

【实验研究】

强光照致 TgAPP^{swe}PS1 转基因鼠视网膜功能障碍和结构损伤[△]

【摘要】 目的 初步研究在光照损伤作用下 TgAPPswePS1 转基因鼠视网膜结构和功能的改变情况。**方法** 给予 6 月龄阿尔茨海默病转基因鼠 (TgAPPswePS1 鼠) 10 000 lux 光照处理, 每天光照 12 h, 连续光照 6 个月, 光照处理为实验组, 设鼠龄匹配的转基因鼠为对照组, 在光照 6 个月后 (即小鼠 12 个月时) 对实验组与对照组小鼠进行视网膜电图检测, 取材并进行切片, 行 HE 染色并观察视网膜各层结构改变, 予以视网膜厚度测量并进行统计学分析。**结果** 对照组 Rod 反应 a、b 波波幅分别为 $(18.33 \pm 3.53) \mu\text{V}$ 、 $(107.58 \pm 14.72) \mu\text{V}$, Max 反应 a、b 波波幅分别为 $(64.80 \pm 7.57) \mu\text{V}$ 、 $(178.76 \pm 14.47) \mu\text{V}$; 实验组光照 6 个月后小鼠视网膜电图 Rod 反应 a、b 波波幅分别为 $(17.92 \pm 4.89) \mu\text{V}$ 、 $(21.83 \pm 5.51) \mu\text{V}$, Max 反应的 a、b 波波幅分别为 $(18.23 \pm 4.44) \mu\text{V}$ 、 $(24.50 \pm 4.49) \mu\text{V}$; 与对照组比较, Rod 反应的 b 波和 Max 反应的 a、b 波的波幅下降明显, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$); 在 Rod 和 Max 反应里 a 波和 b 波的潜伏期改变不明显。与对照组比较, 经过光照处理后, 实验组小鼠视网膜结构发生明显改变, 以外核层与感光细胞外节明显, 视网膜厚度明显变薄, 为 $(102.34 \pm 9.38) \mu\text{m}$, 与对照组 $(181.32 \pm 13.47) \mu\text{m}$ 比较差异有统计学意义 ($P = 0.017$)。**结论** 高强度光照可以造成 TgAPPswePS1 鼠视网膜结构损伤和功能障碍。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是年龄相关退行性疾病^[1],转基因动物是目前最好的 AD 研究实验对象。现今,研究者们普遍集中在单一的对转

基因动物视网膜进行研究,也已经发现 AD 转基因动物视网膜上存在结构异常^[2,3],但是对 AD 转基因动物在环境因素干预下的变化却不甚了解,考虑光照因素是眼部接受的环境因素之一,且光照损伤是视网膜疾病中的一个重要环境因素,那么是否光照损伤可以引起 AD 转基因鼠视网膜功能结构的变化?为此,本实验选择 AD 转基因鼠 TgAPPswePS1 为研究对象,研究在光照损伤作用下 TgAPPswePS1 转基因鼠视网膜结构和功能变化,为 AD 相关的眼部变化提供环境保护模式。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 TgAPPswePS1 小鼠[B6C3-Tg(APPswe, PSEN1dE9)85Dbo/J(Tg)]由 Jackson Laboratory 实验室(Bar Harbor, ME, 美国)购买引进繁殖。本研究对所有转基因鼠都进行了基因型鉴定。研究中取 APPswe(+)与 PSEN1dE9(+)的 AD 转基因鼠为实验鼠。筛选鼠龄为 6 个月的阳性转基因小鼠共 12 只,其中实验组和对照组各 6 只。

1.2 实验仪器与试剂 切片机 Cm1850-1-1(德国 leica 公司),荧光显微镜(德国蔡司 Axioylan2),罗兰电生理仪(德国 RETIPORT 公司),40 g·L⁻¹多聚甲醛(美国 Sigma 公司),复方托吡卡胺(沈阳兴齐制药有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 光照处理 实验组小鼠均应用动物光损伤装置(专利 ZL201620227064.X)给予光照干预,设光照度为 10 000 lux,每天光照 12 h,光照处理 6 个月,在光照过程保持小鼠瞳孔散大。对照组于正常环境中饲养。

1.3.2 视网膜电图检查 视网膜电图(electroretinogram, ERG)检查按照文献[4]的方法进行。在光照 6 个月即小鼠 12 个月大时两组小鼠均行 ERG 检查,行 ERG 检查前所有小鼠均暗适应过夜至少 8 h,复方托吡卡胺散瞳后,43 g·L⁻¹水合氯醛腹腔注射麻醉,角膜上滴 5 g·L⁻¹普鲁卡因表面麻醉,然后于角膜上放置角膜电极,于尾巴上皮下插入接地电极,舌形参考电极放置在舌下。在 -25 dB 白色闪光刺激下获得 Rod 反应,在 0 dB 白色闪光刺激下获取 Max 反应,3 s 内 3 次独立的刺激合成一个反应,每眼测量 3 次反应,分别获得 a、b 波的波幅、潜伏期等数据,取平均值进行统计。

