

# 离焦诱导豚鼠近视眼视网膜超微结构及凋亡研究

赵宏伟<sup>1</sup>, 梁静南<sup>2</sup>, 罗灵<sup>1</sup>, 聂闯<sup>3</sup>, 白凤华<sup>1</sup>, 刘怡<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(100101)中国北京市,解放军第306医院眼科;  
<sup>2</sup>(100101)中国北京市,中国科学院微生物研究所;<sup>3</sup>(100853)  
中国北京市,解放军第301医院

作者简介:赵宏伟,在读解放军总医院眼科博士,主治医师,研  
究方向:青少年近视眼、斜弱视防治、近视眼准分子激光手术。

通讯作者:刘怡,硕士研究生,主任医师,研究方向:青少年近视  
眼、斜弱视防治、近视眼准分子激光手术、近视眼基础研究。

liuyi\_oph@126.com

收稿日期:2014-06-18 修回日期:2014-10-27

## Retinal apoptosis and ultrastructural features of defocus-induced myopia in guinea pigs

Hong-Wei Zhao<sup>1</sup>, Jing-Nan Liang<sup>2</sup>, Ling Luo<sup>1</sup>,  
Chuang Nie<sup>3</sup>, Feng-Hua Bai<sup>1</sup>, Yi Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the 306<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China; <sup>2</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China; <sup>3</sup>the 301<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Yi Liu. Department of Ophthalmology, the 306<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China. liuyi\_oph@126.com

Received:2014-06-18 Accepted:2014-10-27

### Abstract

• AIM: To observe retinal ultrastructural features and retinal cell apoptosis of defocus induced myopia in guinea pigs.

• METHODS: Thirty guinea pigs (3-wk old) were received -10.00D rigid contact lenses (RGP) on the right eye and without wearing glasses on the left eye. Diopter change with cycloplegic retinoscopy, ultrastructural features of the retina with transmission electron microscopy were observed, the apoptosis of retinal cell by TUNEL immunofluorescence staining after 3wk were detected.

• RESULTS: Eye diopter difference was 3.28±0.21D in the right eye and 1.55±0.23D in the left eye before and after induction. There was significantly statistical difference ( $P<0.01$ ); Retinal ultrastructural features were showed with transmission electron microscopy (TEM) the retinal disk membranes edema, some shedding, mitochondrial swelling and deformation, small amount of vacuolar changes in the inner and outer nuclear layer cells. Some characteristics of apoptosis were also be seen such as cell membrane irregular contractions, irregular nuclear chromatin aggregation. The incidence

of retinal cell apoptosis was (2.42±1.24)% in the right eye and (0.29±0.08)% in the left eye after induction. There was significantly statistical difference ( $P<0.01$ ).

• CONCLUSION: Accompanied by abnormal apoptosis of retinal cells during the formation of defocus-induced myopia in guinea pigs.

• KEYWORDS: defocus-induced; guinea pigs; myopia; retinal ultrastructural features; apoptosis

Citation: Zhao HW, Liang JN, Luo L, et al. Retinal apoptosis and ultrastructural features of defocus-induced myopia in guinea pigs. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(11):1946-1949

### 摘要

目的:观察离焦诱导豚鼠近视眼视网膜超微结构特征及凋亡情况。

方法:将30只3周龄的三色豚鼠用-10.00D硬性角膜接触镜(rigid gas permeable contact lens,RGP)对右眼进行离焦诱导,左眼不戴镜。3wk后散瞳检影观察屈光度变化;电子透射显微镜观察视网膜超微结构特征;TUNEL免疫荧光染色检测视网膜细胞凋亡情况。

结果:右眼诱导前后屈光度差值为3.28±0.21D,左眼为1.55±0.23D,二者比较差异有显著统计学意义( $P<0.01$ );电镜结果显示,3wk后诱导眼视网膜可见膜盘结构的水肿,部分脱落;线粒体肿胀变形,部分空泡化;内外核层细胞膜不规则收缩,核染色质不规则聚集等凋亡特征;TUNEL免疫荧光染色显示诱导眼视网膜细胞凋亡发生率为(2.42±1.24)%,对照眼为(0.29±0.08)%,二者比较差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )。

