

激光光凝法建立小鼠慢性高眼压模型

何 跃¹, 张曙光², 袁援生³, 李 燕³, 吕红彬¹, 干锦华¹, 毛 丽¹

基金项目: 四川省泸州市泸州医学院青年基金(No. 2010-108); 四川省泸州市泸州医学院附属医院人才基金项目(No. 2011-43)

作者单位:¹(646000) 中国四川省泸州市, 泸州医学院附属医院眼科;²(450000) 中国河南省郑州市第二人民医院眼科;³(650003) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第一附属医院眼科

作者简介: 何跃, 医学硕士, 主治医师, 中华医学会会员, 泸州市医学会眼科专委会委员, 泸州市医学会眼科专委会秘书, 研究方向: 青光眼、眼后段疾病的诊治。

通讯作者: 何跃. hlyfy@163.com

收稿日期: 2014-05-07 修回日期: 2014-09-04

Mice mode of high intraocular pressure established by laser photocoagulation

Yue He¹, Shu-Guang Zhang², Yuan-Sheng Yuan³, Yan Li³, Hong-Bin Lü¹, Jin-Hua Gan¹, Li Mao¹

Foundation items: Luzhou Medical College Youth Fund, Sichuan Province (No. 2010-108); Luzhou Medical College Affiliated Hospital Personnel Fund, Sichuan Province (No. 2011-43)

¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China;

² Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Zhengzhou City, Zhengzhou 450000, Henan Province, China;

³ Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650003, Yunnan Province, China

Correspondence to: Yue He. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. hlyfy@163.com

Received: 2014-05-07 Accepted: 2014-09-04

Abstract

• **AIM:** To establish an experimental model of high intraocular pressure in mice by laser photocoagulation and to prepare for future research.

• **METHODS:** Experimental model of high intraocular pressure was induced unilaterally in 44 C57BL/6 mice. The fellow eye served as a control. TONO-PEN AVIA Tonometer was used to measure intraocular pressure (IOP) to guarantee IOP value at 1, 2, 4, 8wk. Slit-lamp biomicroscopy was performed throughout the period and the structural changes were assessed histologically. And then, their eyes were enucleated, postfixed, cryoprotected, and embedded in optimal cutting temperature medium. After hematoxylin and eosin stain (HE stain), cryosections of the retina were observed

under light microscope. TdT-mediated biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) was performed on the retinal sections to determine apoptosis rate.

• **RESULTS:** IOP of laser-treated eyes was significantly higher than that of control eyes from 1-8wk ($P < 0.05$). The highest IOP was 31mmHg, but only one eye. The IOP was mainly around 20mmHg. In laser-treated eyes, the angle of anterior chamber were narrow. Number of cells in the inner nuclear layer and retinal ganglion cell layer was slightly lower than that in control eyes at 2wk, but by 4 and 8wk the number of cells was significantly lower than that in the control contralateral eyes.

• **CONCLUSION:** The laser photocoagulation of limbus causes chronic elevation of IOP and this method may be a promising experimental model for the investigation of biological mechanisms of glaucomatous retinal ganglion cell damage.

• **KEYWORDS:** high intraocular pressure; mouse; experimental model of high intraocular pressure

Citation: He Y, Zhang SG, Yuan YS, *et al.* Mice mode of high intraocular pressure established by laser photocoagulation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(10):1779-1782

摘要

目的: 激光光凝法建立小鼠的慢性高眼压模型, 为以后的研究做准备。

方法: C57BL/6 小鼠 44 只一侧眼用来诱导慢性高眼压。另一只眼作为对照眼。TONO-PEN AVIA 眼压笔分别在激光光凝后 1, 2, 4, 8wk 测量小鼠眼内压。裂隙灯显微镜观察小鼠眼球结构变化情况, 分别于术后 1, 2, 4, 8wk 摘除小鼠双侧眼球, 进行冰冻切片, 采用 HE 染色, 光镜下观察视网膜情况。TUNEL 计数视网膜切片的细胞凋亡。

