

17 β -雌二醇抗 BALB/c 与 C57BL/6 小鼠视网膜光照损伤的比较

李红波,刘鑫宇,钟 华,姬佳彤,方佳妮,李炳武,尚雯婕,李晓楠

引用:李红波,刘鑫宇,钟华,等. 17 β -雌二醇抗 BALB/c 与 C57BL/6 小鼠视网膜光照损伤的比较. 国际眼科杂志 2023; 23(10):1609-1616

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81501067);西安医学院 2022 年大学生创新创业训练项目(No.121522028);西安医学院 2023 年大学生创新创业训练项目(No.121523058)

作者单位:(710021)中国陕西省西安市,西安医学院

作者简介:李红波,博士,副教授,研究方向:糖尿病及神经退行性疾病分子机制。

通讯作者:李红波. dancy1225@163.com

收稿日期:2022-10-24 修回日期:2023-08-25

摘要

目的:通过建立 BALB/c 与 C57BL/6 小鼠视网膜光损伤模型,研究 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)的视网膜神经保护作用,为成功构建 E2 抗视网膜光损伤模型提供实验数据。

方法:成年雌性 BALB/c、C57BL/6 小鼠各 40~45 只,实验分组如下:正常对照组,去势手术对照组,去势光照组(小鼠去势手术 14d 后进行持续 10000lx 白光光照刺激 4、8、12、16、24h 组),玻璃体腔注射假手术组,生理盐水组和 E2 预处理组(去势手术 14d 后暗适应 24h 后分别行玻璃体腔注射 2 μ L 生理盐水或 10⁻⁵mol/L E2),每组各 6 只。通过石蜡切片 HE 染色、TUNEL 染色、视网膜电图检测视网膜形态及功能变化。

结果:去势光损组视网膜内核层/外核层厚度从白光 10000lx 光照 4h 组开始显著减小;玻璃体腔注射 E2 预处理可显著抑制两种品系小鼠视网膜各层细胞的凋亡($P<0.01$)以及 C57BL/6 小鼠视网膜电图检测中最大混合反应 a 波和 b 波波幅的下降($P<0.05$)。

结论:相同光照条件对两种品系小鼠光损敏感性存在差异;E2 对 BALB/c 小鼠无论是视网膜形态学及功能学上都产生了保护作用,而对 C57BL/6 小鼠功能学保护作用显著。

关键词:视网膜光损伤模型;BALB/c 小鼠;C57BL/6 小鼠;17 β -雌二醇

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.10.02

Comparison of 17 β - estradiol against retinal light damage in BALB/c or C57BL/6 mice

Hong-Bo Li, Xin-Yu Liu, Hua Zhong, Jia-Tong Ji, Jia-Ni Fang, Bing-Wu Li, Wen-Jie Shang, Xiao-Nan Li

Foundation items: The National Natural Science Foundation of China (No. 81501067); College Students' Innovation and

Entrepreneurship Training Program of Xi'an Medical University in 2022 (No. 121522028); College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Xi'an Medical University in 2023 (No.121523058)

Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hong-Bo Li. Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China. dancy1225@163.com

Received:2022-10-24 Accepted:2023-08-25

Abstract

• AIM: To investigate the neuroprotective effect of 17 β -estradiol (E2) on retina light damage in BALB/c and C57BL/6 mice and provide experimental data for the successful construction of a research model for E2 against retinal light damage.

• METHODS: Totally 40 ~ 45 adult female BALB/c or C57BL/6 mice were divided into six groups, 6 for each group: normal control, ovariectomized control, ovariectomized light (mice were stimulated with continuous white light at 10000 lx for 4, 8, 12, 16, and 24h after 14d of ovariectomy), intravitreal administration sham operation, saline and E2 pre-treatment groups (2 μ L saline or 10⁻⁵ mol/L E2 were intravitreal injected respectively after 14d of ovariectomy operation and 24h of dark adaptation). The morphological and functional changes of the retina were detected by paraffin section HE staining, TUNEL staining and electroretinogram.

• RESULTS: In the ovariectomized light group, the thickness of the inner/outer nuclear layer decreased significantly from the 4h stimulation of 10000 lx white light group. Intravitreal administration of E2 significantly inhibited the apoptosis of retinal cells in the two strains of mice ($P<0.01$) and the decrease of amplitudes of a- and b-waves in max-ERG of C57BL/6 mice ($P<0.05$).

• CONCLUSION: The light loss sensitivity of two strains of mice was different under the same light stimulation. E2 had a protective effect on both morphology and function of the retina in BALB/c mice, and had a significant protective effect on retina function in C57BL/6 mice.

• KEYWORDS: retina light damage model; BALB/c mice; C57BL/6 mice; 17 β -estradiol

Citation: Li HB, Liu XY, Zhong H, et al. Comparison of 17 β -estradiol against retinal light damage in BALB/c or C57BL/6 mice. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(10):1609-1616

0 引言

随着电子产品使用频率增加和照明设备的多样化普及,长时间光照射所引起的视网膜光损伤(light-induced retinal damage, LIRD)不断发生。目前,LIRD 具体的发病机制尚未系统阐述。研究表明,过量光照造成的光损伤可介导线粒体裂变导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)大量产生、小胶质细胞活化以及 NLRP3 炎性小体形成,造成视网膜结构改变和视觉功能损伤^[1]。年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)是临床上常见的视网膜神经退行性疾病,大多数情况下表现为萎缩性 ARMD,其特征主要为视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞和光感受器细胞的缓慢变性;另外一部分表现为新生血管性 ARMD,其特征是脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)导致视网膜脱离和失明^[2]。光损伤的病理过程与 ARMD 及视网膜色素变性等疾病存在较多相似之处,所以对 LIRD 作用及其机制的深入研究有着重要的临床和理论价值。考虑到临床试验的限制性以及药物诱导神经退行性模型的不稳定性,目前各类研究中常通过构建大鼠 LIRD 模型用以研究神经退行性疾病的发生机制和治疗方法。不同品系大鼠的视网膜对光照损伤的敏感性不同。17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)是人体内循环最丰富也是活性最强的雌激素,被认为是中枢神经系统的神经保护剂。目前大量的相关研究均观察到 E2 在视网膜中的神经保护作用,但具体分子机制有待研究。本实验采用成年雌性去势 BALB/c 与 C57BL/6 小鼠构建 LIRD 模型,探究小鼠 LIRD 模型的构建条件,比较两种常见的具有代表性的品系小鼠视网膜对光照损伤的差异,为成功构建小鼠 LIRD 模型提供实验数据,并在上述两种小鼠品系光损动物模型的基础上,进一步通过 E2 玻璃体腔注射预处理建立 E2 抗视网膜光照诱导的氧化应激(oxidative stress, OS)损伤的保护模型,为后续深入开展 E2 抗视网膜光照诱导的 OS 损伤的神经保护作用机制的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 每批次实验根据具体实验分组所需小鼠的数量选择正常成年雌性 8 周龄 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠各 40~45 只(购于西安交通大学医学部 SPF 级实验动物中心)。观察所有小鼠体型适中,精神状态良好,眼球正常无晶状体混浊,排除角膜炎、白内障等眼部疾病后将纳入实验的各品系正常小鼠随机分组,每组 6 只。BALB/c 小鼠 LIRD 模型实验分组如下:正常组(normal control, NC),去势手术对照组(ovariectomized control, OC),去势光损组(ovariectomized light, O-Light);根据光照时间分为:去势光照 4h 组(O-light 4h),去势光照 8h 组(O-light 8h),去势光照 12h 组(O-light 12h),去势光照 16h 组(O-light 16h)。C57BL/6 小鼠 LIRD 模型实验分组如下:正常组,去势手术对照组,去势光照 4h 组,去势光照 8h 组,去势光照 12h 组,去势光照 16h 组,去势光照 24h 组。E2 预保护实验分组如下:正常组,去势手术对照组,去势光损组;小鼠去势手术 14d 后进行持续 10000lx 白光