结论:在离焦诱导的豚鼠近视眼的形成过程中伴随着视网膜细胞的异常凋亡。

关键词:离焦诱导;豚鼠;近视眼;视网膜超微结构;凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.11.08

引用:赵宏伟,梁静南,罗灵,等.离焦诱导豚鼠近视眼视网膜超微结构及凋亡研究.国际眼科杂志2014;14(11):1946-1949

### 0 引言

细胞凋亡是许多视网膜疾病的重要病理环节。有研究表明,在剥夺型近视的发生过程中伴随有视网膜细胞的异常凋亡<sup>[1,2]</sup>。但人类发生形觉剥夺型近视较少,而离焦诱导型近视被认为更接近于人类青少年近视的发生,其主要思想是:光感受器接受离焦光线的信号刺激后,启动局部视网膜生长调节信号通路,通过视网膜和脉络膜的级联放大效应,最终引起靶组织巩膜的改变和眼轴延长,近视眼从而得以发生、发展。而有关离焦诱导近视眼模型中视网膜细胞凋亡的研究报告较少,我们针对离焦

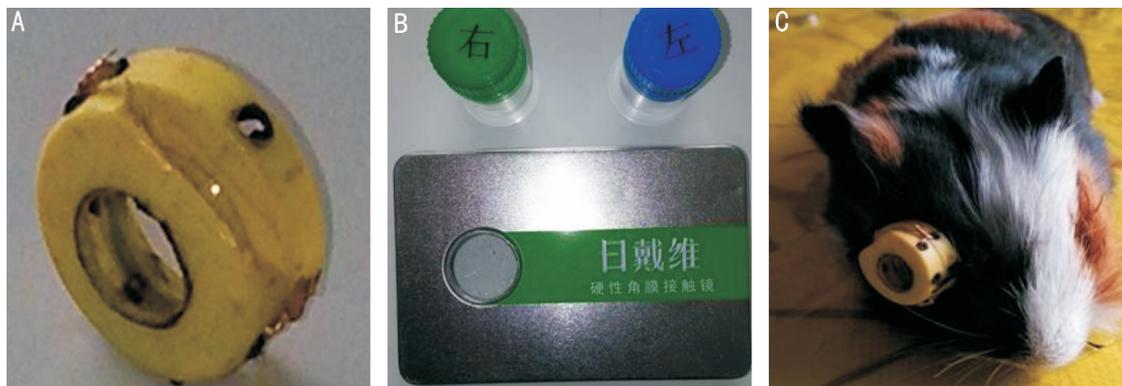


图1 镜片、固定装置和模型示意图 A:可装载RGP的固定装置;B:由欧普康视公司定做的RGP;C:戴RGP后的豚鼠。

诱导形成近视后视网膜超微结构和凋亡检测结果作如下报告。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 左右三色豚鼠30只,3周龄,购自河北医科大学。右眼戴镜,为诱导眼;左眼不戴镜,为对照眼。右眼采用眼睑缝合法固定自行设计的装有负镜硬性角膜接触镜(rigid gas permeable contact lens, RGP)的离焦装置(图1A)。

**1.1.2 镜片及固定装置** RGP由欧普康视公司定做:总直径为10.00mm,光学区直径为8.4mm,厚度为0.16mm,精确屈光度为-9.82D(图1B)。镜片固定装置为自行设计的双层子母扣。制作方法为:将一胰岛素瓶盖以约弦长10mm截除,与另一枚重叠后行缝线固定,形成可从外侧弦置入RGP的双层子母扣,扣中央预制直径约8mm的采光孔(图1C)。

