

熊亚妮,孟永,钱仪敏,等. Long Evans 大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型的特征及其造模前后谷氨酸的含量 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 54-61.

Xiong YN, Meng Y, Qian YM, et al. Characteristics of the Long Evans model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats and the content of glutamate before and after modeling [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 54-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.007

Long Evans 大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型的特征及其造模前后谷氨酸的含量

熊亚妮^{1,2,3}, 孟永³, 钱仪敏², 张鹏², 张慧⁴, 李华^{2,3*}

(1.上海工程技术大学,上海 201620;2.中国医药工业研究总院上海益诺思生物技术股份有限公司,上海 201203;
3.益诺思生物技术南通有限公司,江苏 海门 226133;4.上海鼎岳生物技术有限公司,上海 201315)

【摘要】 目的 观察 Long Evans 大鼠视网膜缺血再灌注 (retinal ischemia reperfusion, RIR) 损伤后视网膜的功能、结构及谷氨酸含量的变化,为视网膜的损伤及可能保护机制研究提供参考。方法 随机选取 30 只成年 SPF 级 Long Evans 大鼠,对其左眼前房持续 60 min 灌注高压生理盐水 (132 mmHg),构建 RIR 损伤模型,右侧眼不处理作为自身对照。在造模后 1、3、7 和 14 d,利用闪光全视网膜电图 (flash electroretinogram, f-ERG) 检测视网膜电生理功能的变化情况;在造模前及造模后 3、7、14 d,利用光学相干断层技术 (optical coherence tomography, OCT) 测量视网膜厚度,眼底成像观察眼底血管的变化情况;于造模后 14 d 处死大鼠,进行石蜡包埋、苏木精伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色和缺口末端标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 荧光染色观察视网膜形态结构、细胞凋亡及分布情况,ELISA 检测视网膜谷氨酸的含量。结果 与对照眼相比,造模眼从第 1 天开始视网膜电图 b 波振幅极显著下降 ($P<0.01$),潜伏期极显著延迟 ($P<0.01$);OCT 显示从第 3 天开始视网膜神经节细胞复合体 (retinal ganglion cell complex, GCC) 厚度极显著变薄 ($P<0.01$),从第 7 天开始全层视网膜厚度极显著变薄 ($P<0.01$),且都随着时间延长越来越薄 ($P<0.05$);眼底照片显示视网膜从第 3 天开始出现明显的缺血,一直到第 14 天都没有恢复到正常水平;第 14 天 HE 染色切片结果显示视网膜萎缩,内层明显变薄,视网膜神经节细胞 (ganglion cells, RGCs) 减少;TUNEL 荧光染色结果显示视网膜各层出现明显的细胞凋亡;ELISA 结果显示造模后视网膜谷氨酸含量增加 ($P<0.05$)。结论 Long Evans 大鼠 RIR 损伤引起视觉电生理功能严重损伤,视网膜萎缩,尤其 GCC 厚度减少最明显,且随着时间延长损伤加剧,不可逆转,RGCs 凋亡,眼底血管缺血,视网膜谷氨酸含量增加,为视网膜损伤类疾病的研究提供良好的动物模型。

【关键词】 Long Evans 大鼠;RIR 损伤;视网膜;谷氨酸;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0054-08

Characteristics of the Long Evans model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats and the content of glutamate before and after modeling

XIONG Yan^{1,2,3}, MENG Yong³, QIAN Yimin², ZHANG Peng², ZHANG Hui⁴, LI Hua^{2,3*}

(1. Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China.
2. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai InnoStar Biotech Co., Ltd, Shanghai 201203.
3. InnoStar Biotech Haimen Co., Ltd, Haimen 226133. 4. Shanghai Dingyue Biotechnology Co., Ltd, Shanghai 201315)

【基金项目】 江苏省创新能力建设计划科技公共服务平台项目 (BM2021002)。

【作者简介】 熊亚妮 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物眼科毒理研究。E-mail: xyn152472@163.com

【通信作者】 李华 (1978—), 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向: 药物毒理研究。E-mail: hli@innostar.cn

