

·综述·

OCT在小鼠眼底检查中的研究进展

孙杏红 宋清露 聂桥 袁松涛

【摘要】 OCT是应用测量光回波时间延迟的原理而获得被测组织的分层,该成像技术提供的视网膜断层截面图与组织形态学有很好的相关性。该技术目前也广泛应用于动物实验研究,特别是在小鼠的视网膜疾病研究中可以获取高分辨率的活体组织图像。现对小鼠视网膜OCT图像的成像装置、成像质量、图像分析、血流成像、疾病模型研究等方面进展进行综述。

【关键词】 体层摄影术,光学相干; 小鼠; 眼底

Developments in mice fundus examination using optical coherence tomography

Sun Xinghong, Song Qinglu, Nie Qiao, Yuan Songtao. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Yuan Songtao, Email: yuansongtao@vip.sina.com

【Abstract】 Spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) is a method that provides depth profiles of the fundus that correlate well with histological data based on the measurement of light echo time delay. It has been used in animal experiments in recent years, especially in the study of the retina in mice. It produces a high-quality live image of mice retina *in vivo*. This review presents the most recent progress on the value of using OCT devices for research on image quality, biometry, retinal blood flow imaging and disease models.

【Key words】 Tomography,optical coherence; Mice; Fundus oculi

OCT成像是一种利用光的干涉现象观察生物组织的断层成像技术,与常规组织切片相比,OCT检查具有活体、连续动态观察的优点,而且频域、谱域等新技术的运用,使得OCT在小鼠视网膜上能够观察到更多、更清楚。特别是近年来在OCT小鼠视网膜测量方面也取得了显著进展,有代替组织切片光学测量的趋势。现就OCT在小鼠眼底检查方面的研究进展作一综述。

1 检查装置和方法

目前用作获取小鼠眼底图像的OCT装置主要有2种,一是用于临床的OCT检查仪,如Heidelberg公司的Spectralis® OCT^[1]及Zeiss公司的Cirrus™ HD-OCT 4000/400^[2]。二是专用于小鼠动物实验的OCT装置,如Bioptrigen公司的Envisu R-Class Spectral Domain Ophthalmic Imaging Systems (SDOIS)^[3]和实验室中搭建的OCT设备,如Zhi等^[4]报道的Optical coherence tomography/optical microangiography (OCT/OMAG)设备。

无论采取何种装置,实验小鼠都要经过麻醉和散瞳^[5-8]。由于临床用途的OCT装置是根据人类的眼球屈光系统来设计的,而小鼠眼轴5 μm长度改变相当于1 D屈光度差异,

屈光结构与人类眼球有很大差别^[9],因此临床OCT仪用于小鼠视网膜检查时需要另外附加多个屈光透镜。就Spectralis® OCT而言(SD-OCT),需要在OCT镜头前方附加一个78 D的非接触裂隙灯前置镜,以及在小鼠角膜表面置一个规格为100 D、直径6.28 mm的角膜接触镜(Philips CAX100, IMM Photonics Ltd, Unterschleissheim, Bavaria, Germany)^[10]或者一个定制的焦距为10 mm的角膜接触镜^[10]。也有文献提出将一个25 D的间接眼底镜头放置在OCT 30°镜头前方^[11],使用规格为折射指数1.51、曲率半径1.70 mm、直径3.2 mm的角膜接触镜(Cantor-Nissel, Northamptonshire, UK)置于小鼠角膜表面^[12]。然而使用Cirrus™ HD-OCT 4000/400设备时,需要在镜头前方附加一个90 D的非接触裂隙灯前置镜,以及在小鼠角膜表面置一个普通玻片^[2]。无论使用何种角膜接触镜,在角膜接触镜和角膜之间都要滴甲基纤维素,以防止角膜空气界面的光反射及角膜干燥。

做好小鼠的实验前准备后,根据相应的OCT设备模式来获取小鼠眼底OCT图像。获取图像的时间应该控制在20 min内,以防小鼠发生白内障,影响图像信号^[13]。

2 成像质量和检测范围

现在的OCT成像技术可以实时追踪扫描点,减少眼球运动、呼吸的影响,实时修正,每个位置由多个A扫描进行信号值平均,增加了信噪比。每个B扫描又由很多A扫描构成,小鼠专用的OCT设备(Bioptigen Envisu R-Class SDOIS)

光学轴向分辨率达 $6\text{ }\mu\text{m}^{[4]}$,检测范围达 50° 视角,扫描范围达 $1.5\text{ mm}\times1.5\text{ mm}^{[14]}$,OCT/OMAG设备的扫描范围为 $2\text{ mm}\times2\text{ mm}$,横向分辨率达 $10\text{ }\mu\text{m}^{[4]}$ 。临床用途的OCT装置在扫描范围和图像分辨率上已经达到了与人眼检查接近的水平,其中SD-OCT光学轴向分辨率为 $7\text{ }\mu\text{m}$,横向分辨率为 $14\text{ }\mu\text{m}$,扫描深度达 $1.9\text{ mm}^{[5]}$ 。