光照刺激 12h,假手术对照(ovariectomized lightdamaged-shamecontrol, OI-Shame)组;去势手术 14d 后暗适应 24h 后行玻璃体腔注射假手术,生理盐水组(ovariectomized lightdamaged-saline intravitreal injection, OI-Saline);去势手术后暗适应 24h 再行玻璃体腔注射 2 μ L 生理盐水, E2 预处理组(ovariectomized light damaged-E2 intravitreal injection, OI-E2);去势手术后暗适应 24h 再行玻璃体腔注射 10⁻⁵ mol/L E2 2 μ L。本实验所涉及的动物处理过程得到西安医学院动物伦理委员会批准,并符合公认的研究动物伦理标准和视觉与眼科学研究协会关于动物使用的声明。

1.2 方法

1.2.1 去势手术 去势组小鼠异氟烷气体麻醉后进行摘除卵巢的去势手术。小鼠背部髂关节连线上指,于背部后正中中线旁左右,备皮,充分暴露手术视野,在无菌条件下,向下做纵行切口约 0.5~1cm,依次剪开皮肤,筋膜层,肌肉,找到卵巢后,在子宫末端与卵巢之间手术线结扎后将卵巢全部切除,缝合肌肉层和皮肤,消毒清理手术切口。术后将小鼠置于无菌垫料笼内,并在小鼠身下垫无菌棉纱布保温,防止小鼠在麻醉中失温死亡。在温暖干净通风处待苏醒。术后 3d 密切观察皮肤切口及小鼠精神状态及进食进水情况,预防感染。待小鼠苏醒能正常活动后转入饲养单元饲养 2wk,充分代谢体内残余雌激素。

1.2.2 建立光损模型 本实验所采用的光损实验装置为本实验小组依照严格的设计标准进行研发,并已获批实用新型专利证书(ZL 2018 2 1068693. 8)。光照强度范围为 1000~10000lx。光源采用三基色 LED 灯,光线直接照射在装置底部,可分为 8 档对光照强度进行调节。本实验采用 10000lx 照度。实验小鼠可在实验装置动物笼内自由饮食、活动,通过实验装置外部温度调节及装置内部通风设施以保持光照刺激期间装置内温度维持在 24 $^{\circ}$ C。光照刺激实验前将小鼠放入暗室中暗适应 24h,以增强小鼠视网膜对光照刺激的敏感性,之后根据实验分组进行不同时间的光照刺激,光照刺激实验结束后立即将小鼠放入暗室中暗恢复 24h,进行后续实验检测,比较不同光照持续时间条件下视网膜形态及功能的变化情况,选择最佳的光损实验条件。

1.2.3 玻璃体腔给药 选择正常成年雌性 8 周龄 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠,除对照组以外小鼠均行去势手术后进行玻璃体腔给药。去势实验小鼠在暗适应 24h 后,腹腔注射氯胺酮(120mg/kg)和甲苯噻嗪(6mg/kg)进行深度麻醉。我们之前的实验证实 10⁻⁵ mol/L E2 可有效预防神经细胞凋亡^[3],故按照实验分组分别进行玻璃体腔注射 2 μ L 10⁻⁵ mol/L E2、2 μ L 生理盐水以及构建假手术对照。具体操作方法如下:手术镊分离小鼠眼睑,固定并使眼球突出,眼球表皮滴加表面麻醉剂盐酸奥布卡因滴眼液,以颞侧虹膜边缘外 1~2mm 为进针点,斜行 45 度进针约 2mm,进针后有明显落空感,观察并确定微量注射器针尖进入玻璃体腔后注射。玻璃体腔给药在暗室中红光照射下进行,以保持暗适应。

1.2.4 视网膜电图检测 小鼠光照刺激结束后,暗恢复24h后立即进行视网膜电图(electroretinogram,ERG)检测,根据小鼠体质量腹腔注射戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司)与速眠新II注射液(军事医学科学院军事兽医研究所试制)进行深度麻醉与肌松。待小鼠麻醉后在小鼠眼球表面滴加复方托吡卡胺滴眼液,作用5min以充分扩瞳,滴加表面麻醉剂盐酸奥布卡因,以便检测操作。将小鼠放于检测台上,检测一侧的眼球充分暴露正对光源,另一侧贴黑色胶布,避免光源影响,放置角膜电极,尾电极和颊电极,待波形稳定后依次进行ERG五项基本反应检测,检测完毕后检测对侧眼球。整个过程均在暗室中进行,采用仪器为RETI-scan系统(Roland Consult)。

1.2.5 制作石蜡切片 完成ERG检测后将小鼠正常饲养7d,心内注射大剂量麻醉剂处死小鼠,摘取左眼眼球制作标本。每个眼球在角膜12:00方向,距角巩膜缘约1mm处使用纹身液做标记,采用对软组织破坏小的固定液(冰醋酸:生理盐水:40%甲醛:75%乙醇=1:2:7:10)固定眼球,常规脱水、透明、包埋,将事先标记好视神经乳头的蜡块修切整齐,将蜡块按正确方向放置于石蜡切片机上,从视神经乳头鼻侧区开始切片,设置切片厚度为10 μm ,随时在显微镜下进行观察切片进展情况,待蜡块切面接近视神经乳头处时,调整切片厚度为4 μm ,显微镜下观察切割过视神经乳头进入颞侧区开始,连续切取石蜡切片15张。