结果: 在 1 ~ 8wk, 实验眼的眼内压明显高于对照眼 ($P < 0.05$), 最高眼内压是 31mmHg, 只有 1 眼。眼压平均在 20mmHg 左右。在第 2wk, 内核层和视网膜神经节细胞层细胞数较对照眼轻度减少, 在第 4, 8wk 细胞数明显减少。**结论:** 角膜缘激光光凝能造成小鼠慢性眼内压升高, 通过该方法可以建立研究青光眼视网膜神经节细胞损害的模型。

关键词: 高眼压; 小鼠; 高眼压模型

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.10.10

引用: 何跃, 张曙光, 袁援生, 等. 激光光凝法建立小鼠慢性高眼压模型. *国际眼科杂志* 2014;14(10):1779-1782

0 引言

青光眼是一组以视神经凹陷性萎缩和视野缺损为共同特征的疾病, 根据目前的流行病学资料显示, 至 2010 年

表1 激光术后不同时期对照眼和实验眼眼内压测量值 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

分组	实验前眼压	实验后不同时期眼压			
		1wk	2wk	4wk	8wk
对照眼	13.98±2.49	13.15±1.99	12.83±1.55	13.10±1.79	14.28±2.03
实验眼	14.28±2.03	20.82±2.35	20.23±3.36	19.87±2.30	20.62±2.45

全世界仅原发性青光眼患者预计将达6050万,而到2020年这个数字将进一步增至7960万^[1]。和白内障不同,青光眼引起的视力下降是当前的医疗技术所不能恢复的,因此青光眼所造成的视功能损害显得尤为突出。其中青光眼引起的视力下降最危险的因素就是眼内压的升高,目前的治疗也主要是降低和稳定眼内压。建立一种简单、经济、实用的高眼压动物模型对研究青光眼发病机制、治疗和视神经保护的研究尤为重要。小鼠眼球解剖结构与人类相似,发育周期相对较短,廉价,易于进行转基因操作,使得小鼠成为研究青光眼发病的分子机制、遗传学因素及药物治疗等各个方面较为理想的模型动物。本实验采用532-二极管激光构建C57BL/6小鼠高眼压模型。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性C57BL/6小鼠6周龄,体质量18~22g,所有动物由重庆动物实验中心提供。所有小鼠使用粗颗粒饲料,清洁水喂养,在无特定病原体的环境下饲养。室温21℃,光照12h。实验动物和实验条件符合国家技术委员会的《实验动物管理条例》。

1.2 方法 分别于激光光凝后1,2,4,8wk测量小鼠眼内压,采用HE染色光镜下观察视网膜情况,TUNEL计数视网膜切片的细胞凋亡。

1.2.1 诱导高眼压 C57BL/6小鼠44只,每只小鼠的右眼作为实验眼,左眼作为空白对照眼。(1)散大瞳孔:手术前30min每只小鼠右眼滴散瞳药(阿托品滴眼液+复方托吡卡胺滴眼液)。(2)麻醉:用30g/L戊巴比妥钠麻醉。电子台秤称重后,按照1.7mL/kg腹腔内注射行全身麻醉,同时右眼盐酸奥布卡因滴眼液点眼3次。仔细观察每只小鼠的麻醉状态。如果捏小鼠的后背皮肤无反应则进行手术。(3)前房穿刺:在裂隙灯显微镜下,用0.3mm×13mm的针头从鼻下方角膜缘处穿刺入前房,释放房水,使前房变浅,房角关闭。(4)激光光凝:前房变浅后立即用532-二极管激光直接行右眼角膜缘360°光凝。激光的能量大小、时间和光斑大小分别为:100mW/0.05s和200μm。光斑93±8个。整个过程在10min内完成。(5)术后处理:术后点硫酸锌尿囊素滴眼液和红霉素眼膏。并观察小鼠全身情况至其苏醒。

