

张晶,许凯,梁洁,等. 慢性光照联合氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 692-699.
Zhang J, Xu K, Liang J, et al. A novel murine model of age-related macular degeneration induced by combined chronic exposure to light and hydroquinone [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 692-699.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.002

慢性光照联合氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型

张晶,许凯,梁洁,陈强,马群英,梁丽娜*

(中国中医科学院眼科医院,北京 100040)

【摘要】 目的 采用慢性光照联合氢醌喂食的方法诱导建立小鼠年龄相关性黄斑变性(AMD)模型,观察其病理特征、超微结构及视网膜功能改变,为 AMD 发病机制及防治研究提供新模型。**方法** 4 月龄 C57BL/6 小鼠 20 只随机分为模型组和正常组,每组 10 只。模型组小鼠被喂以基于基础纯净合成的含 8 g/(kg·bw)氢醌的饮食,同时每日接受 12 h,强度 2500 lx 的光照。正常组小鼠被喂以不含氢醌的同配方饮食,正常光照明,饲养 3.5 个月。采用视网膜电图(ERG)、光镜及电子显微镜技术观察两组小鼠视网膜功能和结构改变,TUNEL 方法观察视网膜细胞凋亡情况,免疫荧光法检测视网膜、脉络膜血管内皮生长因子(VEGF)及 CD31 的表达和分布。**结果** ERG 检测结果显示模型组小鼠视网膜功能较正常组下降;光镜观察显示模型组小鼠视网膜色素上皮层呈现萎缩样改变,Bruch 膜结构破坏,可见新生血管样组织细胞长入,感光细胞计数模型组小鼠为(164.67±34.37),正常组为(243.33±15.23),模型组感光细胞数较正常组显著减少,差异有统计学意义($t=-9.77, P<0.05$);透射电子显微镜显示,模型组视网膜的感光细胞的膜盘结构松散变形,部分碎裂,RPE 细胞微绒毛变短,Bruch 膜不规则增厚,外胶原层见层状沉积物,内皮细胞突入 Bruch 膜内。TUNEL 结果显示正常组几乎没有凋亡细胞,模型组视网膜色素上皮细胞(RPE)层及感光细胞层出现了大量凋亡细胞,感光细胞凋亡率(43±2.73)%,两组差异有统计学意义($P<0.01$)。免疫荧光结果显示,正常组外丛状层、神经纤维层可见散在 VEGF 弱阳性表达,模型组除上述细胞外,在 RPE 细胞层亦可见强阳性染色。正常组视网膜各层细胞未见明确 CD31 阳性染色,模型组 RPE 细胞层可见较强 CD31 表达,提示 RPE 层新生血管发生。**结论** 慢性光照联合氢醌饲料喂养的小鼠非常接近人 AMD 的发病进程及特点,可为进一步探讨 AMD 发病机制及防治研究提供可靠的动物模型。

【关键词】 年龄相关性黄斑变性;小鼠模型;光照;氢醌
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0692-08

A novel murine model of age-related macular degeneration induced by combined chronic exposure to light and hydroquinone

ZHANG Jing, XU Kai, LIANG Jie, CHEN Qiang, MA Qunying, LIANG Lina*

(Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China)

Corresponding author: LIANG Lina. E-mail: lianglina163@163.com

【Abstract】 Objective To develop a murine model of age-related macular degeneration (AMD), using combined chronic exposure to light and hydroquinone, and to characterize the pathological and ultrastructural changes, and retinal

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81674033);中国中医科学院中医药“一带一路”合作项目(GH2017-04-02);中国-挪威中医药中心项目(GZYYGJ2018023)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81674033), TCM “Belt and Road Initiative” Cooperative Project Funded by China Academy of Chinese Medical Sciences(GH2017-04-02), Traditional Chinese Medicine Center for China-Norway Project (GZYYGJ2018023).

【作者简介】张晶(1982—),女,助理研究员,眼科学博士,研究方向:干细胞的眼科学应用,视网膜变性类疾病的视神经保护。Email: qdzhangjing@126.com