**1.1.3 主要仪器及试剂** 眼科A超仪,带状光检影镜及镜片箱,冰冻切片机,透射电镜(中国科学院微生物研究所),TUNEL荧光染色试剂盒(美国Biotium公司,货号:30063)。

### 1.2 方法

**1.2.1 离焦近视眼模型建立** 将豚鼠标记编号后双眼滴2.5g/L托吡卡胺眼液6次以麻痹睫状肌,1h后待瞳孔充分散大,由同一验光师进行暗室内视网膜检影验光,每只眼检影3次,取平均值为屈光度数,有散光者用等效球镜表示。检影结束后用100mL/L水合氯醛全身麻醉下无菌操作,将装有镜片的固定装置缝合于豚鼠实验眼前的上下眼睑和内外眦皮肤上。实验期间每天用镜片护理液清洁镜片,必要时取出镜片清洁后再重新置入,尽量减少镜片不洁造成的形觉剥夺效应。实验3wk后按上述方法再次采集屈光度数据。

**1.2.2 电镜观察豚鼠视网膜超微结构特征** 实验3wk后取5只豚鼠100mL/L水合氯醛过量麻醉致死,显微镜下摘除眼球,角膜穿孔后置于25mL/L戊二醛溶液中2h,显微镜下剪除巩膜外组织,角膜缘切口,取出晶状体和玻璃体,制作约1mm×1mm眼球壁组织块,25mL/L戊二醛溶液4℃冰箱固定24h后,10g/L锇酸固定2h,丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋,修块定位,超薄切片(厚约500μm),醋酸铀、硝酸铅双重染色,透射电镜观察拍片。

**1.2.3 制备冰冻切片** 实验3wk后25只豚鼠行100mL/L水合氯醛过量后麻醉致死,显微镜下摘除眼球,角膜穿孔后置于40g/L多聚甲醛溶液中2h,显微镜下剪除巩膜外

表1 透镜诱导前后屈光度差值比较 ( $\bar{x} \pm s, D$ )

眼别	眼数	诱导前	诱导后	差值
右眼	30	4.34±0.24	1.05±0.18	3.28±0.21 <sup>b</sup>
左眼	30	4.32±0.22	2.77±0.21	1.55±0.23

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 左眼。

组织,置入4℃150g/L蔗糖溶液中约1h,沉底后取出再置入300g/L蔗糖溶液,4℃冰箱过夜。第2d取出眼球后用滤纸吸干表面蔗糖溶液后用OCT包埋液包埋,待组织浸没并排尽气泡后用液氮速冻,-20℃冰冻切片机切片,厚度为10μm。切片-20℃冰箱保存。

### 1.2.4 TUNEL 荧光染色检测豚鼠视网膜细胞凋亡情况

将1μL TdT酶加入到50μL TUNEL Reaction Buffer中制成TUNEL reaction mix。PBS清洗冰冻切片2次;用100μL TUNEL Equilibration Buffer(Component 99965)孵育5min;每个样品添加50μL TUNEL reaction mix;对不含TdT酶的阴性对照样品,添加不含TdT酶的TUNEL reaction buffer;37℃孵育2h;用含1mL/L Triton X-100和5g/L BSA的PBS缓冲液清洗;荧光显微镜下观察结果。每张片子在×200倍荧光显微镜下随机选取3个视野,记录该视野下所有的细胞数量和凋亡细胞的数量,取平均值。凋亡细胞核被染成亮绿色荧光,而未用TdT酶处理的样品观察不到染色。

统计学分析:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用CHISS软件对屈光度数据和凋亡率进行配对资料 $t$ 检验,检验水准规定为 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 豚鼠屈光度变化** 经过3wk的透镜诱导,实验眼屈光度发生3.28±0.21D的相对性近视改变,而对照眼只产生1.55±0.23D的相对性近视改变,二者差异有统计学意义( $t = 30.424, P = 0.0000$ ,表1)。