[Abstract] Objective To observe changes in retinal functions, structure, and glutamate content after retinal ischemia-reperfusion(RIR)injury in Long Evans rats to provide a reference for the study of retinal injury and possible protective mechanisms. **Methods** Thirty adult SPF level Long Evans rats were randomly selected, and the left anterior chamber of their left eye was perfused with high-pressure normal saline for 60 minutes to establish an RIR injury model, while the right eye was untreated as a control. At 1, 3, 7, and 14 days after modeling, changes in retinal electrophysiological functions were assessed by flash electroretinogram. The retinal thickness was measured by optical coherence tomography(OCT)before and at 3, 7 and 14 days after modeling. Changes in fundus vessels were observed by fundus angiography. Rats were sacrificed at 14 days after modeling, and the retinal morphology, apoptosis, and distribution were observed by hematoxylin-eosin (HE) and TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. The content of glutamate in the retina was detected by ELISA. **Results** Compared with control eyes, the B wave amplitude of the electroretinogram in the model eyes were decreased significantly($P<0.01$)and latency was delayed significantly($P<0.01$) from the first day. OCT showed that the thickness of the retinal ganglion cell complex(GCC)was significantly thinner from day 3($P<0.01$), the thickness of the whole retina was significantly thinner from day 7($P<0.01$), and both of them became thinner over time($P<0.05$). Fundus images showed that the retina had obvious ischemia from day 3 and did not recover to the normal level until day 14. On day 14, the HE staining showed retinal atrophy, obvious thinning of the inner layer and a reduction of retinal ganglion cells. TUNEL staining showed obvious apoptosis in all retinal layers. ELISAs showed that the glutamic acid content in the retina was increased after modeling($P<0.05$). **Conclusions** RIR injury in Long Evans rat causes serious damage to visual electrophysiological functions, retinal atrophy, an obvious reduction in the GCC thickness over time that becomes irreversible, RGC apoptosis, fundus vascular ischemia, and an increased retinal glutamate content, thereby providing a good animal model to study retinal injury diseases.

[Keywords] Long Evans rats; RIR injury; retina; glutamate; animal model

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

RIR 损伤与多种视网膜疾病相关,如糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜动脉阻塞和青光眼等,是一种常见的视网膜疾病发生机制。RIR 损伤会造成进行性的视网膜及其相关神经细胞(如 RGCs)的损伤,从而导致不可逆的视力丧失^[1-3]。RIR 造成的损伤是多因素综合作用的结果,兴奋性氨基酸学说是其机制之一。在脊椎动物的视网膜中,谷氨酸是必不可少的兴奋性神经递质,在视觉信号的传递中起着重要作用。正常浓度的谷氨酸可维持 RGCs 的分化状态和代谢活动的正常进行,而在 RIR 过程中细胞间质谷氨酸含量明显升高,过度激活谷氨酸受体,引起兴奋性毒性^[4-5]。

常用的离体或在体 RIR 损伤模型的建立方法有很多种,如钳夹视神经法、前房灌注法及结扎血管法等。其中前房灌注法操作简单,周期短,可重复性高,使用最为广泛^[1,6]。Long Evans 大鼠的视网膜结构与人类相似,含有色素,有较为完整的视觉功能,近年来广泛应用于眼科学的研究^[7-9],但 Long Evans 大鼠 RIR 损伤模型的特征及损伤发展研究较少。因此本研究拟采用前房灌注法构建 Long Evans 大鼠 RIR 损伤模型,通过功能和形态两个方面研究 RIR 损伤后两周内的 Long Evans 大鼠视网膜损伤的

变化过程,包括活体状态下 f-ERG 检测视网膜的视觉功能,OCT 测量 GCC 及视网膜全层厚度,眼底成像观察眼底血管变化情况;HE 和 TUNEL 染色切片观察视网膜形态结构、视网膜细胞凋亡及分布情况,ELISA 检测造模后视网膜谷氨酸表达,以期为 Long Evans 大鼠视网膜损伤及保护机制研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 30 只 SPF 级雄性健康 Long Evans 大鼠,体重 180~260 g,周龄 6~8 周,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001]。实验动物的饲养及实验操作均在益诺思生物技术南通有限公司动物实验研究中心 SPF 级设施中进行[SYXK(苏)2018-0034]。饲养环境:温度为 20~26℃,湿度为 40%~70%,每小时换气次数 ≥ 15 次,使用 100%的全新风,自动光照,每 12 h 明暗交替。饲料和垫料均由北京科澳协力饲料有限公司提供,所有动物均能自由采食,自由饮水。本实验的动物管理和使用申请已获得益诺思生物技术南通有限公司动物管理和使用委员会(IACUC)的批准(IACUC-2022-r-226),并遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

0.9% NaCl 注射液 (D21010906A, 山东科伦药业有限公司); 复方托吡卡胺滴眼液 (J20180051, 参天制药 (中国) 有限公司); 左氧氟沙星滴眼液 CH202005052, 参天制药 (中国) 有限公司); 舒泰® 50 (8ADTA, 法国维克公司); 盐酸赛拉嗪注射液 (8ECXA, 吉林省华牧动物保健品有限公司); 谷氨酸试剂盒 (微量法) (ml895122, 上海酶联生物技术有限公司); 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (C1090, 碧云天生物技术有限公司)。

