引文格式:刘克高,彭晓燕,章征,孙华,杨迪亚,王宁利. 高眼压猴视盘和视网膜神经节细胞复合体的纵向变化[J]. 眼科新进展,2019,39(11):1005-1008. doi:10.13389/j.cnki.rao.2019.0230

【实验研究】

高眼压猴视盘和视网膜神经节细胞复合体的纵向变化△

刘克高 彭晓燕 章征 孙华 杨迪亚 王宁利

作者简介:刘克高,男,1961年8月出生,天津市人,博士,副主任医师。研究方向:小儿眼底病以及视觉电生理学。联系电话:010-83950131;E-mail:liukegao@aliyun.com;ORCID:0000-0002-9795-9052

About LIU Ke-Gao: Male, born in August, 1961. Medical doctor, associate chief physician. Tel: +86-10-83950131; E-mail: liukegao@aliyun.com; ORCID: 0000-0002-9795-9052

收稿日期:2019-03-12
修回日期:2019-05-20
本文编辑:董建军
△**基金项目**:国家自然科学基金资助(编号:81600725)
作者单位:100730 北京市,首都医科大学附属北京同仁医院眼科,北京市眼科学与视觉科学重点实验室(刘克高,章征,孙华,杨迪亚);100730 北京市,首都医科大学附属北京同仁眼科中心,北京市眼科研究所(彭晓燕,王宁利)
通讯作者:王宁利,E-mail:wningli@vip.163.com;ORCID:0000-0002-8933-4482
Received date: Mar 12, 2019
Accepted date: May 20, 2019
Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81600725)
From the *Department of Ophthalmology, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing Tongren Hospital, Affiliated Hospital of Capital Medical University* (LIU Ke-Gao, ZHANG Zheng, SUN Hua, YANG Di-Ya), *Beijing* 100730, *China*; *Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Capital Medical University* (PENG Xiao-Yan, WANG Ning-Li), *Beijing* 100730, *China*
Responsible author: WANG Ning-Li, E-mail: wningli@vip.163.com; ORCID: 0000-0002-8933-4482

Longitudinal changes in optic disc and retinal ganglion cell complex in monkeys with high intraocular pressure

LIU Ke-Gao, PENG Xiao-Yan, ZHANG Zheng, SUN Hua, YANG Di-Ya, WANG Ning-Li

【Abstract】 **Objective** To observe the longitudinal changes in optic disc and ganglion cell complex (GCC) in monkeys before and after high intraocular pressure (IOP). **Methods** Three experimental male rhesus monkeys were collected, aged 4 years, and fed with fruits and vegetables in a 12 h dark and 12 h light (100 Lux) environment. High IOP was induced by laser in each right eye of these monkeys. IOP, retinal fundus images and optical coherence tomography (OCT) were examined longitudinally before and after laser coagulation. Baseline and 3 follow-up exams of optic disc appearance, retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness and GCC were obtained for analysis. Paired *t*-test was used to compare the difference of IOP between the lasered eyes and the fellow eyes. Repeated measurement of analysis of variance was adopted to calculate the differences in different time points. **Results** Immediate IOP was (3.00±0.58) mmHg (1 kPa=7.5 mmHg) after first laser coagulation in lasered eyes, which was lower than that before laser coagulation [(17.33±1.20) mmHg] and that of fellow eyes [(17.00±1.53) mmHg)]. The differences were statistically significant ($t=16.25$, $P=0.004$ and $t=9.17$, $P=0.010$). About 2 years after the first laser coagulation, the IOP of lasered eyes was (41.00±5.00) mmHg, which was still higher than the baseline before laser coagulation. The difference was statistically significant ($t=6.17$, $P=0.030$). At 4 months after laser coagulation, the color of the optic disc in the lasered eyes started to fade, the color of the optic disc showed much paler at 8 months than that before laser coagulation, and still pale at 12 months. The color of optic disc in the fellow eyes was pink at 4 to 12 months after laser coagulation, and there was no significant change compared with that before laser coagulation. At 4 months, 8 months and 12 months after laser coagulation, the thickness of RNFL around the optic disc in lasered eyes was thinner than that of the fellow eyes and that before laser coagulation, but RNFL thickness around the optic disc in the fellow eyes showed no significant change compared with that before laser coagulation. At 4 months, 8 months and 12 months after laser coagulation, the thickness of GCC in macular area of lasered eyes was thinner than that before laser coagulation and that of fellow eyes, while GCC thickness in the macular area of the fellow eyes showed no significant change compared with that before laser coagulation. **Conclusion** Alternative ischemia and reperfusion injury to the optic disc and GCC might be a pathophysiological characteristic of the primate glaucoma model induced by laser.