【通信作者】梁丽娜,研究员,博士生导师。Email: lianglina163@163.com

function, thus to provide a more suitable model for AMD pathogenesis and treatment research. **Methods** Twenty 4-month-old C57BL/6 mice were randomly divided into a model group and a normal group, with 10 mice in each. The mice in the model group were fed a diet containing 8 g/(kg·bw) hydroquinone and received 12 h light exposure daily with an intensity of 2500 lx. Mice in the normal group were fed with the same diet without hydroquinone, and were exposed to conventional illumination. After 3.5 months, light and electron microscopy and electroretinograms (ERGs) were used to detect structural and functional changes in the retina. Photoreceptor apoptosis was evaluated with TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining, and vascular endothelial growth factor (VEGF) and cluster of differentiation 31 (CD31) expression and distribution were detected by immunofluorescence. **Results** ERGs showed that retinal function of the mice in the model group was lower than that of mice in the normal group. Light microscopy showed atrophic changes in the retinal pigment epithelium (RPE) layer in the model group, and a reduced number of photoreceptor cells (164.67 ± 34.37 versus 243.33 ± 15.23 in the normal group). There were significantly fewer photoreceptor cells in the model group than in the normal group ($t = -9.77$, $P < 0.05$). Transmission electron microscopy showed that the photoreceptor outer segments of the mice in the model group were loose, deformed and partially fragmented. In addition, the RPE-cell microvilli were shortened; the Bruch's membrane became irregularly thickened; and endothelial cells from the choroidal capillary basement membrane penetrated into the Bruch's membrane. Apoptosis was rarely found in the normal group. TUNEL staining showed that there were many positive cells in the RPE and photoreceptor layers in the model group. The apoptosis rate was $(43 \pm 2.73)\%$ ($P < 0.01$). Immunofluorescence showed marked VEGF-positive staining in the RPE layer in the model group, whereas no specific staining was found in the normal group. Immunofluorescence of CD31 showed scattered positive staining in the outer plexiform layer and ganglion cell layer in the normal group, whereas it could also be found in the RPE layer in the model group, which indicated the development of neovascularization. **Conclusions** The retinas of mice treated with combined hydroquinone and chronic light damage closely mimic the development and characteristics of human AMD, this may provide a reliable animal model for further studies of AMD pathogenesis and management.

[Keywords] age related macular degeneration; mouse model; light exposure; hydroquinone

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是 55 岁以上人群主要的致盲眼病之一。随着中国老龄化问题的日益严重, 其患病率逐年升高, 其发病机制和防治成为研究的热点, 合适的动物模型是相关研究工作的重要工具。近年来国内外建立了各种 AMD 动物模型^[1], 不同的动物模型各有其优缺点, 理想的动物模型应该更经济和更接近于人类 AMD 自然病程。AMD 的病因和发病机制仍然存在很大的争议, 目前得到公认的是受年龄、基因和环境的影响, 其中吸烟和光暴露是 AMD 发生的重要环境危险因素, 既往大量报道以吸烟、光照诱导出部分 AMD 病理改变动物模型^[2-3], 而人类 AMD 是一个多因素作用、光感受器细胞、RPE 细胞和脉络膜毛细血管之间相互影响形成的复杂“系统”的表现。因此, 联合多种发病诱因, 尽可能模拟 AMD 发生的环境因素, 可能会建立更接近人 AMD 发病机制的动物模型。本研究, 我们采用慢性光照联合氢醌饲料喂养的方法诱导出类似晚期 AMD 病变模型, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 月龄健康雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 20 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2016-0006】。实验动物饲养于中国中医科学院眼科医院实验动物中心屏障级动物房内【SYXK (京) 2014-0019】。温度 (22 ± 5) °C, 湿度 (50 ± 5) %。所有实验操作遵循眼科技视觉研究动物 ARVO 宣言, 并按实验动物 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 试剂与仪器

氢醌 (Sigma-Aldrich, H9003); TUNEL 细胞原位凋亡试剂盒 (Roche Life Science, 12156792910); HE 染色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司, C02-04004); 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶染色液 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, BD PharmingenTM, 564907); 抗荧光淬灭剂 (北京博奥森生物技术有限公司, C-101); DNA 酶 I (大连 TaKaRa 公司, D2270 A); 冰冻包埋剂 (optimal cutting temperature compound, O.C.T, 美国 Sakura 公司, 4583); 4% 多聚

甲醛(北京 Unique 生物科技有限公司, P1110); VEGF(Abcam, ab52917); CD31(Abcam, ab28364); 罗丹明标记的山羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司, AE042337); 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA, 北京博奥森生物技术有限公司, bs-2315)。光学显微镜(DM2500, Leica, 德国), 透射电子显微镜(JEM-1400, 日本电子株式会社, 日本), 冰冻切片机(CM1850, Leica, 德国), 光照度计(北京师范大学光电仪器厂, ST-85, 中国), 大鼠 SPF 级生长繁育饲料(北京科奥协力饲料有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立

动物按照随机数字表法分为模型组 10 只, 正常对照组 10 只。模型组小鼠置于自主设计的 LED 光照装置中(专利号: 2017210439226) 波长 400~750 nm, 光照度计测量, 保证在动物头部水平测量光照强度可达 2500 lx, 每日接受 12 h 光照; 同时被喂以基于基础纯净合成的含 8 g/(kg·bw) 的饮食; 正常组小鼠被喂以不含氢醌的同配方饮食, 正常昼夜节律饲养。两组动物饲养 3.5 个月后进行模型评价。

1.2.2 视网膜电图(ERG)检测

各组小鼠于检测前暗适应 24 h, 复方托吡卡胺滴眼液点双眼常规散瞳 20 min; 采用盐酸氯胺酮-盐酸塞拉嗪混合麻醉剂($v:v=1:7$) 肌注(0.01 mL/kg) 麻醉小鼠。检测操作全程均在弱红光灯下进行。将参考电极和接地电极分别置于小鼠正中头皮下及双下肢皮下。将双侧角膜电极置于大鼠双侧眼睑内, 保持各电极间阻抗始终 $<5\text{ k}\Omega$ 。以 Ganzfeld 全视野刺激器进行刺激, 根据国际临床视觉电生理协会(ISCEV) 制定的最新国际标准^[4], 依次选定暗适应 0.01 ERG, 暗适应 3.0 ERG, 暗适应 3.0 震荡电位, (自动明适应 10 min) 明适应 3.0 ERG, 闪烁光反应进行检测。依次记录各组 a 波、b 波的峰时值(ms) 和振幅值(μV)。