32G 注射用针针头 (无锡市宇寿医疗器械有限公司); 光学显微镜 (Leica 公司); Diagnosys Celeris 动物电生理仪 (美国 Ellex 公司); 光学相干断层扫描 (德国海德堡公司); 超广角共焦激光造影机 (CRO, 苏州微清医疗器械有限公司); 组织脱水机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 包埋机 (德国 LEICA 公司); 蜡块修整仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 轮转式切片机 (德国 LEICA 公司); 漂片机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 烘片机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 多功能染色封片一体机 (德国 LEICA 公司); 酶标仪 (molecular devices 公司); 共聚焦荧光显微镜 (德国 LEICA 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法

Long Evans 大鼠肌肉注射舒泰和赛拉嗪混合麻醉。复方托吡卡胺用于扩大瞳孔, 0.5% 的盐酸丙美卡因用于角膜表面麻醉。所有操作均遵守无菌的原则。将 32G 注射用针针头由颞侧角膜缘水平刺入大鼠左眼前房中, 固定针头并连接 0.9% 生理盐水输液系统。调整生理盐水高度置于角膜顶点 180 cm, 此高度可在眼内形成 132 mmHg 眼压, 导致眼部缺血, 可见眼前节变白, 高眼压诱导缺血损伤 60 min 后, 关闭静脉输液装置, 移除针头, 视网膜完成再灌注。造模后局部给予左氧氟沙星滴眼液及氧氟沙星眼膏抗感染处理, 右眼作为自身对照眼不作处理。

1.3.2 f-ERG 检查

于造模后 1、3、7、14 d (D1、D3、D7、D14), 用 f-ERG 检查大鼠视网膜的电生理功能, 在进行检查之前, 暗适应至少 6 h, 然后于暗室弱红光照明下, 使用角膜电极作为记录电极轻触角膜, 局部用 1.7% 羟丙甲纤维素溶液保持整个检测过程角膜湿润, 保证

整个测试过程中角膜电极电阻低于 5 kΩ。视网膜电图由 Celeris system (diagnosys) 记录。由于不同只大鼠的 b 波振幅和潜伏期存在差异, 无法进行单纯比较。所以选择每只大鼠的造模眼的 b 波振幅与其对侧正常对照眼的 b 波振幅和潜伏期差值进行同体对照, 来评估损伤变化。

1.3.3 视网膜厚度测量

于造模后 3、7、14 d, 用 OCT 测量视网膜厚度, 其中以距大鼠视神经 1500 μm 位置测量的 GCC, 包括神经纤维层 (nerve fiber layer, NFL)、神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL) 和内丛状层 (inner plexiform layer, IPL) 的总厚度及视网膜全层厚度。

1.3.4 眼底成像

于造模后 3、7、14 d, 大鼠麻醉状态下, 利用超广角共焦激光造影机观察了大鼠造模眼底血管的变化。

1.3.5 HE 染色

于造模后 14 d 麻醉处死大鼠, 摘除眼球置于 4℃ 的改良 Davidson's 溶液中固定至少 72 h, 然后转移到 4% 多聚甲醛溶液中固定至少 24 h 后, 石蜡包埋切片, 切片方向与眼轴平行, 切片取经视神经处, 厚度为 4 μm, 进行 HE 染色。在光学显微镜下观察视网膜形态结构。

1.3.6 TUNEL 荧光染色

石蜡切片用二甲苯脱蜡两次, 无水乙醇、90% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水梯度冲洗。加入蛋白酶 K, 37℃ 孵育 30 min。然后 PBS 冲洗 5 次, 加入 TUNEL 检测液 37℃ 避光孵育 60 min。PBS 冲洗, 吸干液体, 加入一滴荧光淬灭封片液, 封片, 避光下共聚焦荧光显微镜观察。

1.3.7 谷氨酸含量测定

于造模后 1、7、14 d, 将动物安乐死后, 腹主动脉放血, 摘取眼球。在眼科手术显微镜下分离视网膜。用滤纸吸干水分, 称取视网膜重量, 按体重比 1:10 加入提取液, 充分混匀后, 进行冰浴匀浆, 离心, 取上清液待检测。具体检测步骤根据试剂盒说明书。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析的统计分析, 采用 GraPhPad Prism 8 软件制图。计量资料均采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。f-ERG 结果分析时造模眼与对照眼之间的比较采用配对样本 *t* 检验, 两组比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单