【Key words】 rhesus monkey; intraocular pressure; optic disc; ganglion cell complex

【摘要】 **目的** 观察高眼压前后视盘和视网膜神经节细胞复合体(ganglion cell complex, GCC)的纵向变化,探讨高眼压对视盘和GCC的影响。**方法** 选取实验用恒河猴3只,全部为雄性,年龄4岁,保持在12 h暗和12 h光照(100 Lux)环境中给予水果、蔬菜等混合喂养。3只猴右眼用激光诱发高眼压。检测光凝前后的实验猴眼压,行眼底像和光学相干断层扫描检查。记录基线和3次随访的视盘外观、视网膜神经纤维层(retinal nerve fiber layer, RNFL)的厚度和GCC,对实验结果进行统计学分析。**结果** 首次光凝后激光眼即刻眼压为(3.00±0.58) mmHg(1 kPa=7.5 mmHg),明显低于光凝前的眼压(17.33±1.20) mmHg和对侧眼的眼压(17.00±1.53) mmHg,差异均有统计学意义($t=16.25$, $P=0.004$; $t=9.17$, $P=0.010$)。首次光凝后近2 a激光眼的眼压为(41.00±5.00) mmHg仍维持在高于光凝前的基线水平,差异有统计学意义($t=6.17$, $P=0.030$)。光凝后4个月时激光眼视盘的颜色开始变淡,8个月时颜色较光凝前明显变淡,12个月时颜色仍然变淡。对侧眼视盘的颜色在光凝后4~12个月都呈现粉红色,与光凝前对比无明显变化。光凝后4个月、8个月和12个月激光眼视盘周

围的 RNFL 厚度都较对侧眼以及光凝前变薄。对侧眼视盘周围的 RNFL 厚度在光凝后 4 个月、8 个月和 12 个月与光凝前相比均无明显改变。光凝后 4 个月、8 个月和 12 个月激光眼黄斑区 GCC 的厚度与光凝前和对侧眼相比变薄。光凝后 4 个月、8 个月和 12 个月对侧眼黄斑区 GCC 的厚度与光凝前相比均无明显改变。**结论** 在高眼压造成青光眼性视神经病变和视网膜病变之前,视盘和 GCC 一直处于高眼压和低眼压的波动状态;由此引起的缺血再灌注交替性损伤可能是激光诱导的高眼压模型猴的病理生理特征之一。

【关键词】 猴;眼压;视盘;神经节细胞复合体
【中图分类号】 R774

高眼压是青光眼发病的主要危险因素。高眼压导致的青光眼性视神经病变是一种慢性、进行性、不可逆性病变。为了早期诊断青光眼,临床上一直关注视盘的变化。由于灵长类动物(猴)的视盘在解剖学上与人类非常相似,所以用激光光凝猴中部小梁网诱导的慢性高眼压模型是最适合研究青光眼的动物模型。从组织学方面获得的横断面研究证据已经证明高眼压猴可以出现视网膜神经纤维层(retinal nerve fiber layer,RNFL)变性和视网膜神经节细胞丢失[1-3]。但是,青光眼性视网膜病变,特别是高眼压引起的黄斑区损害却一直被忽视。应用光学相干断层成像(optical coherence tomography,OCT)可以在活体纵向观察视盘、RNFL 厚度和黄斑区视网膜内层的形态学变化。OCT 的随访模式可以在同一个体连续记录视盘和黄斑区的纵向变化。在以往的研究中,我们曾使用 OCT 测量了正常猴的视盘和 RNFL 厚度。结果表明在正常猴用 OCT 测量视盘、RNFL 厚度和黄斑区视网膜内层有很高的重复性和重现性[4],因此 OCT 非常适合随访检查实验性高眼压猴。为了防控青光眼,有必要研究从高眼压到青光眼性视神经病变和青光眼性视网膜病变的自然过程。本研究的目的是在同一只猴活体连续观察高眼压前后视盘和视网膜神经节细胞复合体(ganglion cell complex,GCC)的纵向变化,探讨高眼压对视盘和 GCC 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取实验用恒河猴 3 只,购自中国人民解放军军事医学科学院,野生动物保护站合格证号:京绿动植许[2011]160 号、134 号;全部为雄性,年龄 4 岁,体质量 6.3 ~ 7.2 kg;饲养在首都医科大学实验动物科学部同一间猴房。保持在 12 h 暗和 12 h 光照(100 Lux)环境中给予水果、蔬菜等混合喂养。