1.2.3 视网膜光镜观察

颈椎脱臼法处死小鼠, 快速摘取眼球, 1 mL 注射器角膜穿刺置于 4% 多聚甲醛固定 20 min, 解剖显微镜下小心去除眼前节和部分玻璃体, 余下组织继续固定 24 h, 梯度酒精脱水、二甲苯透明后浸蜡包埋。连续 4 μm 切片, 切片常规脱蜡至水后行 HE 染色, 光学显微镜观察视网膜各层病理改变。

1.2.4 视网膜透射电镜检测

颈椎脱臼法处死小鼠, 快速摘取眼球, 立刻置于 4℃, 2.5% 戊二醛中固定 0.5 h, 显微镜下去除眼前节组织及部分玻璃体, 保留视杯, 解剖显微镜下

切取视乳头颞侧 1 mm 上方全层眼球壁, 大小 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 2 mm。戊二醛固定、梯度酒精脱水、环氧树脂树脂浸透包埋组织, 制作 900 nm 超薄切片, 醋酸双氧铀、枸橼酸铅避光染色、风干, 透射电子显微镜观察视网膜超微结构。

1.2.5 TUNEL 检测视网膜细胞凋亡

动物眼球取材固定同 HE 染色, 4% 多聚甲醛液中 4℃ 固定 24 h 后, 冰冻包埋剂 OCT 包埋后液氮冷冻。冰冻切片机-23℃ 下行垂直视网膜的 8 μm 冰冻切片。冰冻切片磷酸缓冲液(PBS) 室温 15 min $\times$ 3 次洗脱包埋剂, 进行 TUNEL 检测, 具体操作参见试剂盒说明, 完成后进行 DAPI 复染细胞核, 抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜下观察。每组随机选取 10 张片子, 每张切片计数一个高倍视野下调亡的感光细胞数及感光细胞总数, 计算凋亡率。

1.2.6 免疫荧光检测 VEGF 及 CD31 表达

将冰冻切片置于磷酸缓冲液(PBS) 室温 10 min $\times$ 3 次, 然后置于 1% Triton X-100 溶液 30 min, 2% 牛血清白蛋白的室温封闭 2 h 后依组别分别滴加一抗 VEGF, CD31, 4℃ 孵育过夜。PBS 溶液室温洗涤 10 min $\times$ 3 次, 滴加罗丹明标记的山羊抗小鼠二抗, 室温下孵育 1 h, PBS 清洗 10 min $\times$ 3 次, DAPI 复染细胞核 5 min。抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件包进行分析, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数比较采用独立样本 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜电图(ERG)检测

暗适应 0.01 ERG 正常组视网膜 b 波振幅(234.00 ± 20.95) μV , 模型组 b 波振幅(113.00 ± 16.13) μV , 模型组较正常组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 暗适应 3.0 ERG 正常组 b 波振幅(355.50 ± 61.08) μV , 模型组(129.00 ± 18.05) μV , 模型组较正常组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。暗适应 3.0 震荡电位正常组 b 波振幅(575.00 ± 115.11) μV , 模型组(284.25 ± 55.25) μV , 两组差异有统计学意义($P<0.05$); 明适应 3.0 ERG 正常组 b 波振幅(138.00 ± 17.53) μV , 模型组(44.50 ± 7.59) μV , 较正常组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 闪烁光反应正常组 b 波振幅(163.00 ± 30.27), 模型组(50.50 ± 11.03) μV , 模型组较正常组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 见表 1。

表 1 正常组及模型组视网膜电图检测结果比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Electroretinogram (ERG) test between the normal and model groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Groups	暗适应 0.01 ERG Scotopic 0.01 ERG (μV)	暗适应 3.0 ERG Scotopic 3.0 ERG (μV)	暗适应 3.0 震荡电位 Scotopic 3.0 oscillatory potentials(μV)	明适应 3.0 ERG Photopic 3.0 ERG (μV)	闪烁光反应 Photopic 3.0 flicker (μV)
正常组 Normal group	234.00±20.95	355.50±61.08	575.00±115.11	138.00±17.53	163.00±30.27
模型组 Model group	113.00±16.13	129.00±18.05	284.25±55.25	44.50±7.59	50.50±11.03
<i>t</i> 值 <i>t</i> value	11.04	9.91	10.21	34.03	30.44
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000

2.2 视网膜结构光镜观察

正常组视网膜各层结构排列规整,细胞形态均一,视网膜色素上皮层连续整齐,与正常组相比,模型组视网膜各层结构排列较为疏松,感光细胞较正常组减少,视网膜色素上皮层呈现萎缩样改变,Bruch 膜结构破坏,可见血管样组织长入,部分区域增厚,部分区域变薄,感光细胞计数正常组为(243.33±15.231),模型组(164.67±34.37),模型组感光细胞数目明显低于正常组,差异有统计学意义($t=-9.77, P<0.05$),见图 1。