因素方差分析,组间比较采用 LSD 或 Dunnet *T*3 检验。本研究以 *P*<0.05 表示有显著性差异;以 *P*<0.01 表示有极显著性差异。

2 结果

2.1 f-ERG 电生理信号

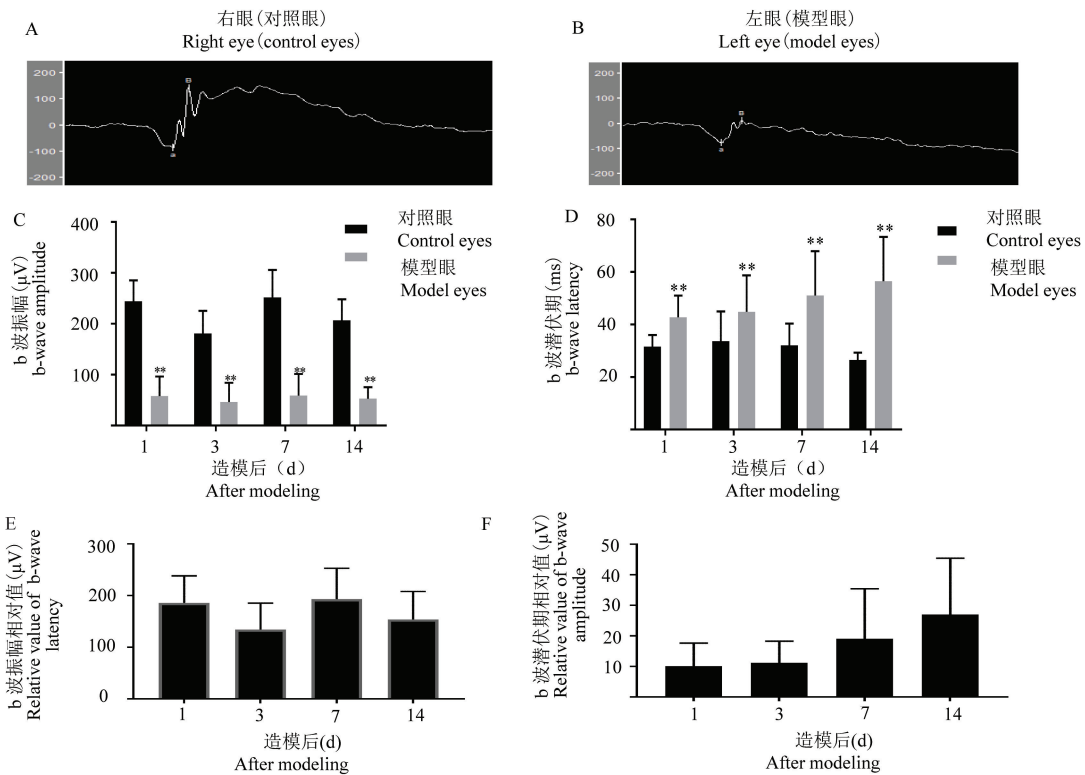
为了检测视网膜功能在急性高眼压引起的 RIR

损伤中的变化,对 Long Evans 大鼠进行了暗适应条件下的 f-ERG 检测,并记录了光强为 1.0 cds · m² 条件下大鼠 b 波的振幅及潜伏期。检测结果发现,与自身正常对照眼相比,造模眼各检测时间点 b 波的振幅极显著降低 (*P*<0.01),平均缩减 185.8 μV; b 波的潜伏期相比于对照眼也发生极显著的延迟 (*P*<0.01),平均延迟 11.2 ms(表 1,图 1A、1B)。且造

表 1 RIR 损伤后不同时间点造模眼与对照眼 ERG 检测结果分析($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 1 Analysis of erg test results in model eyes and control eyes at different time points after rir injury

时间 Time	b 波振幅 b-wave amplitude		b 波潜伏期 b-wave latency	
	振幅缩减 (μV) Amplitude reduction	<i>P</i>	延迟时间 (ms) Delay time	<i>P</i>
D1R-D1L	185.8±52.4	** <i>P</i> <0.01	11.2±7.1	** <i>P</i> <0.01
D3R-D3L	134.5±50.9	** <i>P</i> <0.01	11.2±7.1	** <i>P</i> <0.01
D7R-D7L	193.0±59.9	** <i>P</i> <0.01	19.1±16.4	** <i>P</i> <0.01
D14R-D14L	154.0±54.0	** <i>P</i> <0.01	30.0±16.8	** <i>P</i> <0.01
<i>P</i>	0.078		0.01	

注:D1、D3、D7、D14 分别表示大鼠 RIR 损伤后 1、3、7、14 d;L 表示左眼(造模眼),R 表示右眼(对照眼)。与对照眼比较,***P*<0.01。
Note. D1, D3, D7 and D14 respectively represent 1, 3, 7 and 14 days after RIR injury in rats. L represents the left eye(model eyes), R represents the right eye(control eyes). Compared with the control eyes,***P*<0.01.



注:A、B;RIR 损伤后造模眼和对照眼 b 波检测结果图;C、D;RIR 损伤后不同时间点造模眼与对照眼 b 波振幅和潜伏期结果比较。E、F;RIR 损伤后不同时间点造模眼相较于对照眼 b 波振幅缩减和 b 波潜伏期延迟情况。与对照眼比较,***P*<0.01。

图 1 RIR 模型大鼠 b 波检测结果及其比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Note. A/B, b-wave detection results of the model eye and control eye after RIR injury. C/D, Comparison of b-wave amplitude and latency results between the model eye and the control eye at different time points after RIR injury. E/F, The reduction of b-wave amplitude and delay of b-wave latency in the model eye at different time points after RIR injury compared to the control eye. Compared with control eyes,***P*<0.01.