**2.2 豚鼠视网膜超微结构变化** 透镜诱导3wk后视网膜超微结构发生病理性变化,可见诱导视网膜膜盘的轻度水肿,部分脱落;线粒体肿胀变形;内外核层细胞及色素上皮细胞的少量空泡样改变,细胞膜不规则收缩,核染色质不规则聚集等(图2)。

**2.3 豚鼠视网膜细胞凋亡情况** 实验3wk后,诱导视网膜内外核层细胞凋亡发生率为(2.42±1.24)%,对照眼为(0.29±0.08)%,二者比较有显著统计学差异( $t = 8.571, P = 0.0000$ ,图3)。

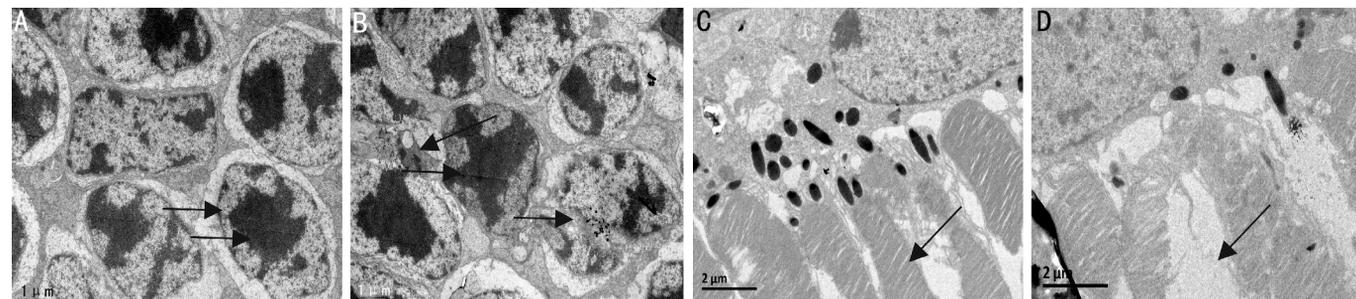


图2 对照眼和离焦眼的视网膜超微结构比较(TEM) A:对照眼( $\times 4500$ ),视网膜内核层细胞膜光滑完整,染色质均匀;B:离焦眼( $\times 4500$ ),视网膜内核层细胞膜不规则收缩,不完整,核染色质不规则边集,线粒体肿胀变形,部分空泡样改变;C:对照眼( $\times 3000$ ),视网膜膜盘排列整齐,紧密;D:离焦眼( $\times 3000$ ),视网膜内膜盘水肿,部分脱落,间隙明显增宽。

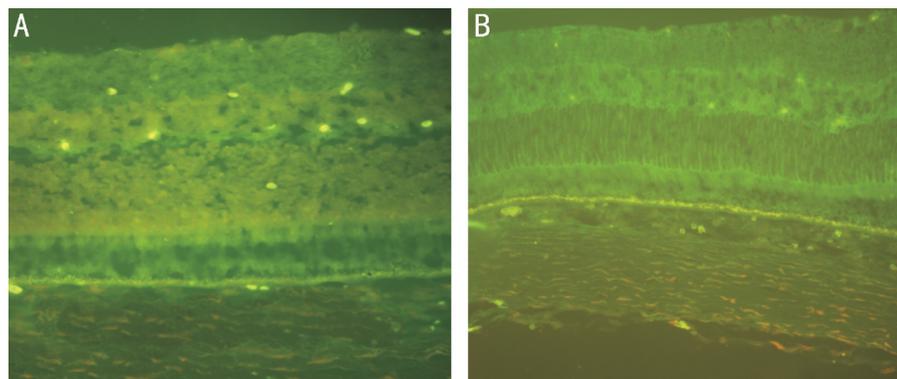


图3 离焦眼和对照眼 TUNEL 荧光染色比较( $\times 200$ ) A:离焦眼视网膜凋亡细胞胞核被染成亮绿色荧光;B:对照眼视网膜凋亡细胞胞核未见明显亮绿色荧光。