1.2.6 HE染色 取5张组织切片充分干燥后进行HE染色,显微镜下观察比较视网膜乳头部附近各层细胞的结构变化,对距乳头部不同距离处(每次间隔5 μm)的内外核层厚度进行测量,取5张切片的平均值,累计6个独立重复样本后对结果进行统计学分析。

1.2.7 TUNEL检测 眼球石蜡切片于烘箱干烤脱蜡后,按照TUNEL染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)流程说明进行染色,显微镜下选择距视神经乳头相同距离的视网膜部位,观察比较光损伤后不同品系大鼠视网膜阳性染色细胞分布情况,并分别统计比较阳性染色细胞数。

统计学分析:采用GraphPad Prism 7.0a软件程序进行数据分析。多组间差异检验采用ANOVA分析,结合Tukey检验进行两组分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组 BALB/c 小鼠与 C57BL/6 小鼠视网膜组织形态比较 正常组 C57BL/6 小鼠视网膜内核层(inner nuclear layer, INL)与外核层(outer nuclear layer, ONL)厚度均显著小于 BALB/c,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图1。说明正常生理条件下,C57BL/6 与 BALB/c 小鼠视网膜 INL 与 ONL 厚度自身存在显著差异。

2.2 不同光照时间下 BALB/c 小鼠视网膜组织形态变化 10 000lx白光照射刺激4~16h的BALB/c小鼠各组视网膜INL、ONL厚度均较正常对照组显著减小,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图2。说明从10000lx白光照射刺激4h开始,即可造成BALB/c小鼠视网膜组织损伤,特别是光损12h以后视网膜损伤尤为严重,ONL细胞几乎完全消失,INL界限显著缩小,ONL的损伤较INL更为敏感。

2.3 不同光照时间下 C57BL/6 小鼠视网膜组织形态变化 与正常对照组相比,去势光照各组中10000lx白光照射刺激4~24h ONL厚度变化并不显著,但INL厚度显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图3。说明在相同的光照损伤刺激条件下,C57BL/6小鼠视网膜INL由于富含三类重要的神经元,即视锥视杆细胞、双极细胞和神经节细胞,所以对光损条件较ONL更为敏感。

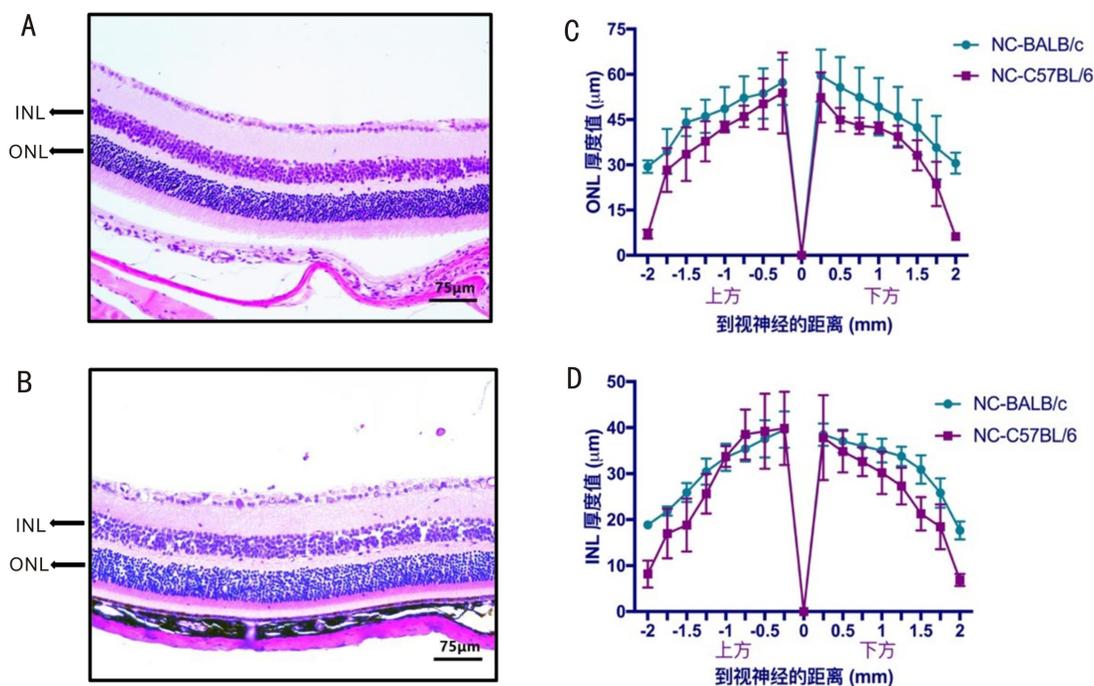


图1 正常组BALB/c与C57BL/6小鼠视网膜HE染色和视网膜厚度蛛网统计图 A: BALB/c小鼠; B: C57BL/6小鼠; C: ONL厚度蛛网统计图; D: INL厚度蛛网统计图。