Figure 1 Comparison of b-wave detection results in RIR model rats

模眼在各个检测时间范围内均无法恢复至对照眼的视觉水平。此外,Long Evans 大鼠双眼 b 波潜伏期相对值在各检测时间点上总体均存在显著差异 ($P<0.05$) (表 1),且随着时间逐渐增大(图 1F)。以上结果表明大鼠前房灌注急性高眼压引起的 RIR 损伤模型的视网膜功能受到严重损伤。

2.2 OCT 测量视网膜厚度

利用 OCT 观察视网膜结构在急性高眼压引起

的 RIR 损伤中的变化。结果发现,造模前造模眼显示正常的视网膜结构,造模后 3、7、14 d 造模眼 GCC 和视网膜全层厚度较造模前变薄($P<0.01$) (表 2,图 2)。GCC 厚度在第 3 天较造模前开始有极显著性差异($P<0.01$),视网膜全层厚度在第 7 天开始有极显著性差异($P<0.01$)。视网膜厚度变薄呈时间依赖性,提示视网膜结构逐渐受到严重损伤(图 2、图 3),且无法恢复到造模前正常的视网膜厚度。

表 2 OCT 测量 GCC 及视网膜全层厚度情况($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 2 Three and full retinal thickness measured by OCT

时间(d) Time	GCC 厚度(μm) GCC thickness	视网膜全层厚度(μm) Full thickness of retina
造模前 Before molding	96.0±10.1	268.4±10.3
D3	74.1±12.6 **	249.0±22.0
D7	65.0±14.1 **	216.9±25.2 **
D14	60.0±19.5 **	214.1±33.8 **

注:与造模前比较,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with that before modeling, ** $P<0.01$.

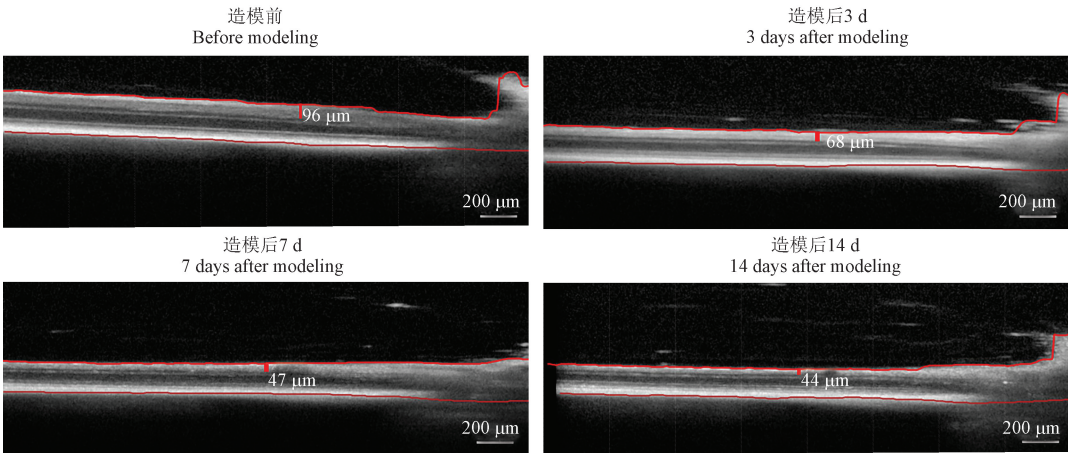


图 2 Long Evans 大鼠造模眼不同时间 OCT 检测视网膜情况
Figure 2 Retina of Long Evans rats was detected by OCT at different times

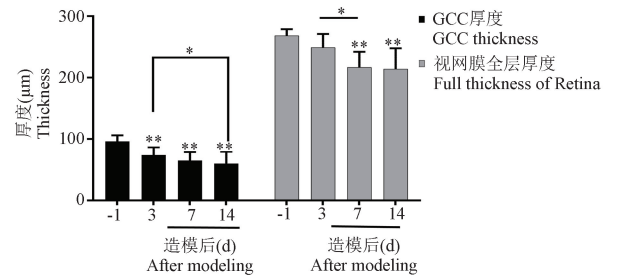


图 3 RIR 损伤前后不同时间点造模眼视网膜厚度结果比较($\bar{x}\pm s, n=10$)
Note. Compared with that before modeling, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of retinal thickness between model eyes and control eyes at different time points before after RIR injury

2.3 眼底血管变化

大鼠造模后视网膜眼底照相检查结果见图 4,正常对照眼底血管形态均正常,造模眼在造模后第 1 天表现出一定程度的血管走行较僵直,分支减少,一直到第 14 天眼底血管血流流量有所恢复,但都没有达到正常状态,提示视网膜血管受到严重破坏。