### 3 讨论

视网膜上某些神经元细胞调控着眼球正常的生长发育<sup>[3]</sup>。这些细胞的异常凋亡很可能破坏了眼球的生长调控机制,尤其是巩膜纤维细胞的异常凋亡,成为眼球变软、眼轴延长的重要原因。徐格致等早在1996年就发现<sup>[4]</sup>,人的病理性近视视网膜感光细胞存在异常的细胞凋亡,提出了高度近视眼的抗凋亡治疗思路。此后关于近视眼的视网膜细胞凋亡研究多数集中于形觉剥夺型近视模型。文丹等<sup>[1]</sup>对雏鸡行形觉剥夺12wk,发现视网膜细胞凋亡发生率为4.42%,而对照组仅为0.35%,视网膜细胞凋亡主要发生于内外核层。李秀娟等<sup>[2]</sup>也用形觉剥夺雏鸡遮盖7d后发现视网膜细胞凋亡主要分布于内核层和节细胞层,遮盖眼内核层细胞平均细胞凋亡数达到14%,对照组只有5.9%,是对照组的2倍多;视网膜节细胞层平均细胞凋亡数达4.7%,而对照组为2.8%。Liang等<sup>[5]</sup>对鸡形觉剥夺近视眼视网膜超微结构研究发现:视网膜较对侧眼薄,视锥细胞外节膜盘出现变性和紊乱,视杆细胞外节变长。在对猴眼的两种近视眼模型对比中也发现了类似变化,并发现两种近视模型在视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)均可以导致RPE排列紊乱,胞质内吞噬体减少<sup>[6]</sup>。而在豚鼠的形觉剥夺型近视视网膜超微结构显示<sup>[7]</sup>:视网膜膜盘的有不同程度的水肿和脱落、线粒体肿胀变形以及空泡样改变、染色质边聚等细胞凋亡特征。

以上研究显示,在形觉剥夺型近视眼发生过程中伴随有视网膜细胞的异常凋亡。而在人类发生形觉剥夺型近视眼较为少见。有学者认为,形觉剥夺型近视和离焦诱导

型近视的病理变化并没有明显不同<sup>[8]</sup>。但多数学者还是认为二者有所不同,离焦诱导的近视眼更接近人类青少年近视眼的发生。因此,在离焦诱导的近视眼模型上研究视网膜细胞凋亡意义更大。在既往关于离焦诱导的近视眼研究中显示<sup>[9]</sup>,透镜离焦诱导可致RPE细胞的增殖抑制(在后极部更为明显)和RPE钙离子内流<sup>[10]</sup>,而后者是细胞凋亡的重要因素。但对于离焦诱导豚鼠近视眼的视网膜超微结构及视网膜细胞凋亡的报道较为少见。

有研究发现,豚鼠视觉发育过程中其正视化过程更接近于灵长类动物和人,过程为9~11wk,在3wk左右的豚鼠相当于人类2岁,在对豚鼠进行离焦诱导过程中诱导初期的2~10d效果最明显,之后诱导效果明显下降<sup>[11,12]</sup>。因此,本实验选择了3周龄大小的豚鼠作为研究对象,时间节点选择在了诱导后3wk。结果显示:3wk后豚鼠的自然正视化过程产生相对 $1.55 \pm 0.23D$ 的近视,而负镜诱导后产生 $3.28 \pm 0.21D$ 的近视,二者差异有显著的统计学意义( $P < 0.01$ )。实验证实, $-10.00D$ 透镜成功诱导了近视眼的发生。

本实验对诱导眼电镜观察结果显示:在诱导3wk后,诱导眼视网膜内外核细胞层发现了异常的视网膜细胞凋亡特征。视网膜膜盘的轻度水肿,部分脱落;线粒体肿胀变形;内外核层细胞及色素上皮细胞的少量空泡样改变,细胞膜不规则收缩,核染色质不规则聚集等。进一步采用TUNEL荧光染色技术检测了视网膜细胞的凋亡情况,结果诱导眼视网膜细胞凋亡发生率为2.42%,对照组仅为0.29%,两者比较有显著统计学差异( $P < 0.01$ )。该结果与国内研究结果略有不同,考虑和动物种属、模型的建立