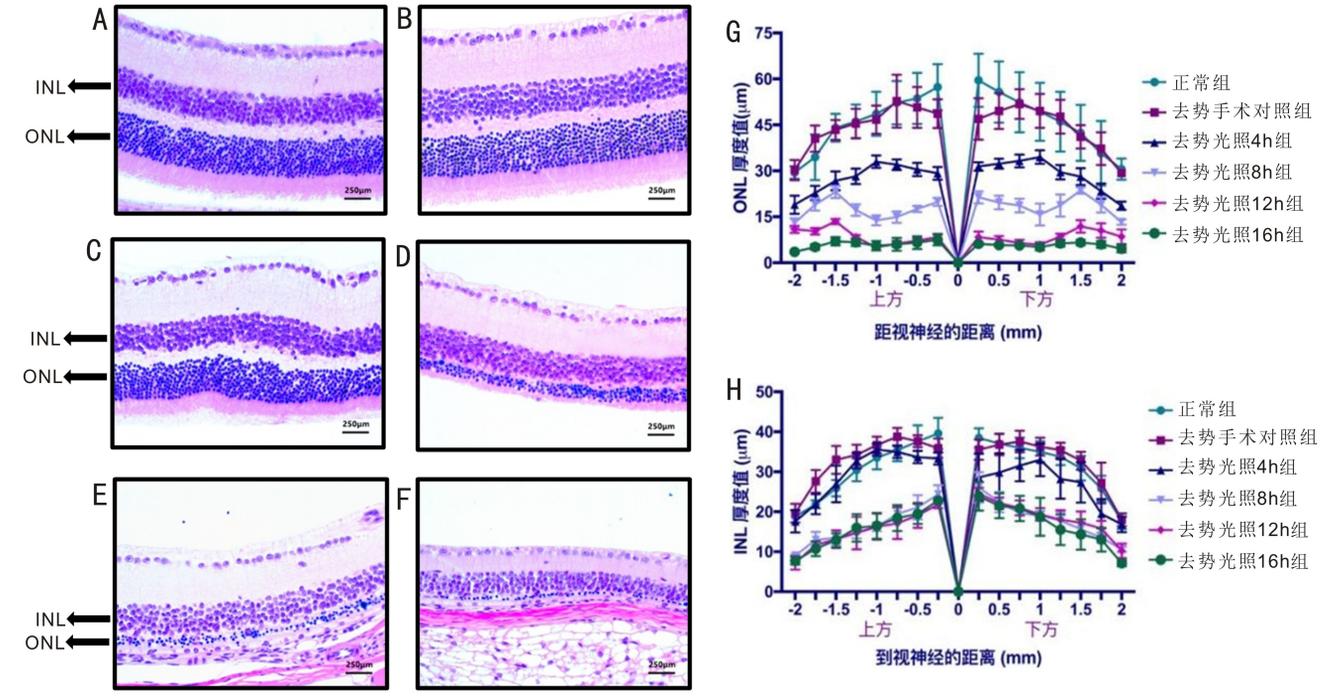


图2 不同光照时间下 BALB/c 小鼠视网膜 HE 染色和视网膜厚度蛛网统计图 A: 正常组; B: 去势手术对照组; C: 去势光照 4h 组; D: 去势光照 8h 组; E: 去势光照 12h 组; F: 去势光照 16h 组; G: ONL 厚度蛛网统计图; H: INL 厚度蛛网统计图。

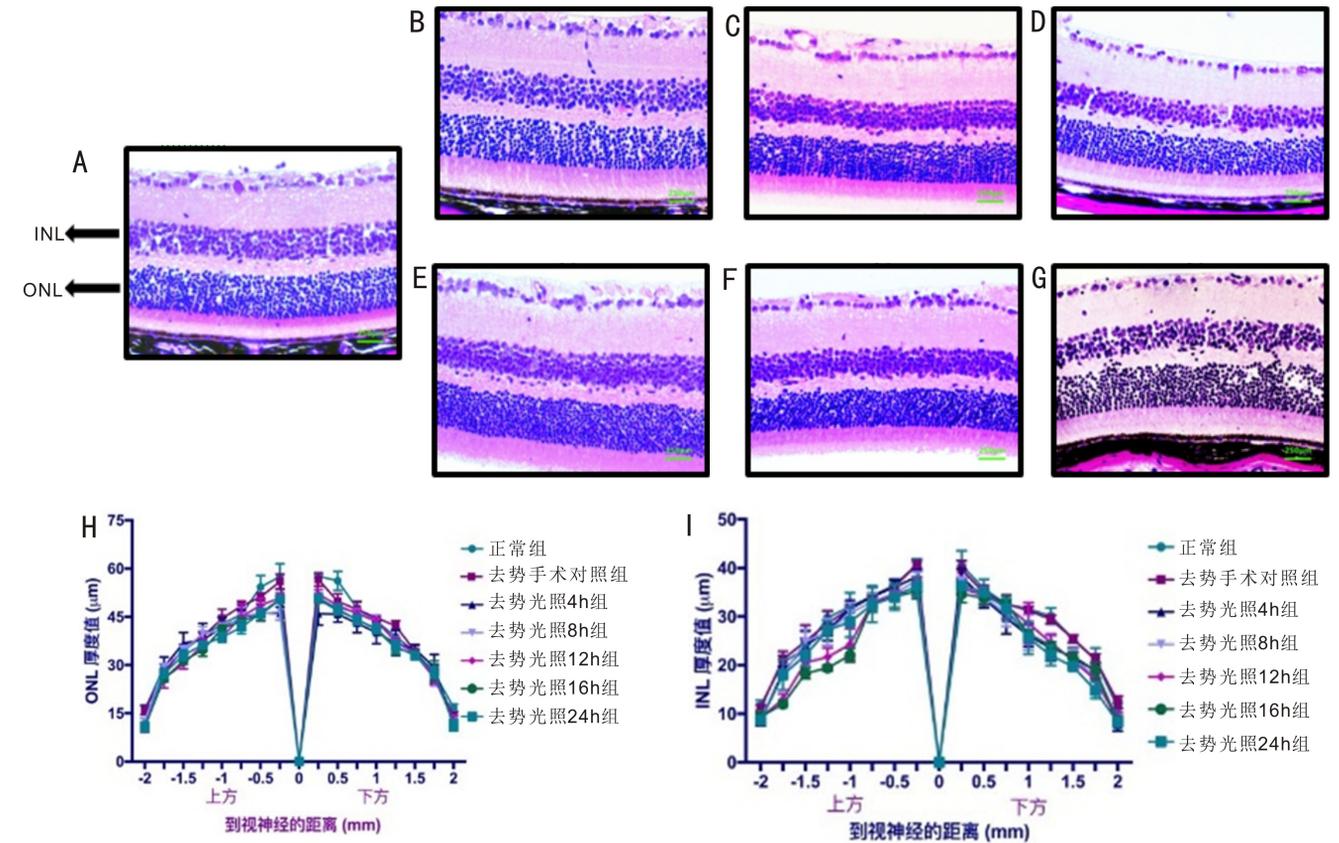


图3 不同光照时间下 C57BL/6 小鼠视网膜 HE 染色和视网膜厚度蛛网统计图 A: 正常组; B: 去势手术对照组; C: 去势光照 4h 组; D: 去势光照 8h 组; E: 去势光照 12h 组; F: 去势光照 16h 组; G: 去势光照 24h 组; H: ONL 厚度蛛网统计图; I: INL 厚度蛛网统计图。