1.2.2 眼压测量 分别于术后1,3d观察结膜有无充血,角膜有无水肿,前房等情况。于术后第3d同一时段同一实验人员用TONO-PEN AVIA笔式眼压计测量小鼠眼压,以减少眼压测量中造成的人为误差。以后每隔3d重复眼压测量。测量方法同前。国内尚无小鼠青光眼模型的构建。我们采用国外C57BL/6小鼠高眼压的标准。Aihara等^[2]通过实验得出C57BL/6小鼠激光光凝后眼压超过光凝前眼压30%以上说明高眼压模型成功,即 $\Delta IOP(\%) = 100 \times (IOP_{\text{光凝后}} - IOP_{\text{光凝前}}) / IOP_{\text{光凝前}} \geq 30\%$ 。激光光凝后3d如实验眼眼内压超过术前眼内压的30%,则不做处理,低于术前眼内压的30%,则于7d后重复激光光凝。

1.2.3 HE染色及TUNEL法检测视网膜神经节细胞的凋亡情况 不同组的动物全身麻醉后,沿睫状体平坦部冠状

面切开眼球,弃去眼前节,小心分离视网膜后用滤纸尽可能吸干水分。固定、HE染色及原位凋亡检测(TUNEL法)视网膜神经节细胞的凋亡情况,TUNEL凋亡试剂盒:美国Millipore公司。TUNEL结果判定方法:光学显微镜下观察,所有细胞核均着绿色,凋亡的细胞核染色质显示出特异性的棕黄色。以视神经轴为中心,做连续矢状切面,切片厚度5μm,每个眼球切2~3张切片,每张切片随机选取3个不同视野在400倍物镜下观察并计数TUNEL染色阳性的RGCs细胞。

统计学分析:采用统计学软件SPSS 11.5进行统计分析。实验所获取的数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验总体情况 小鼠44只用于高眼压模型的制作的建立,成功33只。其中1只小鼠在全身麻醉后死亡,2只发生角膜混浊,2只发生白内障,1只发生眼球萎缩,1只发生眼球穿孔,4只眼内压始终无法超过术前眼内压的30%。

2.2 术后一般情况 所有实验眼均于术后第1d出现结膜充血,角膜水肿,部分眼前房内房水轻度混浊,以上表现均于3d后消失。对照眼结膜、角膜、前房均未发现异常。

2.3 眼压情况 实验前眼压范围:左眼13.98±2.49mmHg,右眼14.28±2.03mmHg。双眼眼压无明显差异($P > 0.05$)。实验后右眼眼内压升高,平均眼内压20.33±2.65mmHg,最高眼压值31mmHg仅有1眼,其次为27mmHg有2眼,眼内压主要集中在20mmHg左右,实验前后对照眼眼压无统计学意义($P > 0.05$),实验术后各周眼压明显升高,较术前有统计学意义($P < 0.01$),与对照眼比较有统计学意义($P < 0.01$),见表1。

2.4 光镜下视网膜形态的改变 光镜观察:小鼠对照眼视网膜组织结构层次与人视网膜组织相似,各组织结构排列整齐,各层次结构清晰。光感受器和色素上皮细胞紧密相连。内、外核层排列紧密,染色均匀,形态规则,神经节细胞排列整齐。小鼠实验眼术后1wk出现节细胞层和内核层细胞空泡化,间质疏松,神经纤维层及内丛状层疏松,内核层细胞排列紊乱(图1,2)。

2.5 TUNEL法检测视网膜神经节细胞的凋亡情况 对照眼各时间点神经节细胞层中未发现棕黄色染色阳性RGCs凋亡。不同时间点实验眼视网膜神经节细胞凋亡情况见表2。实验眼较对照眼TUNEL阳性细胞数增多($P < 0.05$),但不同时期实验组之间TUNEL阳性细胞数比较无统计学意义($P > 0.05$),见图3,4。

3 讨论

眼压的升高会引起视野的损害,视力的丧失。但是,其作用的细胞和分子机制还不是很清楚。其中一个主要的原因是缺乏合适的高眼压动物模型。与其他动物相比,小鼠发育周期相对较短,廉价,可以按照实验要求进行基因插入、敲除、修饰等转基因操作,不同类型的转基因小鼠可以用来研究单基因在青光眼发病中的机制以及评价新