1.3.3 石蜡切片和免疫组织化学染色 光照 6 个月(即小鼠鼠龄为 12 个月)时终止实验。切片和免疫组织化学染色按照文献[5]的方法进行:两组小鼠均于麻醉并心脏灌注后取眼球,40 g·L⁻¹多聚甲醛常温下固定 24 h,置于 4℃ 备用。予以石蜡切片:常规漂洗后,梯度乙醇脱水,二甲苯浸泡 45 min,在熔点为 52~56℃ 的软蜡中浸泡 15 min×2 次,浸蜡的组织块放入包埋框中,硬蜡(熔点为 60~62℃)包

埋,蜡块备用。切片机连续切片,厚约 4 μm。切片贴附于载玻片上,双蒸水浸泡 5 min,以保持最好细胞形态;苏木素染料中浸泡 15 s,流水下冲片直至深紫色变为浅紫色;在体积分数 1% 的稀氨水-HCL 中停留 60 s,使得苏木素着色区变为淡蓝色;流水冲片,双蒸水中浸泡 5 min;5 g·L⁻¹伊红 2~3 min 染细胞浆,流水洗;染色后,常规依次经体积分数 80%(1 min×2 次)、95%(3 min×2 次)、100%(5 min×2 次)乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并采集图像。

1.4 图像采集、统计分析 ERG 检查获得数据、视网膜切片 HE 染色图像采集都由一人独立完成,在相同实验条件下采集图像,由专门人员进行统计分析。视网膜厚度计数:取经视盘非连续性切片,HE 染色后使用 Photoshop9 中的 ruler 工具,在距视盘 300~600 μm 处测量视网膜内界膜到视网膜外节的距离。

所有数值型实验数据均以均数±标准差表示($\bar{x} \pm s$),组间均数两两比较采用 SPSS 19.0 软件中 Student's *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 光照干预下 TgAPPswePS1 鼠视网膜电生理改变 实验组和对照组小鼠光照后 ERG 波形图见图 1。a、b 波波幅值见表 1,潜伏期见表 2。

由图 1 可知,对照组 Rod 波形明显,存在明确的 a 波和 b 波波形,给予光刺激后从 a 波快速上升,形成平台,到达 b 波(图 1A)。实验组 ERG 也检测到 Rod 反应,但是 Rod 反应的波形较对照组明显低矮变平,甚至个别呈现为直线型,类似熄灭改变(图 1C);由于 a 波波形往往呈直线型,导致 a 波波幅值常不明显,接近基线,数值采集困难,故本研究结果显示 Rod-a 波波幅同对照组比较虽有下降,但是下降不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$);Rod-b 波波幅同对照组比较下降幅度大,差异有统计学意义($P < 0.05$),波形变平坦。

对照组 Max 反应检测示,Max 反应存在明确的 a 波和 b 波波形(给予光刺激后出现的第一个波谷即为 a 波,继而出现波峰再迅速上升形成最高的波峰即为 b 波;图 1B)。实验组与对照组相比,Max-a 波、b 波波幅均下降明显,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);甚至在部分实验组转基因小鼠上,Max 反应波形呈熄灭状改变,考虑为光照 6 个月后,视网膜损伤过大导致波幅过小而无法被机器识别所致。

在 Rod 与 Max 反应的 a、b 波潜伏期,实验组与对照组间比较,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),说明视网膜电生理检查中,Rod 与 Max 反应的 a、b 波的潜伏期均没有受到损害。



图1 实验组和对照组小鼠光照后 ERG 波形图(横坐标为 20 ms,纵坐标为 200 μ V)。A:对照组 Rod 反应;B:对照组 Max 反应,C:实验组 Rod 反应;D:实验组 Max 反应

表 1 两组小鼠光照后 a、b 波波幅值 (U/ μ V)				
组别	Rod-a	Rod-b	Max-a	Max-b
对照组	18.33 \pm 3.53	107.58 \pm 14.72	64.80 \pm 7.57	178.76 \pm 14.47
实验组	17.92 \pm 4.89	21.83 \pm 5.51 *	18.23 \pm 4.44 *	24.50 \pm 4.49 *