2.4 E2 玻璃体腔注射预处理下光损 BALB/c 小鼠视网膜组织形态变化 与去势光照 12h 组相比, E2 预处理组小鼠视网膜 INL、ONL 厚度显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 4, 进而说明 E2 预处理可显著抑制光损导致的 BALB/c 小鼠视网膜 ONL 及 INL 厚度的减小。

2.5 E2 玻璃体腔注射预处理下光损 C57BL/6 小鼠视网膜组织形态变化 与正常组相比去势光照 12h 组

C57BL/6 小鼠视网膜 ONL、INL 厚度显著减小, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 E2 预处理组与去势光照 12h 组相比可增加 ONL 及 INL 厚度但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。实验结果表明, 形态学上 E2 抗 C57BL/6 小鼠视网膜细胞光损的作用表现并不显著。

2.6 E2 玻璃体腔注射预处理下光损 BALB/c 小鼠视网膜功能学变化 与去势手术对照组相比, 光损 12h 后 BALB/c

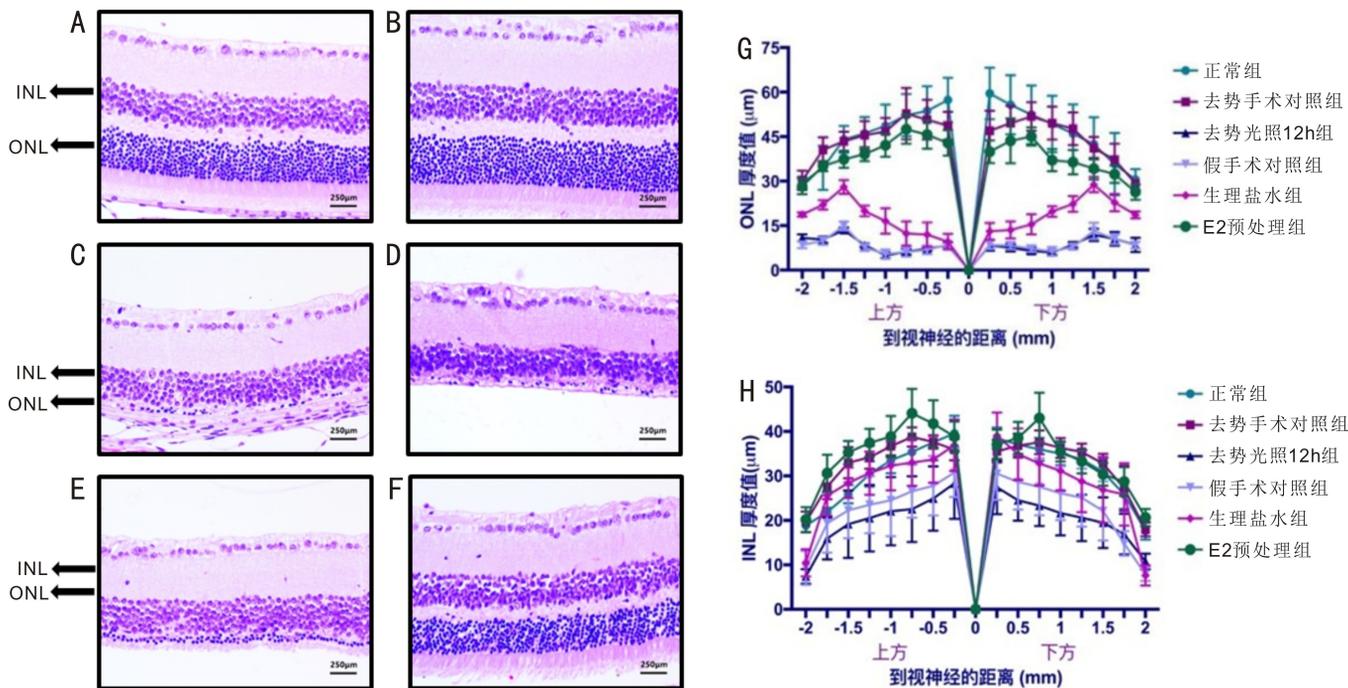


图4 玻璃体腔给药预处理后光损 BALB/c 小鼠视网膜 HE 染色和视网膜厚度蛛网统计图 A:正常组;B:去势手术对照组;C:去势光照 12h 组;D:假手术对照组;E:生理盐水组;F:E2 预处理组;G:ONL 厚度蛛网统计图;H:INL 厚度蛛网统计图。