2.4 HE 染色

如图 5 所示,对照眼视网膜结构层次清晰,各层细胞排列紧密,大小均一。造模眼视网膜变薄,RGCs 细胞核稀疏,空泡化明显,内核层(inner nuclear layers, INL)和外核层(outer nuclear layers, ONL)厚度及细胞数目减少。

2.5 TUNEL 荧光染色

对照眼视网膜结构层次清晰,各层细胞排列紧密,大小均一。造模眼视网膜变薄,神经节细胞胞核稀疏,空泡化明显,内核和外核层厚度及细胞数目减少,视网膜各层明显有大量细胞凋亡(图 6)。

2.6 谷氨酸含量比较

大鼠造模后 1、7、14 d 视网膜谷氨酸含量变化

见表 3,与对照眼相比,造模后第 1 天造模眼的视网膜谷氨酸浓度迅速升高,第 7 天到最高峰,之后下降,到第 14 天与对照眼表达的浓度相近。

2.7 其他眼部情况

30 只 Long Evans 大鼠中 3 只造模后出现角膜溃疡,其中 1 只角膜穿孔;2 只晶状体刮伤,形成白内障。

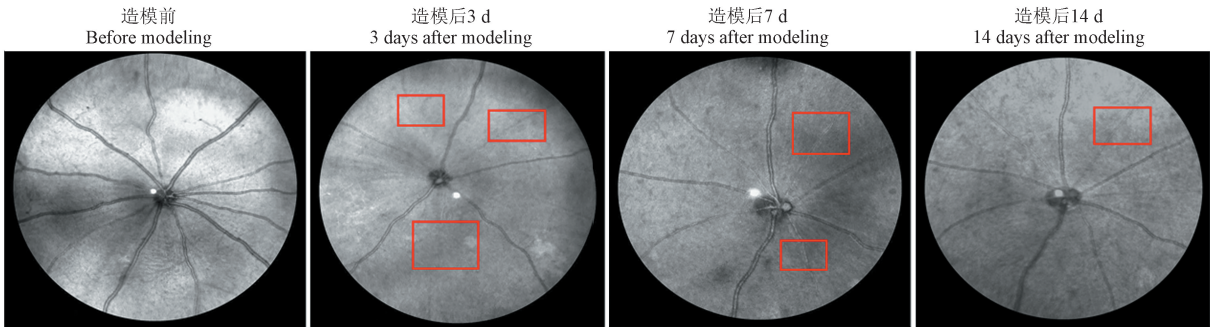
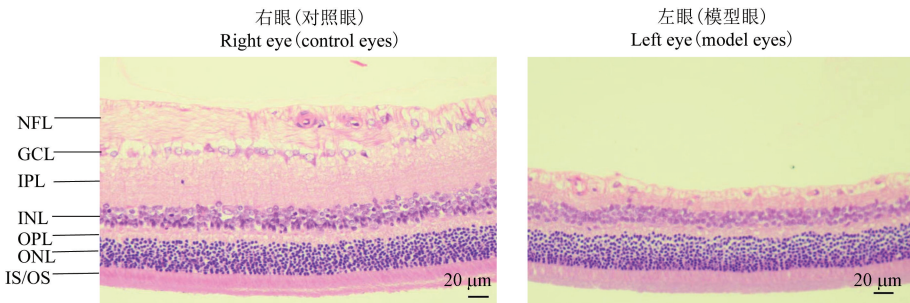
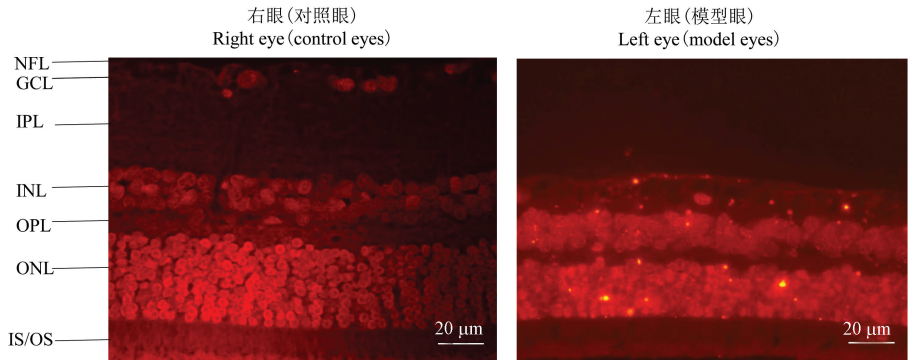


图 4 视网膜眼底照相检查结果
Figure 4 Retinal fundus photography results



注:INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;IS/OS:视锥、视杆细胞层。
Note. INL, Inner nuclear layers. OPL, Outer slave layer. ONL, Outer nuclear layers. IS/OS, Cone, rod cell layer.