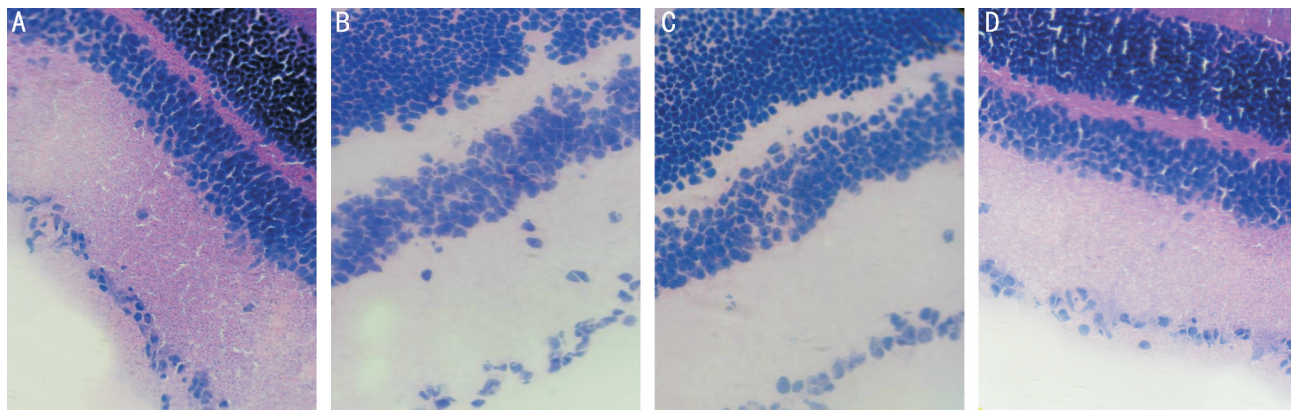


图1 正常对照眼视网膜各组织结构排列整齐,各层次结构清晰,神经节细胞排列整齐(HE×400) A:对照眼 1wk;B:对照眼 2wk; C:对照眼 4wk;D:对照眼 8wk。

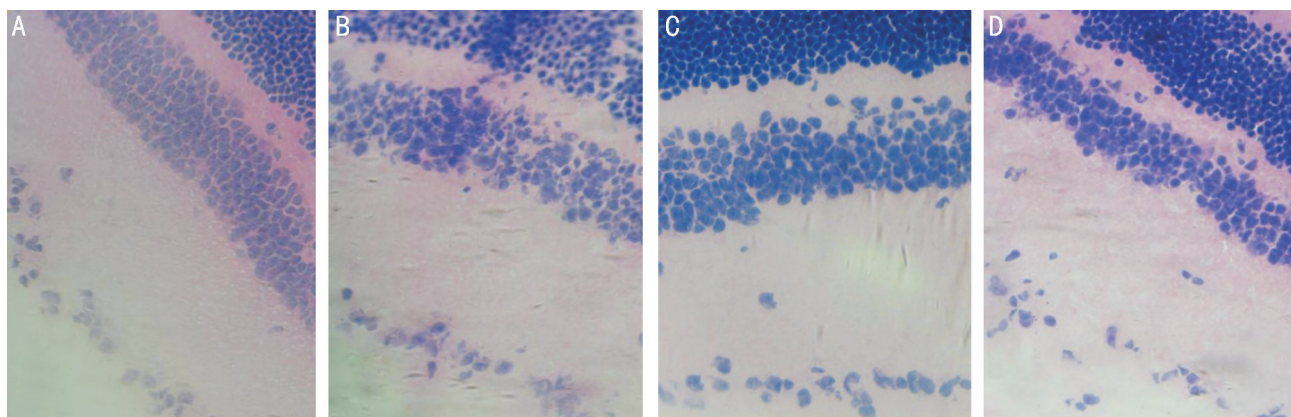


图2 实验眼术后 1wk 出现节细胞层和内核层细胞空泡化,间质疏松,神经纤维层及内丛状层疏松,内核层细胞排列紊乱(HE×400) A:实验眼 1wk; B:实验眼 2wk;C:实验眼 4wk; D:实验眼 8wk。