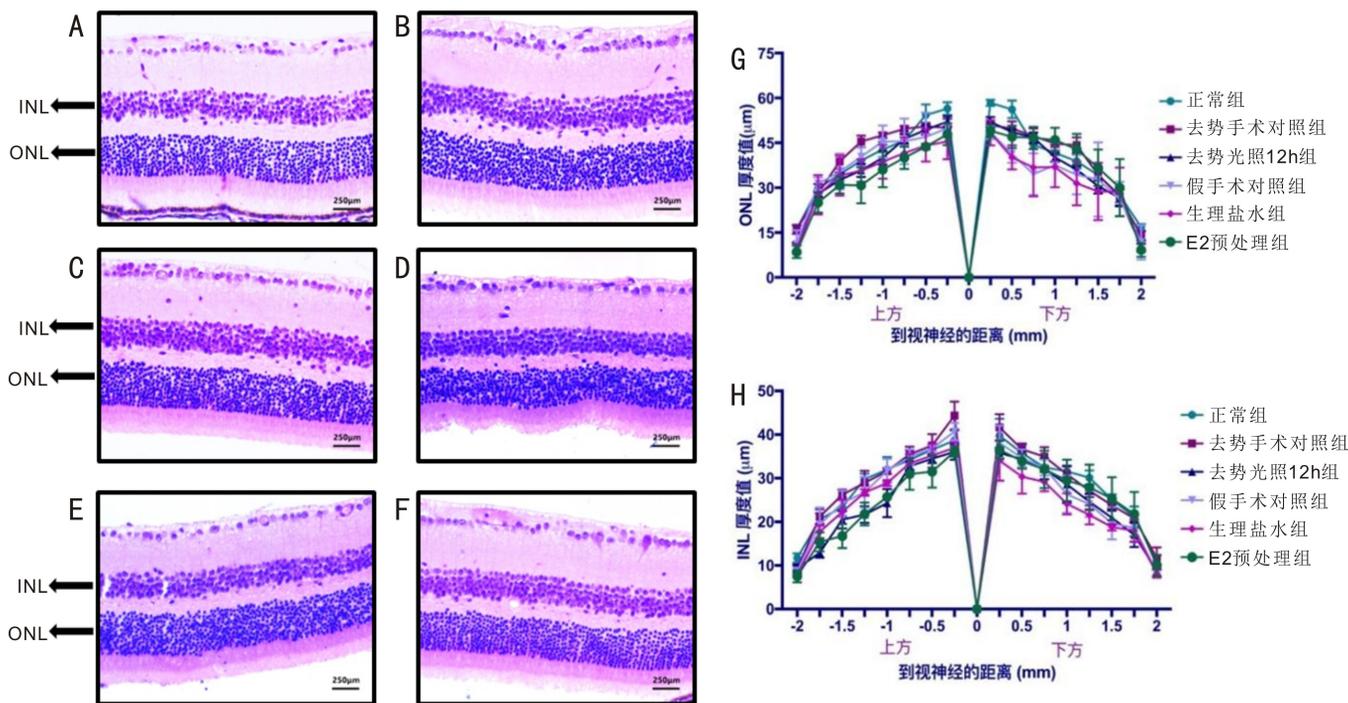


图5 玻璃体腔给药预处理后光损 C57BL/6 小鼠视网膜 HE 染色和视网膜厚度蛛网统计图 A:正常组;B:去势手术对照组;C:去势光照 12h 组;D:假手术对照组;E:生理盐水组;F:E2 预处理组;G:ONL 厚度蛛网统计图;H:INL 厚度蛛网统计图。

小鼠内外层显著出现凋亡阳性染色,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),与去势光照 12h 组相比,E2 预处理组阳性细胞凋亡百分比显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 6。说明 E2 可显著抑制由光损导致的 BALB/c 小鼠视网膜细胞凋亡。

2.7 E2 玻璃体腔注射预处理下光损 C57BL/6 小鼠视网膜功能学变化 与去势手术对照组相比,光损 12h 后 BALB/c 小鼠内外层出现凋亡阳性染色,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);与去势光照 12h 组相比,E2 预处理组阳性细胞凋亡百分比显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见

图 7。说明 E2 可显著抑制由光损导致的 C57BL/6 小鼠视网膜细胞的凋亡。

2.8 E2 玻璃体腔注射预处理下光损 C57BL/6 小鼠的功能保护作用 在 10000lx 光照 12h 后对正常 C57BL/6 小鼠并不会产生显著作用,对去势光损小鼠均使得最大混合反应 a 波波谱及 b 波波幅显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 8。

3 讨论

不同光源以及光照强度、持续时间对光损动物模型建立产生着重要影响。频率高、能量大的蓝光是光损模型构

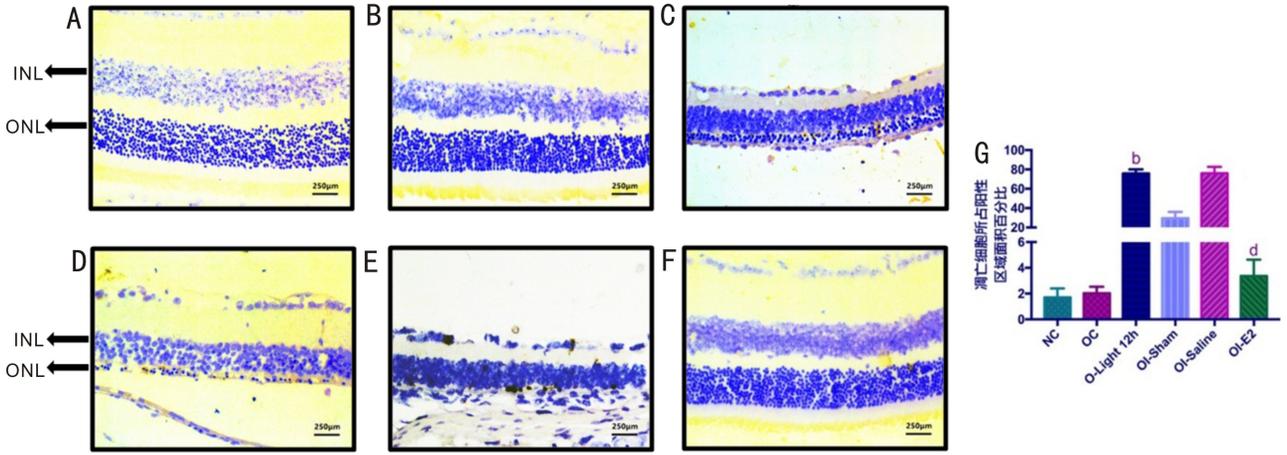


图6 玻璃体腔给药预处理后光损 BALB/c 小鼠视网膜 TUNEL 染色 A:正常组;B:去势手术对照组;C:去势光照 12h 组;D:假手术对照组;E:生理盐水组;F:E2 预处理组;G:视网膜凋亡阳性细胞染色统计图。^b $P < 0.01$ vs 去势手术对照组;^d $P < 0.01$ vs 去势光照 12h 组。

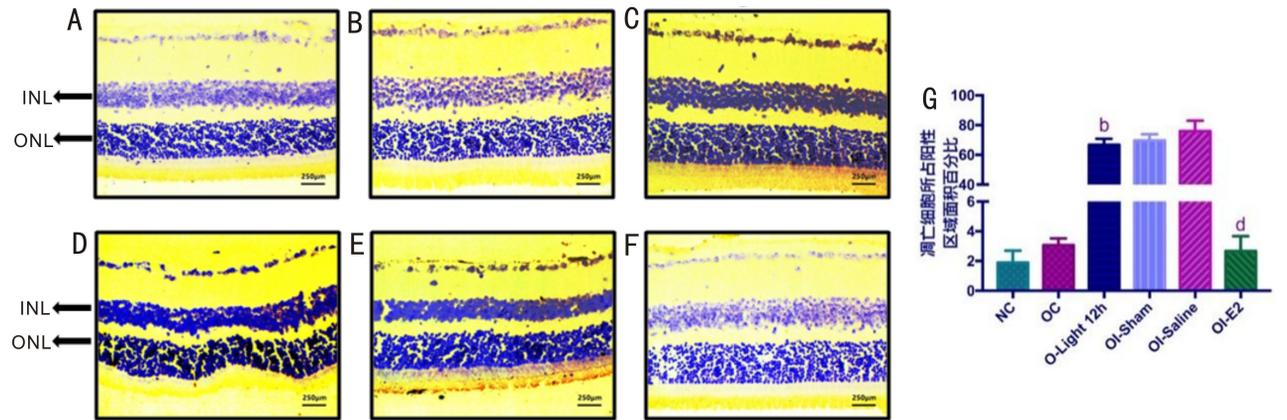


图7 不同玻璃体腔给药预处理后光损 C57BL/6 小鼠视网膜 TUNEL 染色 A:正常组;B:去势手术对照组;C:去势光照 12h 组;D:假手术对照组;E:生理盐水组;F:E2 预处理组;G:视网膜凋亡阳性细胞染色统计图。^b $P < 0.01$ vs 去势手术对照组;^d $P < 0.01$ vs 去势光照 12h 组。