Figure 5 HE staining section observation of retinal structure



注:INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;IS/OS:视锥、视杆细胞层。
Note. INL, Inner nuclear layers. OPL, Outer slave layer. ONL, Outer nuclear layers. IS/OS, Cone, rod cell layer.

Figure 6 Retinal cell apoptosis was visualized by TUNEL fluorescence staining

表 3 造模后不同时间视网膜谷氨酸含量变化($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 3 changes of retinal glutamate content at different times after modeling

时间 Time	谷氨酸浓度($\mu\text{mol/g}$) Glutamic acid concentration	
	对照眼 Control eyes	模型眼 Model eyes
D1	41.6 $\pm$ 7.4	68.6 $\pm$ 8.8**
D7	40.0 $\pm$ 13.6	77.6 $\pm$ 22.6**
D14	55.3 $\pm$ 9.2	60.1 $\pm$ 11.8

注:与对照眼比较,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control eye,** $P<0.01$.

3 讨论

本研究采用前房灌注生理盐水致 Long Evans 大鼠 RIR 损伤,研究不同时期视网膜功能和组织结构变化。为了观察大鼠视网膜功能情况,视觉电生理是较成熟的手段。因啮齿类动物视网膜大多缺乏黄斑^[10],本实验使用暗适应下 f-ERG 来检测视网膜功能。在 f-ERG 中,a 波的起源是视网膜光感受器和色素上皮细胞,b 波起源于视网膜内层的双极细胞和 Müller 细胞,是连接 RGCs 细胞的重要部分^[11-12]。有研究发现,b 波振幅可作为反映视网膜缺血的敏感指标^[13]。RGCs 作为双极细胞下游神经元,当 RGCs 损伤时 b 波最先受到影响。f-ERG 检测结果表明 RIR 损伤后第 1 天大鼠 f-ERG 波形发生明显紊乱,双极细胞、Müller 细胞和无长突细胞发生损伤,视觉功能发生严重障碍,且随着检测时间的持续,该状态没有发生逆转,说明 RIR 损伤对大鼠视觉功能的影响不能短期自愈,与文献报道相符^[2,14]。f-ERG 检测结果中,RIR 损伤后第 3 天时,模型大鼠的视觉功能发生了小幅度且短暂的改善现象,分析可能是视网膜代偿反应。值得注意的是,上述改善未能获得很好的统计学支持,说明改善程度轻微或分组内个体不足导致了检验效能不足,今后进行视觉电生理检测大鼠 RIR 视觉电生理功能需要增大分组内个体数目。尽管如此,这种短暂改善并没有阻止视觉电生理功能损伤的发生,表明在缺乏外界干预的情况下,RIR 损伤的大鼠视网膜的自我修复有限,可能存在完整功能的视网膜发生了进一步损伤的现象。Nakatani 等和 Matlach 等^[15-16]研究结果表明,OCT 测量视盘周围的 GCC 厚度可重复性高,而且视盘周围的 GCC 厚度是 RGCs 损伤的最敏感参数。本研究选用 OCT 测量 GCC 厚度及视网膜全层厚度,结果显示造模后 GCC 厚度在 RIR 损伤的第 3 天较造模前变薄,而视网膜

全层厚度在第 3 天无显著改变,第 7 天才开始有显著改变。GCC 对应着 RGCs 的轴突、细胞体,借此验证了 RGCs 对高眼压更敏感,也验证了 Nakatani 等和 Matlach 等的 GCC 对高眼压更敏感这一结论。RIR 损伤后第 14 天 HE 及 TUNEL 染色结果也显示视网膜变薄,尤其是 GCC 变薄最明显,RGCs 胞核稀疏,空泡化明显,内核层和外核层变薄,视网膜各层细胞出现明显凋亡。以上结果说明缺血再灌注导致视网膜微循环及内环境紊乱,使得神经元及神经胶质细胞结构功能改变,最后导致细胞死亡。同时眼底成像技术也发现眼底视网膜血管从第 3 天开始就出现明显的缺血现象,且到第 14 天的都没有恢复,说明前房在 132 mmHg 压力作用下会造成视网膜严重的缺血现象,造成视网膜的急性损伤,这也印证了许多文献报道的缺血可能是视网膜及视神经损伤的原因之一^[17]。

视网膜中正常的谷氨酸浓度可维持 RGCs 的分化和新陈代谢活动的正常进行,而高病理性谷氨酸浓度则会产生对中枢神经的毒害损伤作用^[18]。在研究中发现,与对照眼相比,造模眼在急性高眼压损伤后视网膜谷氨酸浓度即迅速升高,说明 Long Evans 大鼠在急性高眼压损伤后,视网膜中谷氨酸迅速增加,产生神经兴奋毒性,这可能是视网膜电生理功能快速损伤、结构萎缩及造成 RGCs 死亡的因素之一。