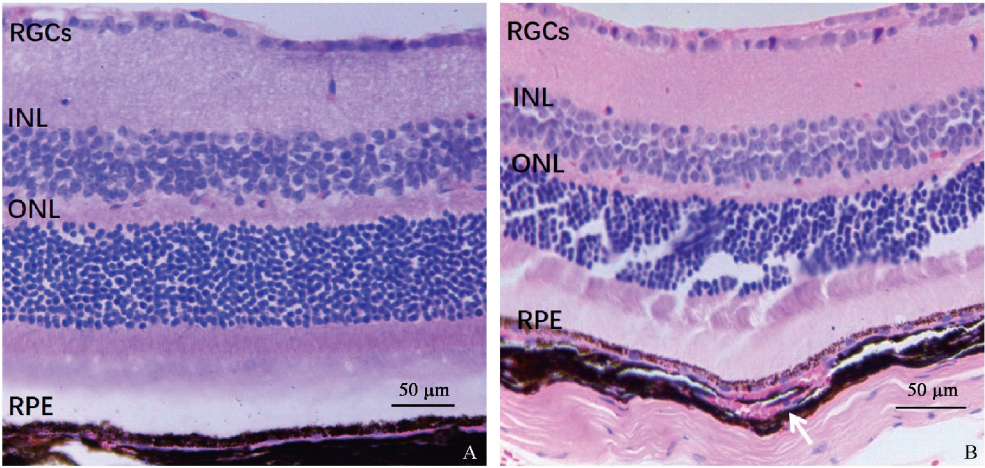
2.3 视网膜电镜观察

正常组小鼠视网膜感光细胞膜盘结构清晰,排

列整齐,色素上皮细胞线粒体丰富,顶部微绒毛数量多而且长,Bruch 膜结构规整,厚度均匀。模型组小鼠感光细胞膜盘结构松散变形,出现分离、碎解,固缩等改变。视网膜色素上皮细胞内色素粒减少,顶部微绒毛较正常组稀疏变短,RPE 下可见沉积物,Bruch 膜结构不规整,厚度不均匀,部分出现中断,内皮细胞长入,见图 2。

2.4 视网膜细胞凋亡情况

正常组视网膜各层细胞核排列规整,几乎未见凋亡细胞,模型组感光细胞层细胞核较正常组减少,可发现明显的凋亡现象,感光细胞凋亡率(43.00±2.73)%。见图 3。

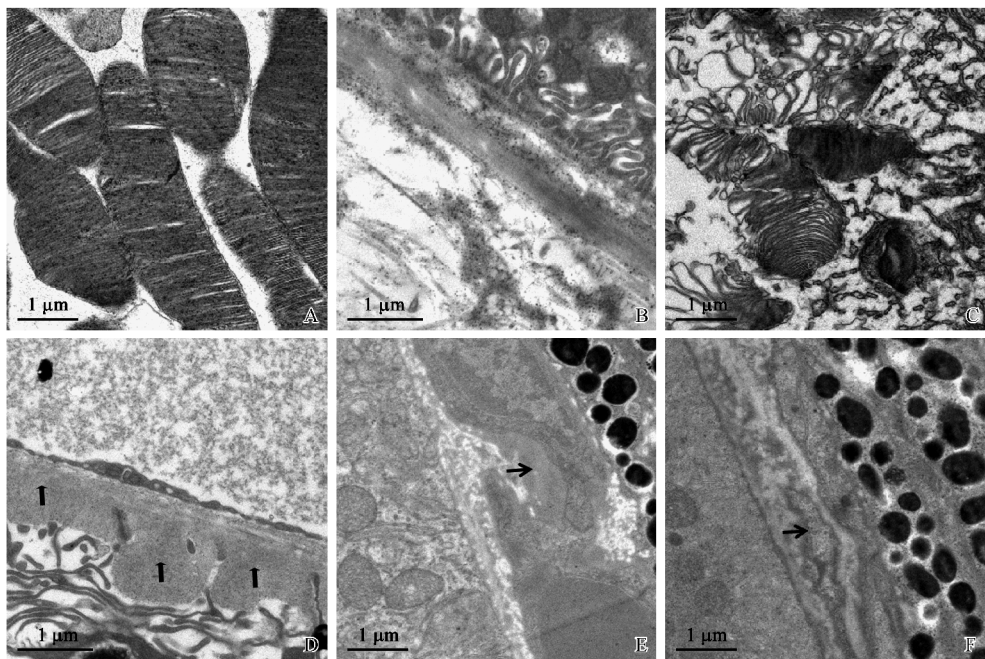


注:A:正常组,视网膜各层结构排列规整,细胞形态均一,视网膜色素上皮层连续整齐。B:模型组,视网膜各层结构排列较为疏松,感光细胞较正常组减少,视网膜色素上皮层呈现萎缩样改变,Bruch 膜可见中断,血管样组织长入(白色箭头)。RGCs:视网膜神经节细胞;INL:内核层;ONL:外核层;RPE:视网膜色素上皮层。

图 1 正常组及模型组视网膜病理图像(HE 染色,×400)

Note.A, Normal group, the retina layers were arranged regularly, the cell morphology was uniform, and the retinal pigment epithelium layers were continuous and orderly. B, Model group, the arrangement of retinal layers was looser, the number of photoreceptor cells was less than which in normal group, the RPE layer showed atrophic changes, Bruch membrane was interrupted, and vascular-like tissue grew into (white arrow). RGCs:Retinal ganglion cells. INL:Inner nuclear layer. ONL: Outer nuclear layer. RPE:Retinal pigment epithelium layer.