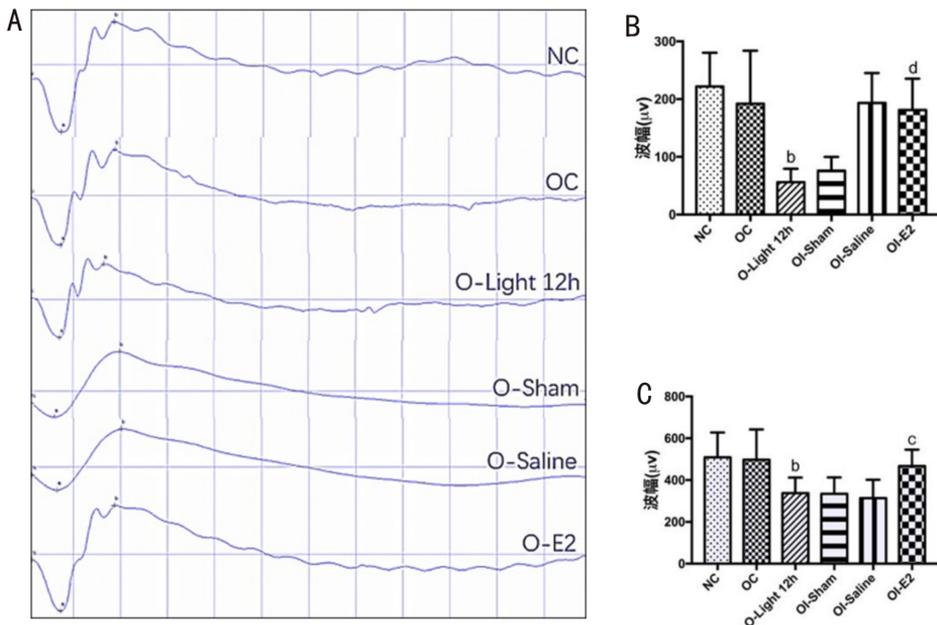


图8 玻璃体腔给药预处理后光损 C57BL/6 小鼠视网膜 ERG 检测 A:成年雌性去势 C57BL/6 小鼠玻璃体腔给药预处理后光损下视网膜 ERG 检测图;B:ERG 检测中最大混合反应 a 波振幅统计图;C:ERG 检测中最大混合反应 b 波振幅统计图。^b $P < 0.01$ vs 去势手术对照组;^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ vs 去势光照 12h 组。

建的良好选择。研究表明,蓝色 LED 光源构建光损伤效率明显优于正常白光,而且蓝光可诱导视锥感光细胞凋

亡,并改变视紫红质定位^[4]。同时过度暴露于蓝光下可通过增加细胞内铁离子浓度诱导 RPE 细胞氧化应激平衡的

破坏以及脂质氧化物的沉积,进而造成细胞铁死亡发生^[5]。白光可反应多种混合光的综合作用以及具有模拟日光对视网膜损伤的特点,被大部分学者采用。在光照强度以及时间的选择上,大多数学者采用 4000~5000lx,且短时间进行强光照射可构建急性光损伤模型。研究表明采用短暂强光条件造成的光损伤可诱导血管内皮生长因子上调,促进 CNV 生长进而促进进行性视网膜变性的发展,这也表明急性光损伤模型可能将专门用作新生血管性 ARMD 的模型^[6]。基于上述因素,我们的实验采用 10000lx 白光并发现照射 12h 及以上能构建相对稳定的 LIRD 模型。

基于哺乳类实验动物来源广泛的便捷性,目前动物模型构建主要以大鼠、小鼠为主。大鼠视网膜的背中央区被认为与人类视网膜黄斑区功能类似,与年龄相关的视网膜病存在密切联系。SD 大鼠光损伤的敏感性最强,在构建 LIRD 模型被广泛应用。小鼠在光损伤模型应用上主要包括 BALB/c、C57BL/6 以及其他特异性基因敲除小鼠。我们的实验对 BALB/c、C57BL/6 小鼠同时进行 LIRD 模型构建,分别观察两种不同品系小鼠在不同光照强度下视网膜结构和功能的变化。C57BL/6 小鼠为非白化鼠,视网膜存在 RPE 细胞。C57BL/6 小鼠可表达 RPE65(450Met)的耐光变体,对光诱导损伤具有一定的抵抗能力,更接近人类对光损的敏感性。研究表明 RPE 细胞既可以向光感受器运输营养物质,如 ω -3 脂肪酸、葡萄糖和视黄醇,也可将特定离子、水和代谢终产物从视网膜下间隙输送到脉络膜血管,在维持视网膜正常代谢中起到了不可或缺的作用^[7]。同时 RPE 细胞中含有大量的对光损伤敏感的物质如线粒体和饱和脂肪酸,过量光照可造成 OS 失衡并产生活性氧自由基导致感光细胞外段解体、内节线粒体肿胀变性,进一步加快了 RPE 细胞的凋亡^[8]。BALB/c 小鼠为白化鼠,视网膜没有 RPE 细胞,不能直观地反应光照对视网膜的损害。此外,C57BL/6 与 BALB/c 小鼠的光感受器损失率存在显著差异,在整个成年期 BALB/c 小鼠中发生视杆细胞的丢失更多,C57BL/6 小鼠视网膜形态和功能在成年后期将保持稳定^[9]。故我们的实验选取抗光损伤能力更强、更接近人体正常眼球结构的 C57BL/6 小鼠来构建 LIRD 模型。

E2 是中枢神经系统中一种强抗氧化剂,已在各种神经元细胞和中枢神经系统疾病的动物模型中显示出对神经退行性疾病具有保护作用,包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)和帕金森病^[10]。E2 通过增强大脑中调节认知功能的不同区域的棘突生成来改善啮齿动物的海马形态、可塑性和记忆功能^[11],这可能会成为干预甚至逆转 AD 中神经变性的途径之一。视网膜富含神经元,可作为神经系统的外延器官之一来研究 E2 的神经保护作用。研究表明,E2 可以显著抑制光诱导的大鼠视网膜 RPE 细胞损伤,也可通过抑制 toll 样受体 2 介导的炎症反应从而保护视网膜神经细胞免受 OS 破坏^[12]。OS 是许多视网膜疾病的重要致病因素,在体光诱导损伤时 OS 在 LIRD 模型建立中起重要作用^[13]。抗氧化剂的干预成为防止 LIRD 病情加重的重要措施之一。E2 在视网膜细胞