本研究所有检查程序都经过首都医科大学动物保护和使用委员会以及动物伦理委员会的批准(批准编号:2011-D-0008)。严格遵照眼科学和视觉研究学会关于动物使用的声明。

1.2 高眼压模型的制作 肌注 100 g · L^{-1}氯胺酮(4 mL · kg^{-1})和 Sumianxin-Ⅱ(0.1 mL · kg^{-1})对实验猴进行麻醉。Sumianxin-Ⅱ的主要成分是甲苯噻嗪、氟哌啶醇和盐酸二氢埃托啡(吉林长春中国人民解放军兽医大学)。麻醉成功后将实验猴放在定制的猴台上,盖上毛毯保温。全部选择右眼作为激光眼,滴 1 g · L^{-1}匹罗卡品缩瞳。安放猴专用房角镜(美国 Ocular Instruments 公司)后置于裂隙灯前。使用 Novus Spectra 多波长激光仪(中国科医人公司)。设定激光能量为 300 ~ 500 mW。暴露时间:0.5 s,光斑直径:50 μm。首次激光光凝 270°范围房角中部小梁,80 ~ 120 个光凝斑。在首次光凝后 2 周,如果眼压在 30 mmHg(1 kPa = 7.5 mmHg)以下,再次激光光凝其余 90°的小梁网或补全激光不完全的部位。根据文献和我们以前的研究结果[5-7],在第一次光凝后的前 3 个月眼压可能发生波动。通常需要反复光凝中部小梁网,以达到眼压持续升高的效果。

1.3 眼压的测量 将实验猴麻醉成功后安静平卧 5 ~ 10 min。使用 Tonovet 回弹式眼压计(芬兰 iCare 公司)测量眼压。连续测量 3 次,取 3 次测量结果的平均值为最终眼压值。

1.4 眼底像和 OCT 图像的拍摄 麻醉成功后实验猴双眼滴 0.5 g · L^{-1}的托吡卡胺散大瞳孔。安置平光、硬性角膜接触镜。滴人工泪液(美国眼力健公司)保持角膜湿润。使用 CR-DGi 眼底照相机(日本佳能公司)拍摄眼底像。采用 RTVue-100 OCT 设备(美国 Optovue 公司)拍摄 OCT 图像。RTVue-100 采用扫描激光二极管发射(840 ± 10)nm 波长的激光束。纵向分辨率是 4 mm,束斑尺寸:15 mm,Z 轴方向扫描范围 2.0 ~ 2.3 mm,X、Y 轴方向为 2.0 ~ 12.0 mm。选择青光眼检查方案获取 OCT 图像。选择 RNFL 3.45 模式,将 3.45 mm 环放置在视盘中心。RNFL 3.45 模式测量以视盘为中心的 3.45 mm 处 RNFL 的厚度和视盘参数。选择 GCC 模式检查黄斑区内层视网膜厚度。记录基线和 3 次随访检查的结果进行分析。信号强度指数小于 40 的图像会被剔除,不纳入测量分析。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 进行统计分析,所有数值用均数 ± 标准差表示。通过配对 t 检验比较同一时间点激光眼和对侧眼之间眼压的差异。采用重复测量的方差分析(ANOVA)分析激光眼和对侧眼不同时间点间眼压的差异。检验水准:α = 0.05。