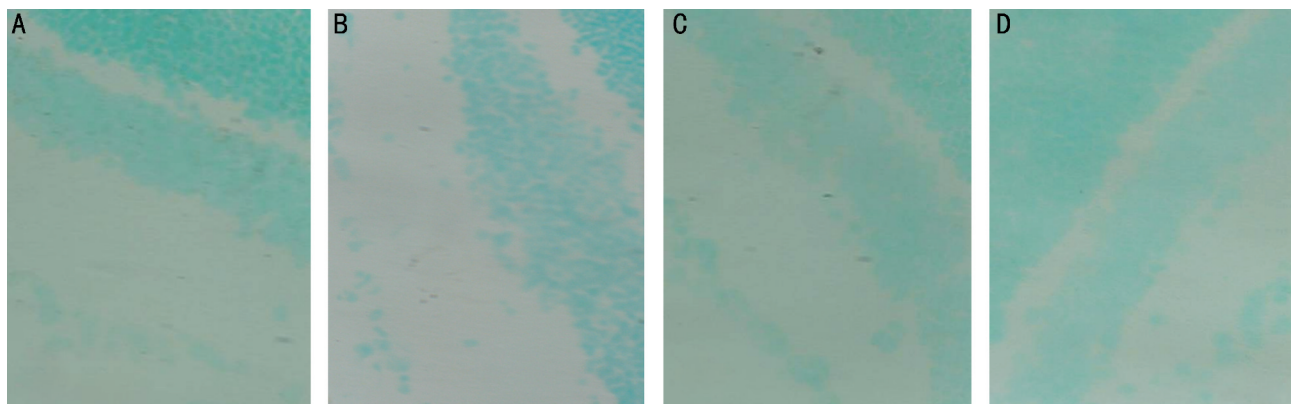


图3 对照眼各时间点神经节细胞层中未发现棕黄色染色阳性 RGCs 凋亡(×400) A:对照眼 1wk;B:对照眼 2wk;C:对照眼 4wk; D:对照眼 8wk。

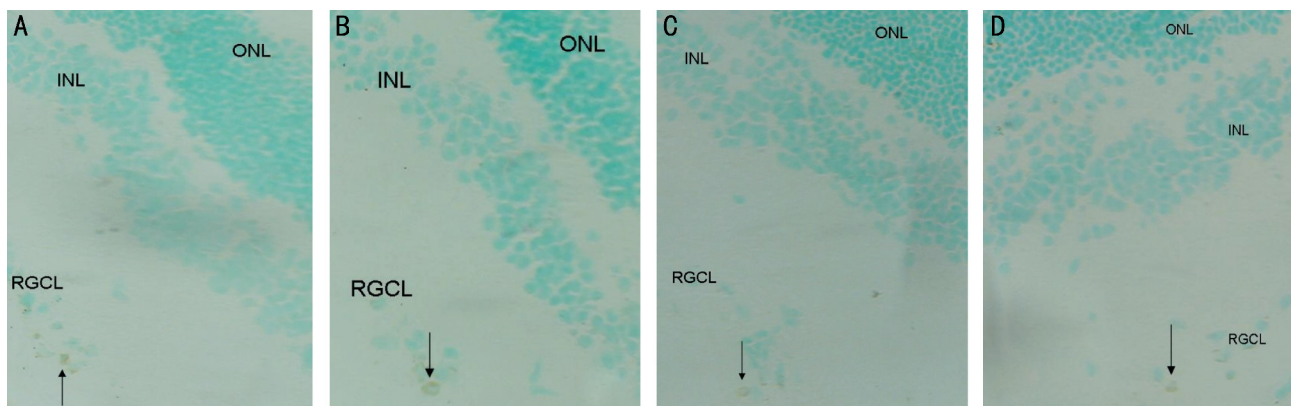


图4 实验眼较对照眼 TUNEL 阳性细胞数增多 ($P < 0.05$),但不同时期实验组之间 TUNEL 阳性细胞数比较无统计学意义 ($P > 0.05$) (×400),箭头所示为 TUNEL 阳性细胞 A:实验眼 1wk;B:实验眼 2wk;C:实验眼 4wk;D:实验眼 8wk。

表2 TUNEL法检测实验视网膜神经节细胞的凋亡情况 $\bar{x} \pm s$

时间	TUNEL 阳性细胞	P
1wk	0.38±0.49	<0.05
2wk	0.52±0.64	<0.05
4wk	0.46±0.66	<0.05
8wk	0.50±0.59	<0.05