中可发挥显著的抗氧化作用,通过减少 ROS 的产生来阻止 OS 诱导的视网膜神经元、RPE 细胞和人晶状体上皮细胞的凋亡,延缓视网膜变性的发生发展^[14-15]。此外,研究表明 E2 预处理对蓝光诱导的 RD 和 H₂O₂ 诱导的氧化应激具有显著的保护作用,这种保护作用可能通过减少视网膜细胞凋亡和增加自噬来实现^[16]。这些发现表明 E2 及其结构功能类似物具有良好的药物研发前景进而治疗视网膜神经退行性疾病。本研究中,我们发现白光照射可导致视网膜形态严重破坏,2 μ L 10⁻⁵ mol/L E2 预处理可以显著抑制 BALB/c 小鼠光感受器损害和 ONL 厚度减少以及抑制视网膜细胞的凋亡,同时在 C57BL/6 小鼠中形态学上 E2 并未表现出显著的预保护作用,但可显著抑制视网膜功能障碍,主要体现在显著减少视网膜凋亡细胞的比例和显著抑制最大混合反应 a、b 波的下降。a 波主要反映视网膜光感受器的功能,对视杆细胞较为敏感,而 b 波来自视网膜 INL 的电活动,与视网膜双极细胞有密切关系^[17]。实验结果说明 E2 对于抗光照诱导的 C57BL/6 小鼠视网膜 OS 损伤具有重要的神经细胞功能的保护作用。分析原因:(1)可能是由于 BALB/c 小鼠相对于 C57BL/6 小鼠在相同的光损条件刺激下,经历了更为剧烈的损伤,各组比较时 E2 保护作用的显著性更容易突显;(2)可能是由于品系的差异,E2 对 C57BL/6 小鼠视网膜保护作用在形态学改变相对于 ERG 等功能学改变更加滞后,光损 7d 后形态学上尚未累积到显著变化。

综上所述,不同品系小鼠对光损造成视网膜损伤的敏感性存在一定差异,通过相同条件下对两种不同品系小鼠光损伤模型建立对比发现,BALB/c 小鼠 ONL 层对光损更敏感,而 C57BL/6 小鼠 INL 层对光损更敏感,采用 C57BL/6 小鼠品系造模更能模拟人正常眼球视网膜的光照损伤过程,对大多数光照损伤和视网膜病变更具有代表性。此外 E2 的玻璃体腔预处理对视网膜功能的保护作用显著,深入研究其保护作用机制将为临床抗视网膜及中枢神经系统退行性疾病的治疗药物研发提供重要的实验数据。

参考文献

- 1 Rong R, Yang RL, Li HB, *et al.* The roles of mitochondrial dynamics and NLRP3 inflammasomes in the pathogenesis of retinal light damage. *Ann N Y Acad Sci* 2022;1508(1):78-91
- 2 Hernández-Zimbrón LF, Zamora-Alvarado R, Ochoa-De la Paz L, *et al.* Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:8374647
- 3 Mo MS, Li HB, Wang BY, *et al.* PI3K/Akt and NF- κ B activation following intravitreal administration of 17 β -estradiol: neuroprotection of the rat retina from light-induced apoptosis. *Neuroscience* 2013;228:1-12
- 4 Nakamura M, Kuse Y, Tsuruma K, *et al.* The Involvement of the Oxidative Stress in Murine Blue LED Light-Induced Retinal Damage Model. *Biol Pharm Bull* 2017;40(8):1219-1225
- 5 徐翌华,徐丽,蒋晶晶,等.蓝光诱导视网膜色素上皮细胞铁死亡的机制研究. *国际眼科杂志* 2023;23(4):546-550
- 6 Tisi A, Parete G, Flati V, *et al.* Up-regulation of pro-angiogenic pathways and induction of neovascularization by an acute retinal light damage. *Sci Rep* 2020;10(1):6376
- 7 Bhatta I, Luttly G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment

epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):295-317

8 Alaimo A, Liñares GG, Bujjamer JM, et al. Toxicity of blue led light and A2E is associated to mitochondrial dynamics impairment in ARPE-19 cells: implications for age-related macular degeneration. *Arch Toxicol* 2019;93(5):1401-1415

9 Bravo-Nuevo A, Walsh N, Stone J. Photoreceptor degeneration and loss of retinal function in the C57BL/6-C2J mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):2005-2012

10 Sahab-Negah S, Hajali V, Moradi HR, et al. The Impact of Estradiol on Neurogenesis and Cognitive Functions in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 2020;40(3):283-299

11 Frick KM. Molecular mechanisms underlying the memory-enhancing effects of estradiol. *Horm Behav* 2015;74:4-18

12 Li HB, Zhu CH, Wang BY, et al. 17 β -Estradiol Protects the Retinal Nerve Cells Suppressing TLR2 Mediated Immune - Inflammation and

Apoptosis from Oxidative Stress Insult Independent of PI3K. *J Mol Neurosci* 2016;60(2):195-204

13 Ding Y, Aredo B, Zhong X, et al. Increased susceptibility to fundus camera-delivered light-induced retinal degeneration in mice deficient in oxidative stress response proteins. *Exp Eye Res* 2017;159:58-68

14 Giddabasappa A, Bauler M, Yepuru M, et al. 17- β estradiol protects ARPE-19 cells from oxidative stress through estrogen receptor- β . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(10):5278-5287

15 陈颖, 康刚劲, 王妍茜, 等. 17 β -雌二醇对人晶状体上皮细胞的保护作用与细胞焦亡的相关性研究. *国际眼科杂志* 2021;21(10):1680-1685

16 Wei QQ, Liang XW, Peng Y, et al. 17 β -estradiol ameliorates oxidative stress and blue light-emitting diode-induced retinal degeneration by decreasing apoptosis and enhancing autophagy. *Drug Des Devel Ther* 2018;12:2715-2730

17 Creel DJ. Electroretinograms. *Handb Clin Neurol* 2019;160:481-493

国际眼科杂志中文版 (IES) 近 5 年影响因子趋势图