2 结果

2.1 光凝治疗前后眼压的纵向变化 首次光凝后激光眼即刻眼压为(3.00 ± 0.58)mmHg,明显低于光

凝前的眼压(17.33 ± 1.20) mmHg 和对侧眼的眼压(17.00 ± 1.53) mmHg,差异均有统计学意义(t = 16.25,P = 0.004;t = 9.17,P = 0.010)。首次光凝后 7 d 激光眼的眼压为(7.67 ± 1.90) mmHg,仍低于光凝前的眼压,差异有统计学意义(t = 6.65,P = 0.020)。首次光凝后 1 个月激光眼的眼压为(18.89 ± 1.74) mmHg,恢复到光凝前的基线水平,差异无统计学意义(t = 2.50,P = 0.310)。首次光凝后 3 个月激光眼的眼压逐渐升高并达到稳定,高于光凝前的基线水平,差异有统计学意义(t = 4.25,P = 0.040),但眼压有一定程度的波动。首次光凝后近 2 a 激光眼的眼压为(41.00 ± 5.00) mmHg,仍维持在高于光凝前的基线水平,差异有统计学意义(t = 6.17,P = 0.030)。光凝前和光凝后激光眼不同时间眼压的差异有统计学意义(F = 14.22,P = 0.030);光凝前和光凝后对侧眼不同时间眼压的差异无统计学意义(F = 1.89,P = 0.130)。见图 1。

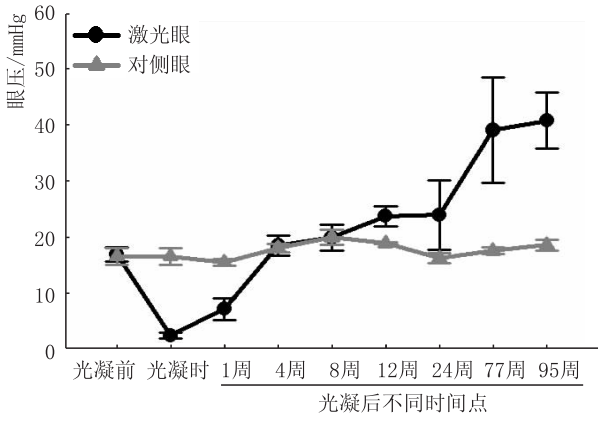


图 1　光凝前及光凝后不同时间双眼眼压的纵向变化

2.2　光凝前后视盘眼底像的纵向变化　光凝后 4 个月激光眼视盘的颜色开始变淡,光凝后 8 个月颜色较光凝前明显变淡,光凝后 12 个月颜色仍然变淡。对侧眼视盘的颜色在光凝后 4 ~ 12 个月都呈现粉红色,与光凝前对比无明显变化。见图 2。

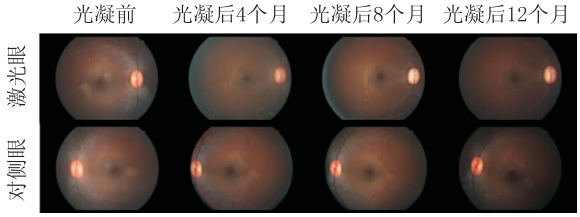


图 2　光凝前后视盘颜色的纵向变化

2.3　光凝前后视盘周围 RNFL 厚度的纵向变化　光凝后 4 个月、8 个月和 12 个月激光眼视盘周围的 RNFL 厚度都较对侧眼以及光凝前变薄。对侧眼视盘周围的 RNFL 厚度在光凝后 4 个月、8 个月和 12 个月与光凝前相比均无明显改变。见图 3。

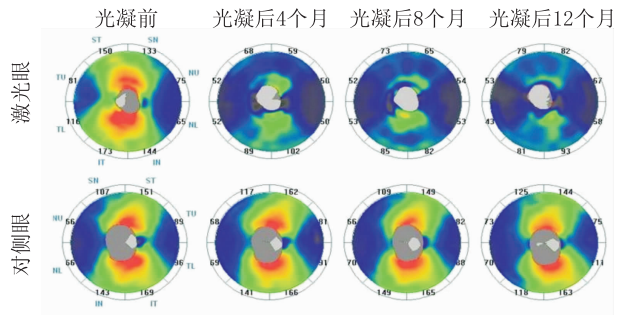


图 3　光凝前后视盘周围 RNFL 厚度的纵向变化

2.4　光凝前后黄斑区 GCC 厚度的纵向变化　光凝后 4 个月、8 个月和 12 个月激光眼黄斑区 GCC 的厚度与光凝前和对侧眼相比变薄。光凝后 4 个月、8 个月和 12 个月对侧眼黄斑区 GCC 的厚度与光凝前相比均无明显改变。见图 4。