Figure 1 Pathological changes of the retinas in the normal and model groups(HE staining,×400)

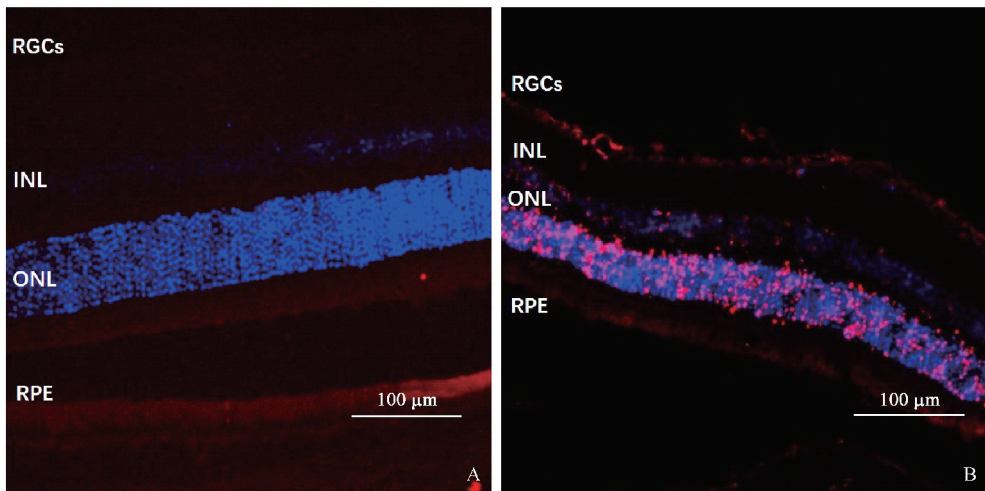


注：A、B 正常组，A 图示膜盘结构，B 图示 Bruch 膜及周围结构。C-F 模型组，C 图可见盘膜结构散乱变形，D-F 图色素上皮细胞顶部微绒毛稀疏变短，RPE 下沉积物（箭头），Bruch 膜不规则，可见中断，内皮细胞长入（黑色箭头）。

图 2 小鼠视网膜透射电子显微镜图

Note. A, B. Normal group. A, Structure of the rod outer segment. B, Bruch membrane and its surrounding structures. C-F. Model groups. C. The disc membrane structure was disorganized and deformed. D-F. the microvilli at the top of the pigment epithelial cells were sparse and shorter, the deposits under RPE (arrow), the Bruch membrane was irregular, and the endothelial cells grew in (black arrow).

Figure 2 Transmission electron micrographs of the mouse retinas



注：A：正常组，未见凋亡细胞；B：模型组，视网膜感光细胞层可见大量凋亡细胞，凋亡细胞呈红色，蓝色为 DAPI 复染细胞核。RGCs：视网膜神经节细胞；INL：内核层；ONL：外核层；RPE：视网膜色素上皮层。

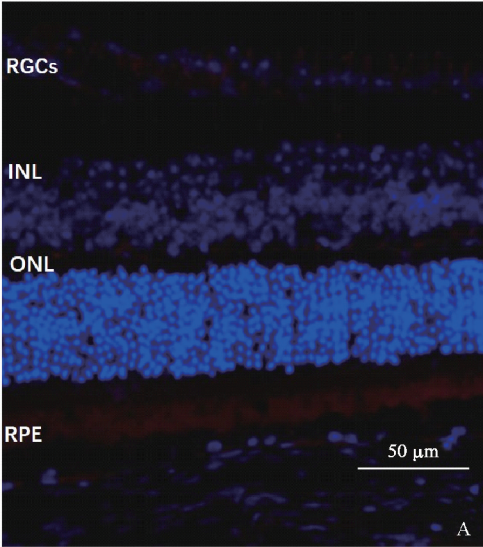
图 3 TUNEL 检测正常组及模型组视网膜感光细胞凋亡情况

Note. A, Normal group, showing no apoptotic cells. B, Model group, showing a large amount of apoptotic cells (red) in the photoreceptor layer of the retina. The cell nuclei were stained as blue by DAPI. (RGCs: Retinal ganglion cells; INL: Inner nuclear layer; ONL: Outer nuclear layer; RPE: Retinal pigment epithelium layer)

Figure 3 Apoptosis in photoreceptor cells of the normal and model groups (TUNEL staining)