方式以及模型建立时间等因素有关。

因为当近视眼加深(眼轴延长)后,机械性压力可以引起近视眼发展过程中 RPE 细胞  $\text{Ca}^{2+}$  内流特征明显,且电压依赖性、受体介导型、牵张敏感型  $\text{Ca}^{2+}$  通道均发挥作用<sup>[13-15]</sup>。当细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度过度升高时,可以活化多种酶,分泌多种细胞因子,耗竭 ATP,产生自由基,导致细胞多种成分破坏,诱发细胞凋亡。另外,近视眼的发生过程中存在复杂的生化信号的网络交互影响,视网膜细胞的异常凋亡在其中的作用知之甚少。因此,本研究结果认为离焦诱导的近视眼发生过程中伴随有视网膜细胞的异常凋亡,但不能认为视网膜细胞的凋亡是近视眼形成过程中的促进因素,还是由于近视眼发生后的结果或伴随因素。我们将在后续的研究中进一步对视网膜细胞凋亡的关键酶及其抑制剂进行深入研究,以对回答以上问题有所帮助。

#### 参考文献

- 1 文丹,刘双珍,毛俊峰,等. 形觉剥夺性近视视网膜细胞的凋亡及 c-myc 的表达. 中南大学学报 2006;31(2):236-240
- 2 李秀娟,张金嵩. 形觉剥夺性近视鸡眼细胞凋亡情况观察. 郑州大学学报(医学版) 2008;43(6):1183-1185
- 3 Filik H, Hayvali M, Kiliç E, et al. Development of an optical fibre reflectance sensor for p-aminophenol detection based on immobilized bis-8-hydroxyquinoline. *Talanta* 2008;77(1):103-109
- 4 Xu GZ, Li WW, Tso MO. Apoptosis in human retinal degenerations. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1996;94:411-430
- 5 Liang H, Crewther DP, Crewther SG, et al. A role for photoreceptor

- outer segments in the induction of deprivation myopia. *Vision Res* 1995;35(9):1217-1225
- 6 钟兴武,葛坚,陈晓莲,等. 猴光学离焦性与型觉剥夺性近视眼视网膜形态及超微结构比较. 中华眼科杂志 2005;41(7):625-630
- 7 文丹,刘双珍,毛俊峰. 近视豚鼠视网膜超微结构改变及环磷酸鸟苷的表达. 中南大学学报 2011;36(3):249-253
- 8 Xiao H, Fan ZY, Tian XD, et al. Comparison of form-deprived myopia and lens-induced myopia in guinea pigs. *Int J Ophthalmol* 2014;7(2):245-250
- 9 陈博宇,王超英,安慧琴. 等. 早期实验性近视眼视网膜色素上皮细胞的培养及超微结构变化的研究. 成都中医药大学学报 2011;34(3):32-35
- 10 仝春梅,王超英,王彩荣. 豚鼠透镜诱导型近视视网膜色素上皮钙离子的研究. 眼科研究 2010;28(10):927-930
- 11 王瑞卿. 正常幼年豚鼠视觉发育的正规化过程研究. 温州医学院学位论文 2005
- 12 傅亚娜. 豚鼠离焦性近视的早期和恢复期生物学参数的研究. 温州医学院学位论文 2008
- 13 Reichhart N1, Milenkovic VM, Halsband CA, et al. Effect of bestrophin-1 on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity depends on the  $\text{Ca}^{2+}$  channel beta-subunit. *Exp Eye Res* 2010;91(5):630-639
- 14 Adijanto J, Banzon T, Jalickee S, et al.  $\text{CO}_2$ -induced ion and fluid transport in human retinal pigment epithelium. *J Gen Physiol* 2009;133(6):603-622
- 15 Wimmers S, Halsband C, Seyler S, et al. Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels, not ryanodine receptors, activate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent BK potassium channels in human retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 2008;14:2340-2348