注:与对照组相比,* $P < 0.05$

表 2 两组小鼠光照后 a、b 波潜伏期 (t/ms)				
组别	Rod-a	Rod-b	Max-a	Max-b
对照组	27.33 \pm 1.29	54.62 \pm 3.68	16.67 \pm 1.27	33.52 \pm 4.27
实验组	25.38 \pm 3.33	52.80 \pm 2.83	16.83 \pm 0.83	33.75 \pm 4.26

2.2 光照损伤 TgAPPswePS1 小鼠视网膜结构改变

对照组视网膜各层结构完整,未见明显异常改变。经光照损伤后,实验组视网膜结构存在明显变化:外核层与感光细胞外节明显变薄,甚至在个别实验组小鼠只剩下 1~2 层外核层,感光细胞外节消失,呈缺失性改变;对组织切片进行视网膜厚度测量,发现对照组和实验组的视网膜厚度分别为(181.32 \pm 13.47) μ m 和(102.34 \pm 9.38) μ m,二者相比差异具有统计学意义($P = 0.017$)。

3 讨论

关于 AD 转基因鼠视网膜结构的研究已有报道^[3,6],但是对在环境因素下的其视网膜功能的变化却研究甚少。光照暴露已经被证实是许多视网膜疾病的相关危险因素^[7-10],但是光损伤对 AD 疾病模型鼠的视网膜影响如何却甚少研究。为了探讨 AD 转基因鼠暴露在光照损伤因素下的视网膜功能结构改变,本研究将 AD 转基因鼠置于光急性损伤模型下。据以往研究报道,视网膜电生理检查是小鼠视功能比较客观的检查手段^[10],ERG 的 a、b 波波幅下降代表视网膜功能减退;在本研究中,AD 转基因鼠接受光照损伤后,视网膜 ERG 的 Rod 和 Max 反应发生明显改变,尤其以 a、b 波的波幅下降明显,与此同时,HE 染色结果示视网膜厚度变薄,结合两者结果,强烈提示光照可以造成 AD 转基因鼠视网膜急性损伤性改变。

ERG 中 a 波代表视网膜外层功能,提示光感受器的变化,b 波指示视网膜胶质细胞的功能,当视网膜外层结构发生改变时,必然存在 a、b 波波幅的变化,本研究结果提示光感受器层、外核层受损,结合 ERG 的 a、b 波波幅下降,说明光照损伤 AD 转基因鼠视网膜功能改变同结构改变是一致的,提示光照损伤可以导致 AD 转基因鼠视网膜结构功能发生明显改变;此结果同已有的研究报道基本一致^[10-11],都提示光照存在损伤视网膜结构功能的潜在危险性。

本研究发现光照刺激转基因鼠后,视网膜 ERG 的 a、b 波潜伏期未发生改变,同之前的光损伤研究报道基本相一致^[11],考虑到视网膜结构的变化,说明急性光照对 AD 转基因鼠视网膜突触连接可能影响不大,但是因为 ERG 潜伏期提示的仅为视网膜对光线应答的起始,只要有细胞存在应答,就可以表现在潜伏期上无变化,故而在本研究中的提示意义有限。

需要指出的是转基因鼠光照后感光细胞外节和外核层明显改变,严重损伤的视网膜外核层往往仅留下 1~2 层结构,感光细胞外节完全消失,呈缺失样改变,在我们的 ERG 结果中,发现在某些个例里存在 ERG 呈熄灭状,所以功能异常同结构改变是一致的,都提示了高强度光照对 AD 转基因鼠视网膜的严重损伤作用,这种严重破坏的现象已有报道^[12],但这种报道仅在白化大鼠上存在,所以推测 AD 转基因鼠的这种改变应该同本研究设定的研究条件有关,除了考虑到设定的光照损伤为急性强损伤外,已有研究报道 AD 转基因小鼠的视网膜结构存在改变^[4,13-15],这种改变就包括视网膜厚度的减少,视网膜结构中某些突触存在损伤,那么极有可能是转入的 AD 致病基因与光照损伤存在一定的关联性,且可能两者呈协同性作用,转入的 AD 基因对光照损伤产生了放大效应,才致使视网膜结构剧烈变化,至于其中的具体机制尚不清楚;是否有其他因素的参与,ERG 的结果没有进一步提示,有待进一步研究。

考虑到本研究仅选择了一个时间点,不存在连续性观察,所以无法提示光照对转基因小鼠视网膜损伤的始动机制,也无法判断损伤的过程,急性损伤的具体过程有待进一步研究;由于本研究选择光照参数过强,导致视网膜急性破坏严重,而无法模拟现实中的慢性损伤过程,也因此减弱了本研究的实际意义。

综上所述,给予 AD 转基因小鼠光照损伤因素,可以引起视网膜结构和功能的损伤,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] BLENNOW K, DE LEON MJ, ZETTERBERG H. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2006, 368 (9533) :387-403.