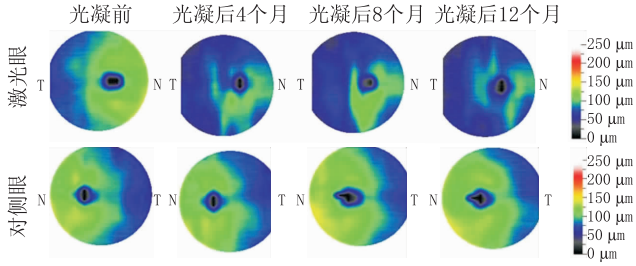


图 4　光凝前后黄斑区 GCC 厚度的纵向变化

3　讨论

高眼压是青光眼发生、发展的主要危险因素。为了更好地了解高眼压的损伤过程,有必要探讨青光眼性视神经病变及视网膜病变的发病过程。在本研究中,首次光凝后 1 周或数周激光眼眼压低于光凝前基线水平。我们认为首次光凝后色素性小梁网组织吸收激光能量,形成激光孔。短暂的激光孔导致房水外流过多,造成眼压下降。首次光凝后 4 周,激光处形成了瘢痕粘连,阻止了房水流出,导致眼压升高。在光凝后前 3 个月,眼压可能逐渐升高并超过光凝前基线水平,但波动较大。光凝后 3 个月,眼压会稳定,且高于光凝前基线水平,并可能在几年内维持在较高水平。眼压升高的原因可能是中部小梁网组织瘢痕形成并阻断了房水流出通道导致眼压逐渐升高。临床上,选择性激光小梁成形术能早期有效地降低眼压。然而,长期随访的数据显示,接受了选择性激光小梁成形术和氩激光小梁成形术的患者多数需要进一步治疗[8-10]。

激光诱发的高眼压对视神经和视网膜的损害与高眼压的持续时间有密切关系。本研究结果表明:眼压升高 3 个月后,视盘和 GCC 会发生青光眼性损害。在视盘和 GCC 发生青光眼性损害之前,眼睛首

先经历了一段短暂的低眼压,然后是一段眼压的波动,最终达到持续的高眼压。我们认为眼压升高会减少视盘、视网膜和脉络膜的血流。视网膜通过自身调节反应使升高的眼压恢复正常。所以,视盘和GCC一直处于缺血再灌注损伤的交替状态[11-12]。因此,眼压的波动性变化是激光诱导的猴高眼压模型的特征之一。临床上,24 h眼压监测是早期诊断青光眼最有效的检查方法[13]。猴高眼压模型的这个特点几乎模拟了青光眼患者真实的病理生理过程。然而,虽然可以在活体纵向观察视盘和GCC的变化,但仍然难以准确地检测到视盘和GCC的结构损伤。其原因可能是:(1)早期视盘和GCC的变化与眼压升高的程度和持续时间有关。由于早期眼压处于波动状态,所以高眼压对视盘和GCC的损害可能是慢性的、进展的和可变的。(2)视盘和视网膜结构可能随着眼压的波动而改变[14-16]。(3)缺乏明确的统一标准界定高眼压对视盘和视网膜结构的进行性损害。

本研究尚存在下面的局限性。首先,本研究观察了高眼压前后猴视盘和GCC的纵向改变,未能在同一时间段观察高眼压前后视盘和GCC的功能变化。视盘和GCC的生理功能与其结构密切相关。然而,视盘和GCC的结构变化和功能改变往往是不一致的,这主要取决于所用检测方法的特异性和敏感性。其次,本研究中我们仅观察了3只高眼压猴的结果,样本量相对较小。由于购买和饲养猴子的成本昂贵,根据眼科学和视觉研究学会使用动物的声明,我们已经用最少的动物数量取得了有意义的结果。

总之,在高眼压造成青光眼性视神经病变和视网膜病变之前,视盘和GCC一直处于高眼压和低眼压的波动状态;由此导致的缺血再灌注交替性损伤可能是激光诱导的猴高眼压模型的病理生理特征之一。

参考文献

[1] WYGNANSKI T, DESATNIK H, QUIGLEY H A, GLOVINSKY Y. Comparison of ganglion cell loss and cone loss in experimental glaucoma[J]. *Am J Ophthalmol*, 1995, 120(2): 184-189.