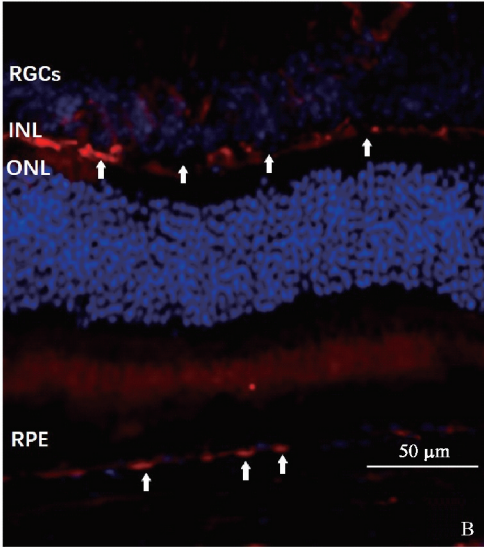
2.5 视网膜 VEGF 表达情况

正常组视网膜未见明确的 VEGF 表达,模型组视网膜色素上皮层及内核细胞层可见较强的 VEGF 阳性染色。见图 4。



2.6 视网膜 CD31 表达情况

正常组视网膜未见明确的 CD31 表达,模型组视网膜色素上皮层可见较强的 CD31 阳性染色。见图 5。

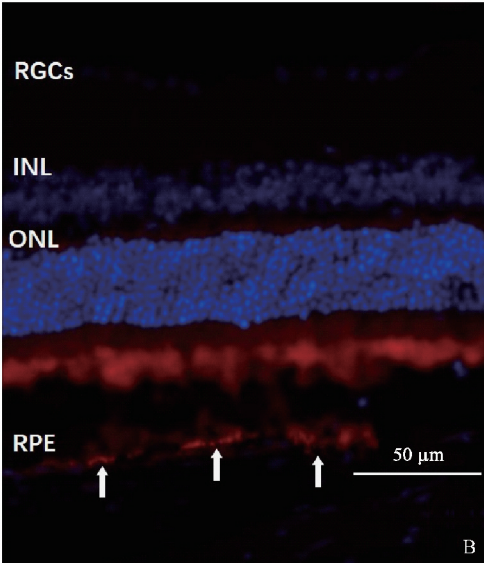
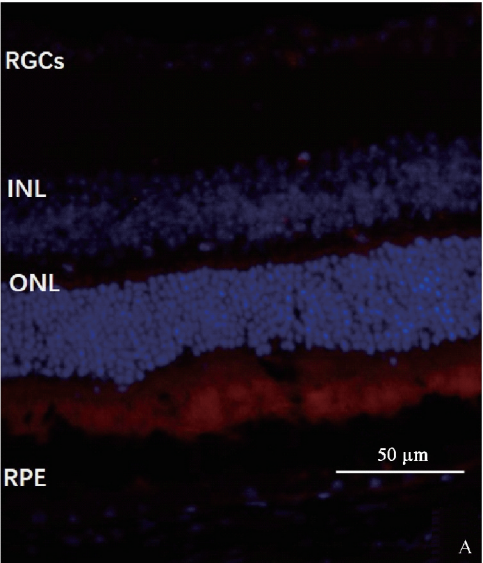


注:A:正常组,未见明确 VEGF 染色;B:模型组,视网膜色素上皮层及内核层可见 VEGF 阳性染色呈红色(白箭),蓝色信号为 DAPI 复染的细胞核。RGCs:视网膜神经节细胞;INL:内核层;ONL:外核层;RPE:视网膜色素上皮层。

图 4 免疫荧光检测正常组及模型组视网膜 VEGF 表达情况

Note. A, Normal group, showing no VEGF-stained cells. B, Model group, showing VEGF-positive cells in both RPE layer and the inner nuclear layer (white arrow), and all the cell nuclei were stained as blue by DAPI. RGCs: Retinal ganglion cells; INL: Inner nuclear layer; ONL: Outer nuclear layer; RPE: Retinal pigment epithelium layer.

Figure 4 VEGF expression in the retina tissues of normal and model groups(Immunofluorescence staining)



注:A:正常组,未见明确 CD31 染色;B:模型组,视网膜色素上皮层可见 CD31 阳性染色呈红色(白箭),蓝色信号为 DAPI 复染的细胞核。RGCs:视网膜神经节细胞;INL:内核层;ONL:外核层;RPE:视网膜色素上皮层。

图 5 免疫荧光检测正常组及模型组视网膜 CD31 表达情况

Note. A, Normal group, showing no significant CD31-stained cells. B, Model group, showing numerous CD31-positive cells in the retinal pigment epithelium (white Arrows), and all the cell nuclei were stained as blue by DAPI. RGCS: Retinal ganglion cells; INL: Inner nuclear layer; ONL: Outter nuclear layer; RPE: Retinal pigment epithelium layer.