综上所述,本实验研究发现,给予 Long Evans 大鼠前房持续 60 min,132 mmHg 灌注压所造成的 RIR 损伤会引起视觉功能严重损伤,视网膜萎缩,厚度减少,RGCs 损伤,视网膜谷氨酸含量增加,神经兴奋毒性增强,可以为视网膜损伤疾病的发病机制及保护药物的研究提供良好的模型基础。

参考文献:

[1] Jiang MN, Zhou YY, Hua DH, et al. Vagal nerve stimulation attenuates ischemia-reperfusion induced retina dysfunction in acute ocular hypertension [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 87.
[2] Li X, Ye Z, Pei S, et al. Neuroprotective effect of minocycline on rat retinal ischemia-reperfusion injury [J]. Mol Vis, 2021, 27: 438-456.
[3] Liu W, Xia F, Ha Y, et al. Neuroprotective effects of HSF1 in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(4): 965-977.
[4] Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H, et al. Lomerizine, a Ca²⁺ channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina [J]. Exp Eye Res,

- 2000, 70(4): 475–484.
- [5] Pang IH, Clark AF. Inducible rodent models of glaucoma [J]. Prog Retin Eye Res, 2020, 75: 100799.
- [6] 斯庆布日古德, 都日娜. 建立视网膜缺血再灌注损伤模型方法的选择 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(26): 167–168.
- [7] Li S, Li H, Takahata T. Pigmented Long-Evans rats demonstrate better visual ability than albino Wistar rats in slow angles-descent forepaw grasping test [J]. Neuroreport, 2022, 33(12): 543–547.
- [8] Baek SM, Kim K, Kim S, et al. SP prevents T2DM complications by immunomodulation [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 16753.
- [9] Linsenmeier RA, Beckmann L, Dmitriev AV. Intravenous ketamine for long term anesthesia in rats [J]. Heliyon, 2020, 6(12): e05686.
- [10] Moshiri A, Chen R, Kim S, et al. A nonhuman primate model of inherited retinal disease [J]. J Clin Invest, 2019, 129(2): 863–874.
- [11] Bui BV, He Z, Vingrys AJ, et al. Using the electroretinogram to understand how intraocular pressure elevation affects the rat retina [J]. J Ophthalmol, 2013, 2013: 262467.
- [12] Jnawali A, Lin X, Patel NB, et al. Retinal ganglion cell ablation in Guinea pigs [J]. Exp Eye Res, 2021, 202: 108339.
- [13] Muir ER, Chandra SB, Narayanan D, et al. Effects of chronic mild hyperoxia on retinal and choroidal blood flow and retinal function in the DBA/2J mouse model of glaucoma [J]. PLoS One, 2022, 17(3): e0266192.
- [14] Wiemann S, Yousf A, Joachim SC, et al. Knock-out of tenascin-C ameliorates ischemia-induced rod-photoreceptor degeneration and retinal dysfunction [J]. Front Neurosci, 2021, 15: 642176.
- [15] Matlach J, Wagner M, Malzahn U, et al. Repeatability of peripapillary retinal nerve fiber layer and inner retinal thickness among two spectral domain optical coherence tomography devices [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(10): 6536–6546.
- [16] Nakatani Y, Higashide T, Ohkubo S, et al. Influences of the inner retinal sublayers and analytical areas in macular scans by spectral-domain OCT on the diagnostic ability of early glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(11): 7479–7485.
- [17] Erichev VP, Khachatryan GK, Khomchik OV. Current trends in studying pathogenesis of glaucoma [J]. Vestn Oftalmol, 2021, 137: 268–274.
- [18] González Fleitas MF, Devouassoux JD, Aranda ML, et al. Enriched environment provides neuroprotection against experimental glaucoma [J]. J Neurochem, 2020, 152(1): 103–121.

[收稿日期] 2022-09-14

(上接第 45 页)

- [21] Egeland NG, Austdal M, van Diermen-Hidle B, et al. Validation study of MARCKSL1 as a prognostic factor in lymph node-negative breast cancer patients [J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0212527.
- [22] Kim BR, Dong SM, Seo SH, et al. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) controls tumor-associated cell proliferation through the interaction with MARCKSL1 [J]. Cell Signal, 2014, 26(9): 1765–1773.
- [23] Zhao Y, Xie X, Tian L, et al. MARCKSL1 interacted with F-actin to promote esophageal squamous cell carcinoma mobility by modulating the formation of invadopodia [J]. Cancer Med, 2023, 12(3): 3299–3312.
- [24] Liang W, Gao R, Yang M, et al. MARCKSL1 promotes the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells [J]. Oncol Lett, 2020, 19(3): 2272–2280.
- [25] Sheats MK, Yin Q, Fang S, et al. MARCKS and lung disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 60(1): 16–27.

[收稿日期] 2023-03-15