- [2] JEN LS, HART AJ, JEN A, RELVAS JB, GENTLEMAN SM. Alzheimer's peptide kills cells of retina *in vivo* [J]. *Nature*, 1998, 392(6672):140-141.
- [3] NING A, CUI J, TO E, ASHE KH, MATSUBARA J. Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(11):5136-5143.
- [4] PEREZ SE, LUMAYAG S, KOVACS B, MUFSON EJ, XU S. Beta-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APPswe/PS1DeltaE9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(2):793-800.
- [5] 董志章, 李娟, 孙雪荣, 葛坚. 高强度光照损伤致 TgAPPswePS1 转基因鼠脉络膜新生血管形成 [J]. 眼科新进展, 2017, 37(2):101-105.
- [6] DONG ZZ, LI J, SUN XR, GE J. Intensive light exposure induce choroidal neovascularization in TgAPPswe/PS1 transgenic mice [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37(2):101-105.
- [7] SHIMAZAWA M, INOKUCHI Y, OKUNO T, NAKAJIMA Y, SAKAGUCHI G. Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice *via* attenuating glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor signaling [J]. *J Neurochem*, 2008, 107(1):279-290.
- [8] ORGANISCIAC DT, VAUGHAN DK. Retinal light damage: mechanisms and protection [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(2):113-134.
- [9] CRUICKSHANKS KJ, KLEIN R, KLEIN BE, NONDAHL DM. Sunlight and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the beaver dam eye study [J]. *Arch Ophthalmol*, 2001, 119(2):246-250.
- [10] LAVAIL MM, GORRIN GM, REPACI MA, THOMAS LA, GINSBERG HM. Genetic regulation of light damage to photoreceptors [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1987, 28(7):1043-1048.
- [11] CAO W, TOMBRAN-TINK J, ELIAS R, SEZATE S, MRAZEK D. *In vivo* protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(7):1646-1652.
- [12] CASSON RJ, CHIDLOW G, WOOD JP, VIDAL-SANZ M, OSBORNE NN. The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(2):685-693.
- [13] ALBERT DM, NEEKHRA A, WANG S, DARJATMOKO SR, SORENSON CM. Development of choroidal neovascularization in rats with advanced intense cyclic light-induced retinal degeneration [J]. *Arch Ophthalmol*, 2010, 128(2):212-222.
- [14] LIU B, RASOOL S, YANG Z, GLABE CG, SCHREIBER SS. Amyloid-peptide vaccinations reduce beta-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5):2099-2110.
- [15] WENZEL A, GRIMM C, SAMARDZIJIA M, REME CE. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2005, 24(2):275-306.
- [16] 刘章, 周琼. 阿尔茨海默病、视神经及特殊蛋白三者关系的研究进展 [J]. 眼科新进展, 2012, 32(12):1194-1196.
- [17] LIU Z, ZHOU Q. Recent advances in the relationship among Alzheimer's disease, optic nerve and especial proteins [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2012, 32(12):1194-1196.

《眼科新进展》杂志征订启事

《眼科新进展》杂志是由新乡医学院主办的眼科学高级学术刊物,创刊于1980年,大16开,100页,国内外公开发行。1999年加入国家科技部《万方数据系统科技期刊群》和《中国学术期刊(光盘版)》,1997年被上海医科大学图书馆选定为医学类核心期刊,2000年被美国《化学文摘》收录,2001年被俄罗斯《文摘杂志》收录,自2002年连续入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),自2008年连续入选中国中文核心期刊,并连续被评为河南省二十佳科技期刊。2009年入选WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM),并被评为RCCSE中国核心学术期刊。2016年被《中国学术期刊文摘》收录。国际标准连续出版物号为:ISSN 1003-5141,国内统一

刊号:CN 41-1105/R,邮发代号:36-42。

本刊辟有名家讲坛(述评)(Editorial)、实验研究(Experimental study)、应用研究(Applied study)、文献综述(Review article)、海外信息(Overseas information)、消息(News)、读者来信(Letters)等栏目。本刊读者对象主要是眼科学临床、科研和教学工作者。欢迎国内外眼科学工作者踊跃投稿和订阅。国内每期定价10.00元,全年定价120.00元。如错过邮局订阅,可直接汇款到我刊编辑部。联系地址:河南省新乡市金穗大道601号,新乡医学院期刊社《眼科新进展》杂志编辑部,邮编:453003。联系电话:0373-3029404;E-mail:ykxjz@xxmu.edu.cn、ykxjz@163.com;网址:<http://www.ykxjz.com>