Figure 5 CD31 expression in the retinas of the normal and model groups(Immunofluorescence staining)

3 讨论

目前用于 AMD 研究的动物模型种类较多,如 AMD 易感基因工程动物模型^[5];激光诱导脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)模型,玻璃体腔注射生长因子诱发脉络膜视网膜新生血管模型,静脉注射碘酸钠诱导视网膜损伤模型,光致视网膜损伤模型等^[6]。模型各有特点,但大多偏重于 AMD 某种病理特征。部分基因工程小鼠模型虽可以呈现人类 AMD 的特征性变化,但模型建立费用高昂,动物因免疫缺陷及代谢异常存活率低,不易于普及利用。理想动物模型应更近似于临床 AMD 发病过程,大量研究证实衰老、吸烟^[7-8]及持续可见光暴露^[9-11]与 AMD 发生的关系密切。故本研究选择氢醌饲料喂养及慢性可见光暴露模拟 AMD 发病的环境危险因素。氢醌是香烟中的主要有害物质,具有极强的氧化性,既往研究证实,置于吸烟环境中的小鼠可出现视网膜色素上皮层下沉积物、Bruch 膜变薄及 RPE 细胞凋亡等改变,与人类 AMD 早期改变类玻璃膜疣形成相似^[12]。体外实验证实,氢醌处理体外培养的 ARPE-19 细胞系,可观察到细胞出现过氧化损伤,大量亲电子化合物细胞内蓄积并诱发内质网应激反应,引起细胞系列损伤^[13-16]。本课题组前期实验利用含 0.8 g/(kg·bw) 氢醌饲料喂养小鼠 3.5 月后,观察到视网膜色素上皮-脉络膜下出现类玻璃膜疣状物沉积,但光感受器细胞病变并不明显^[3]。光损伤是 AMD 另一个重要的环境危险因素,AMD 发病与长期低强度光损伤有关。研究发现可见光通过光毒性和化学毒性导致视网膜感光细胞及 RPE 损伤^[17],实验证实,应用光照强度为 2500 lx 的白色光源照射 2 月龄小型猪 3 个月后,视网膜发生慢性损伤,以视网膜 RPE 细胞及感光细胞凋亡为特点,内核层细胞数量减少,视网膜厚度降低^[18-19]。此外研究证实,吸烟与可见光暴露对于视网膜细胞损伤还存在交互作用,Zinfflow 等^[20]实验发现香烟烟雾成分可导致 RPE 细胞对于蓝光呈现较高的吸收率,导致 RPE 细胞光损伤加剧。因此,将吸烟与光照两种 AMD 发病诱因相联合,有可能建立与 AMD 自然病程及病理特点更接近的动物模型。

人类 AMD 是涉及光感受器细胞、RPE 细胞以及脉络膜血管病变的复杂病理过程。早期病变为视网膜黄斑区出现玻璃膜疣状沉积物 drusen,直径

65~125 μm , RPE 细胞无异常改变;进入中期,黄斑区可见直径 125 μm 以上 drusen 形成,同时伴有 RPE 细胞色素紊乱;随着病情进展,视网膜 RPE 局灶性脱离,内层视网膜细胞萎缩;晚期可见脉络膜新生血管长入 Bruch 膜或视网膜地图状萎缩,前者又被称为湿性 AMD,后者为干性 AMD^[21]。本实验选择 C57BL/6 近交系小鼠为观察对象,尽管小鼠视网膜缺乏确切的黄斑结构,但其视网膜光感受器细胞、RPE 细胞、Bruch 膜及脉络膜血管等结构与人类视网膜结构极为类似,因此观察小鼠视网膜各结构在 AMD 重要发病因素作用下的病理变化,可为研究人类 AMD 的发生提供客观的基础数据。本实验将 AMD 发病的重要危险因素相联合,4 月龄 C57BL/6 小鼠依据发育周期已属于中年^[22],历经 3.5 个月实验周期恰好进入老年期;每日以含有 0.8 g/(kg·bw) 氢醌饲料喂养小鼠模拟吸烟环境;采用自主设计的 LED 冷光源灯架,光源波长范围为 400~750 nm 模拟人眼可感知的光波范围,以光照强度 2500 lx 每日光照小鼠 12 h,进行慢性光诱导视网膜损伤,既保持动物正常的昼夜节律,又模拟人类随着时间进展视网膜细胞不断发生变化的特点,进而对模型组动物视网膜进行功能学和形态学评价。模型组动物 ERG 结果暗适应 0.01 ERG,暗适应 3.0 ERG 以及明适应 3.0 ERG 的 b 波振幅降低,提示视网膜光感受器细胞以及内层视网膜细胞发生损伤,与人类视网膜变性类疾病 ERG 呈现类似的变化趋势;电镜观察到模型组视网膜感光细胞膜盘结构松散变形,碎解,RPE 细胞内色素粒减少,下方可见沉积物;上述变化与本课题组前期实验单纯氢醌喂养小鼠结果一致^[3],此外视网膜还出现 Bruch 膜结构及厚度均欠规整,部分出现中断,内皮细胞长入等变化。光镜下不但观察到模型组视网膜内、外核层细胞数量显著减少($t=-9.77$, $P<0.05$),RPE 细胞呈现萎缩状态,还可见血管样组织由脉络膜层向内长入,破坏 Bruch 膜结构,经免疫荧光检测该区域内与血管生长密切相关的因子 VEGF、CD31 呈阳性表达,提示病变向中晚期进展。

本研究选择 AMD 发病的高危因素:衰老、吸烟以及持续可见光暴露建立动物模型,实验动物不但出现类似于玻璃膜疣的视网膜下沉积物,还可观察到 Bruch 膜破坏,血管样结构由脉络膜向内长入等更类似于临床晚期 AMD 的病理特征。实验动物选择遗传背景清晰的近交系小鼠,个体差异小,模型

