张。

模型, 但研究的实验动物多为不具有黄斑的哺乳类, 因此该模型亦无法称其为 IPT 模型。我们依据前人的经验, 将动物模型设计在具有黄斑的灵长类动物——恒河猴身上。为了使扩张的毛细血管定位于黄斑旁, 我们运用一套自制的给药体系于黄斑旁进行视网膜下给药, 以提高黄斑旁药物的持续浓度。并选用玻璃体给药及空白药液进行对照。由于视网膜下给药与玻璃体腔给药相比, 药物不易扩散且更易作用于胶原细胞, 因此玻璃体腔给药提高了相对浓度与相对量。我们发现: (1) 视网膜下给药和玻璃体腔给药均可引起定位于黄斑旁的毛细血管扩张; (2) 无论何种给药方式均会引起电生理中 b 波振幅的降低; (3) FFA 中视网膜下 5, 10 mmol/L 和玻璃体腔 50 mmol/L 给药组均出现黄斑旁扩张的毛细血管; (4) OCT 中毛细血管扩张和黄斑囊样扩张均为 IPT 的特征性表现, 支持了视网膜下 5, 10 mmol/L 和玻璃体腔 16, 50 mmol/L 给药组中 FFA 的表现。其中视网膜下 50 mmol/L 组出现囊样扩张但 FFA 中并无相关表现, 可能由于浓度过高引起组织破坏严重, 使得该微环境不适合毛细血管发生扩张病变; 玻璃体腔 80 mmol/L 组扩张小血管不能在 FFA 中表现, 可能由于扩

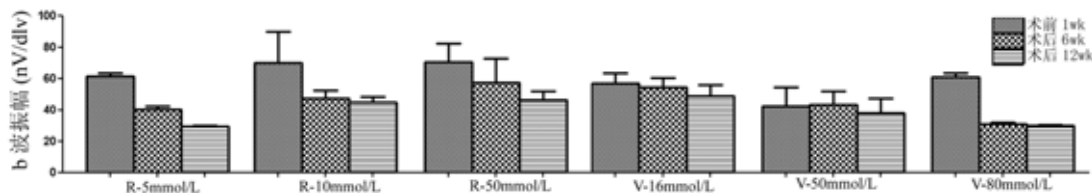


图4 各实验组黄斑区 b 波振幅变化。

张的小血管被药物毒性所损伤,仅残留下血管和填充红细胞的痕迹,失去供血功能,造成 FFA 中无表现;(5)光镜中外丛状层破坏可能是由于 Müller 细胞这一神经支架受损所引起,也支持了视网膜下 5,10mmol/L 组和玻璃体腔 16,50mmol/L 组中 FFA 的表现。其中视网膜下 50mmol/L 组和玻璃体腔 80mmol/L 组在外丛状层破坏的同时还表现出了感光细胞层的严重破坏,说明药物浓度与组织破坏程度成正比;(6)无论何种给药方式术后 6wk 和 12wk 未见显著差异。

分析视网膜下 5,10mmol/L 组和玻璃体腔 50mmol/L 组的结果,可能是由于 DL- α -AAA 恰好达到破坏 Müller 细胞的浓度且尚未引起其他组织损伤,能诱发 IPT;玻璃体腔 16mmol/L 组,浓度过低尚不能引起 Müller 细胞损伤,无法诱发 IPT;而视网膜下 50mmol/L 组和玻璃体腔 80mmol/L 组可能由于浓度过高,破坏了诱发 IPT 的其他微环境,也无法诱发 IPT。综上所述,我们推论:(1)通过 DL- α -AAA 选择性干扰 Müller 细胞可以创建 IPT 模型;(2)无论何种给药方式,在干扰了 Müller 细胞又不严重破坏其微环境的前提下,可诱发 IPT;(3)IPT 的诱发均会伴有视敏度的降低;(4)浓度过高或过低均无法诱发 IPT。该结果可为今后实验研究乃至临床研究提供一定依据。但由于本实验样本例数少,缺乏统计学意义,所得结果仍需后续大样本量进行证实。

参考文献

1 Axer-Siegel R, Bourla D, Priel E, et al. Angiographic and flow pat-

terns of retinal choroidal anastomoses in age-related macular degeneration with occult choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2002;109:1726-1736

2 Voo I, Mavrofrides EC, Puliafito CA. Clinical applications of optical coherence tomography for the diagnosis and management of macular diseases. *Ophthalmol Clin North Am* 2004;17(1):21-31

3 Davidorf FH, Pressman MD, Chambers RB. Juxtafoveal telangiectasis; a name change? *Retina* 2004;24(3):474-478

4 Lawrence A, Yannuzzi MD, Anne MC, et al. Idiopathic Macular Telangiectasia. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(4):450-460

5 Milenkovic I, Weick M, Wiedemann P, et al. P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1211-1220

6 Yafai Y, Iandiev I, Wiedemann P, et al. Retinal endothelial angiogenic activity: effects of hypoxia and glial (Müller) cells. *Microcirculation* 2004;11:577-586

7 Eichler W, Yafai Y, Keller T, et al. PEDF derived from glial Müller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* 2004; 299(1):68-78

8 Tretiach M, Madigan MC, Wen L, et al. Effect of Müller cell co-culture on *in vitro* permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions. *Neurosci Lett* 2005;378(3):160-165

9 Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, et al. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest* 2005;85:597-607

10 Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(4):397-424