的青光眼治疗方法^[3]。并且有研究显示,小鼠眼球在多个方面与人眼相似,包括房角结构、房角的发育过程^[4]、房水外流途径^[5]、房水动力学^[6]、眼压的日周期变化^[7]、对降眼压药物的反应^[8]等,这些都说明我们可以通过小鼠的高眼压模型来研究压力导致视神经轴突丧失的机制,另外由于动物实验模型使用的动物不同,高眼压的制作方法也多种多样,包括持续光照模型、高渗盐水模型、巩膜静脉烧灼模型、巩膜静脉结扎模型、微球前房注射等。

小鼠有着与人相似的眼球结构、易于进行转基因操作等特点促使了小鼠高眼压模型的开发。但是小鼠眼球很小,传统用于大鼠、猴子和兔等的模型研究方法均不能直接用于研究小鼠。目前以激光诱发的小鼠高眼压模型应用最为广泛。Aihara等^[2]首次采用玻璃微管抽掉小鼠房水,使前房变浅,532-二极管激光(能力200mW、时间0.05s、光斑大小200μm、光斑数目64±6个)光凝小鼠角膜缘的方法造成了小鼠的眼内压升高,在实验的22只NIH black Swiss小鼠中,15只术眼于术后1wk,9眼于术后4wk,5眼于术后12wk眼压升高均超过30%,最高眼压达到了39.6mmHg。与此同时,Grozdanic等^[9]采用联合前房内注射吲哚青绿和二极管激光光凝小梁网的方法制作小鼠高眼压模型,由于吲哚青绿的染色作用和激光直接光凝小梁网,术眼的眼内压明显升高,最高的达到45mmHg,高眼压状态可持续到60d。最近有学者利用病毒载体使人MYOC(糖皮质激素诱导的小梁网反应蛋白)突变株在小鼠眼内过度表达,导致眼内压显著增加^[10]。

本实验中,我们通过激光光凝小鼠角膜缘制作高眼压模型,取得了比较好的效果。75%实验小鼠眼压升高,而且整个过程中严重并发症发生的几率非常小。为了使小鼠青光眼模型制作成功,我们采取了以下方法:(1)术前释放房水,前房变浅,房角关闭,这样就明显增加激光光凝

的作用,房水外流受阻。而且,房角关闭还有利于术中减少出血的发生;(2)术前30min用阿托品散大瞳孔,有利于虹膜根部与周边部角膜在激光光凝的作用下粘连。阿托品还有减轻炎症的作用,术后我们观察到小鼠眼前段的炎症在几天内就消失,方便清楚的了解眼前段和眼底的情况;(3)由于小鼠的巩膜菲薄,激光的烧灼容易产生并发症,所以术中激光光凝时需准确定位;(4)由于较大的穿刺口会造成房水持续外流,使得眼压过低,所以在进行角膜缘穿刺时,针头不要反复进出穿刺口。

用这种方法建立小鼠高血压模型简单易行,所有的操作均在眼外进行,可以最大程度的减少眼内组织结构的破坏和干扰,有效的减少试验中的干扰因素。

参考文献

- Hatt S, Wormald R, Burr J. Screening for prevention of optic nerve damage due to chronic open angle glaucoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;18(4): CD006129
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(10): 4314-4320
- Lindsey JD, Weinreb RN. Elevated intraocular pressure and transgenic applications in the mouse. *J Glaucoma* 2005;14(4): 318-320
- Smith RS, Zabaleta A, Savinova OV, et al. The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death. *BMC Dev Biol* 2001;1:3
- Lindsey JD, Weinreb RN. Identification of the mouse uveoscleral outflow pathway using fluorescent dextran. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(7): 2201-2205
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(12): 5168-5173
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure. *Exp Eye Res* 2003;77(6): 681-686
- Saeki T, Ota T, Aihara M, et al. Effects of prostanoid EP agonists on mouse intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5): 2201-2208
- 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
- Shepard AR, Jacobson N, Millar JC, et al. Glaucoma-causing myocilin mutants require the Peroxisomal targeting signal-1 receptor (PTS1R) to elevate intraocular pressure. *Hum Mol Genet* 2007;16(6): 609-617