建立过程操作难度适中,可重复性高,为进一步研究 AMD 发病、预防及治疗提供了较好的研究工具。本次研究未发现突破 RPE 层的典型脉络膜新生血管组织,可能与观察时间较短有关,在今后的研究中延长造模时间,同时增加脉络膜铺片等观察方法进一步明确 CNV 的生长和发展。

参 考 文 献(References)

- [1] Shah M, Cabrera-Ghayouri S, Christie L, et al. Translational preclinical pharmacologic disease models for ophthalmic drug development [J]. *Pharm Res*, 2019, 36(4): 36-58.
- [2] 孟昭君,陈晓勇,张晶,等. 三种不同辐照度的 460~480 nm 波长光对 SD 大鼠视网膜组织结构的影响 [J]. *中华眼科杂志*, 2013, 49(5): 438-446.
Meng ZJ, Chen XY, Zhang J, et al. Influence of 460-480 nm light at three different irradiance in retina tissue of SD rats [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2013, 49(5): 438-446.
- [3] 安娜,陈强,梁丽娜,等. 氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型的建立 [J]. *眼科新进展*, 2016, 36(7): 605-608.
An N, Chen Q, Liang LN, et al. Establishment of hydroquinone induced age-related macular degeneration model in mice [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2016, 36(7): 605-608.
- [4] McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update) [J]. *Doc Ophthalmol*, 2015, 130(1): 1-12.
- [5] Chan C, Ross RJ, Shen D, et al. *Ccl2/Cx3cr1* deficient Mice: An animal model for age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmic Res*, 2008, 40(3-4): 124-128.
- [6] 许竹青,魏伟. 老年黄斑变性的动物模型研究进展 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2015, 25(1): 62-65.
Xu ZQ, Wei W. Reserch progress of animal models for age-related macular degeneration [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2015, 25(1): 62-65.
- [7] Al-Zamil W, Yassin S. Recent developments in age-related macular degeneration: A review [J]. *Clin Interv Aging*, 2017, 8(12): 1313-1330.
- [8] Bellezza I. Oxidative stress in age-related macular degeneration: Nrf2 as therapeutic target [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 11(9): 1280-1287.
- [9] Schick T, Ersoy L, Lechanteur YT, et al. History of sunlight exposure is a risk factor for age-related macular degeneration [J]. *Retina*, 2016, 36(4): 787-790.
- [10] Singh N, Srinivasan S, Muralidharan V, et al. Prevention of age-related macular degeneration [J]. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 2017, 6(6): 520-526.
- [11] Lambert NG, Singh MK, ElShelmani H, et al. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 9(54): 64-102.
- [12] Cano M, Thimmalappula R, Fujihara M, et al. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and age-related macular degeneration [J]. *Vision Res*, 2010, 50(7): 652-664.
- [13] Forest DL, Johnson LV, Clegg DO. Cellular models and therapies for age-related macular degeneration [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(5): 421-427.
- [14] Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, et al. Human retinal pigment epithelial cell proliferation by the combined stimulation of hydroquinone and advanced glycation end-products via up-regulation of VEGF gene [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2015, 4(2): 123-131.
- [15] Huang C, Wang JJ, Ma JH, et al. Activation of the UPR protects against cigarette smoke-induced RPE apoptosis through up-regulation of Nrf2 [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(9): 5367-5380.
- [16] Satoh T, Stalder R, Mckercher SR, et al. Nrf2 and HSF-1 pathway activation *via* hydroquinone-based proelectrophilic small molecules is regulated by electrochemical oxidation potential [J]. *ASN Neuro*, 2015, 7(4): 1-13.
- [17] 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 [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 2(18): 6-19.
- [18] 陈少军,阴正勤,李世迎,等. 慢性光诱导建立微型猪视网膜变性模型的研究 [J]. *眼科研究*, 2008, 26(10): 735-738.
Chen SJ, Yin ZQ, Li SY, et al. The study of a chronic light-induced retinal degeneration model in miniature pigs [J]. *Chin Ophthal Res*, 2008, 26(10): 735-738.
- [19] 刘俊,徐海伟,李世迎,等. 可见光诱导广西巴马小型猪视网膜变性的实验研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(24): 2614-2618.
Liu J, Xu HW, Li SY, et al. Experimental study of light-induced retinal degeneration in Guangxi Bama miniature pigs [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2013, 35(24): 2614-2618.
- [20] Zinlou C, Rochette PJ. Absorption of blue light by cigarette smoke components is highly toxic for retinal pigmented epithelial cells [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(2): 453-465.
- [21] 李筱荣. “中国老年性黄斑变性临床诊断治疗路径”解读 [J]. *实用老年医学*, 2014, 28(10): 877-880.
Li YR. Interpretation of the path of clinical diagnosis and treatment of age-related macular degeneration in China [J]. *Pract Geriatr*, 2014, 28(10): 877-880.
- [22] 秦川. 医学实验动物学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2015.
Qin C. Medical laboratory animal science [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015.

[收稿日期] 2019-03-07