[2] PEDERSON J E, GAASTERLAND D E. Laser-induced primate glaucoma. I. Progression of cupping[J]. *Arch Ophthalmol*, 1984, 102(11): 1689-1692.

[3] RADIUS R L, PEDERSON J E. Laser-induced primate glaucoma. Ⅱ. Histopathology[J]. *Arch Ophthalmol*, 1984, 102(11): 1693-1698.

[4] ZHANG Z, YANG D, SANG J, HOU R, LIU K, LI Z, *et al*. Reproducibility of macular, retinal nerve fiber layer, and ONH measurements by OCT in rhesus monkeys: The Beijing Intracranial and Intraocular Pressure (iCOP) Study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(8): 4505-4509.

[5] LIU K, WANG N, PENG X, YANG D, WANG C, ZENG H. Long-term effect of laser-induced ocular hypertension on the cone electroretinogram and central macular thickness in monkeys[J]. *Photomed Laser Surg*, 2014, 32(7): 371-378.

[6] LIU K G, PENG X Y, ZHANG Z, SUN H, YANG D Y, WANG N L. Reduction on OFF-responses of electroretinogram in monkeys with long-term high intraocular pressure[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(22): 2713-2719.

[7] RASMUSSEN C A, KAUFMAN P L. Primate glaucoma models[J]. *J Glaucoma*, 2005, 14(4): 311-314.

[8] SHINGLETON B J, RICHTER C U, DHARMA S K, TONG L, BELLOWS A R, HUTCHINSON B T, *et al*. Long-term efficacy of argon laser trabeculoplasty. A 10-year follow-up study[J]. *Ophthalmology*, 1993, 100(9): 1324-1329.

[9] AYALA M. Long-term outcomes of selective laser trabeculoplasty (SLT) treatment in pigmentary glaucoma patients[J]. *J Glaucoma*, 2014, 23(9): 616-619.

[10] JUZYCH M S, CHOPRA V, BANITT M R, HUGHES B A, KIM C, GOULAS M T, *et al*. Comparison of long-term outcomes of selective laser trabeculoplasty versus argon laser trabeculoplasty in open-angle glaucoma[J]. *Ophthalmology*, 2004, 111(10): 1853-1859.

[11] SEONG H, RYU J, YOO W S, KIM S J, HAN Y S, PARK J M, *et al*. Resveratrol ameliorates retinal ischemia/reperfusion injury in c57bl/6j mice via downregulation of caspase-3[J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42(12): 1650-1658.

[12] SCHULTZ R, WITTE O W, SCHMEER C. Increased frataxin levels protect retinal ganglion cells after acute ischemia/reperfusion in the mouse retina *in vivo*[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(10): 4115-4124.

[13] HUANG J, KATALINIC P, KALLONIATIS M, HENNESSY M P, ZANGERL B. Diurnal intraocular pressure fluctuations with self-tonometry in glaucoma patients and suspects: a clinical trial[J]. *Optom Vis Sci*, 2018, 95(2): 88-95.

[14] WANG Y X, JIANG R, REN X L, CHEN J D, SHI H L, XU L, *et al*. Intraocular pressure elevation and choroidal thinning[J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100(12): 1676-1681.

[15] WANG Y X, JIANG R, WANG N L, XU L, JONAS J B. Acute peripapillary retinal pigment epithelium changes associated with acute intraocular pressure elevation[J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(10): 2022-2028.

[16] JIANG R, XU L, LIU X, CHEN J D, JONAS J B, WANG Y X. Optic nerve head changes after short-term intraocular pressure elevation in acute primary angle-closure suspects[J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(4): 730-737.