SD-OCT可以提供视网膜眼底扫描图像也可以提供视网膜横截面图像,眼底图像可以看到视乳头和眼底的血管。目前小鼠OCT的截面图可以观察到视网膜各层次:脉络膜毛细血管层、视网膜色素上皮层、光感受器内外节、外界膜、外核层、外从状层、内核层、内从状层、神经节细胞层、视网膜神经纤维层,与组织HE染色切片观察到的结果^[6]一致。小鼠OCT图像质量接近人类OCT图像水平,为视网膜各层厚度的测量提供了基础。但视乳头处SD-OCT信号被视网膜血管阻挡,视网膜表面的血管也会阻挡其后方的信号^[7],或者视网膜前方有异常增生物时也会发生信号阻挡^[8]。此外,不是所有部位都能清晰显示视网膜各个层次的结构,距离小鼠视乳头较远的部位视网膜神经纤维层很薄,并不能精确地被分辨和分析计算,仅仅在离视乳头较近处的OCT扫描图像才能够分辨视网膜神经纤维层^[9]。OCT图像主要显示的是视网膜及脉络膜信号,但也能够显示玻璃体腔内的高反射信号玻璃体混浊点,并可以动态显示不同时期的混浊点的数目变化^[14]。

3 图像分析

现代OCT谱域技术的应用,使得OCT在视网膜横断面上具备了空前的成像质量。小鼠的眼底OCT图像获取之后经过处理分析,可以直接观察视网膜形态的改变,也可以通过设备生产商提供的软件或者第三方软件进行距离、体积等测量。

3.1 视网膜形态观察

掌握了小鼠视网膜SD-OCT的正常图像之后,便可知眼底是否发生病理性改变。当视网膜形态遭破坏或发生改变时,OCT图像则能敏锐地表现出来,如视网膜层次的断裂、层间的分离、异常信号团块,以及团块信号的动态变化等。在激光诱导的小鼠CNV模型研究中,SD-OCT提供了视网膜光凝的微结构,病变表现为色素上皮层上方纺锤形的高信号^[20],可以动态地观察视网膜光凝处的形态变化。通过OCT图像可以观察到外从状层的高反射信号,光感受器和视网膜色素层被破坏,光感受器下方或外核层中出现了视网膜水肿等情况^[8]。在观察视网膜形态改变时通过与眼底血管造影、组织学切片、眼底自主荧光成像相结合,可以发现在OCT表现中异常的部位往往在HE染色组织切片也有所体现。在研究小鼠视网膜脱离模型时观察到脱离的视网膜表面有高信号物质,则在组织切片对应的物质也有相应的改变^[15],在自发荧光眼底成像中的高荧光灶与SD-OCT图像的异常信号也有良好的对应关系^[8]。除了小鼠视网膜层次结构,视网膜血流情况的观察也很有实验价值,多普勒技术与OCT的结合实现了这一需求,利用相干脉冲探测多普勒频移实现了Doppler OCT^[21]。获得的图像中流向OCT探头的血流用红色表示,相反则用蓝色表示,并且该技术可以合成视网膜血管和脉络膜血管的3D

图像,为今后临床显微定量测量视网膜血流奠定了基础^[22]。

3.2 视网膜的生物学测量

OCT检查仪都附带了分析软件,特别是临床使用的OCT仪提供了丰富而且强大的图像分析功能。

首先是对OCT图像的视网膜厚度测量。很多疾病都有视网膜厚度的改变,如糖尿病视网膜病变、青光眼、视网膜色素变性等,这使得视网膜厚度的测量在实验结果分析中显得尤其重要。传统小鼠实验研究中的测量方法是选择若干张HE染色切片,每张切片选择若干点,在光学显微镜下进行测量,这种方法费时费力。而且HE染色的小鼠眼球切片制作困难,为获得合格的切片一般需要反复地摸索和训练,小鼠OCT检查使得这项测量变得简单。获取小鼠视网膜的OCT图像后,可以运用OCT设备制造商自身提供的软件手动测量,如Heidelberg Eye Explorer^[11],也可以运用第三方软件如Adobe Photoshop^[18],Image J等^[23],但是第三方软件并不是测量视网膜实际厚度,而是以像素值来表达测量值。我们的研究显示经过光学改造的Cirrus™ HD-OCT 4000/400设备所获得的小鼠视网膜OCT图像在纵向上的长度与HE染色切片中测量的数值一致,然而在横向上的长度与HE染色切片中测量的长度存在 $\hat{Y}=72.61+0.224X$ 的数值关系(\hat{Y} 代表HE染色切片中测量的视网膜横向距离,X代表在OCT图像中测量的视网膜横向距离,单位为 μm)^[2]。这为使用该方法替代小鼠视网膜HE染色切片测量提供了基础。

除了视网膜厚度的测量外,还有对视网膜神经上皮层、视网膜外核层等不同层次的厚度分析,视网膜神经纤维层分析在青光眼的研究中有重大意义^[24]。通常OCT设备有放射形、环形、线形、矩形4种扫描方式,其中环形扫描模式围绕视乳头周围的环形扫描用来测量视乳头上方、下方、鼻侧、颞侧的视网膜神经纤维层的厚度。Yang等^[25]研究了微珠诱导的小鼠青光眼模型,通过OCT测量了神经节细胞复合体:神经纤维层、神经节细胞层、内从状层的厚度,并且取了厚度比较恒定的以视乳头为中心的 $200\text{--}500\text{ }\mu\text{m}$ 同心圆范围进行测量,运用Z-stack生成了一个神经节细胞复合体厚度地形图,快速便利地完成了对神经节细胞复合体的评估。视网膜厚度的OCT测量结果与在组织学切片中的测量结果显著相关^[10]。根据实验小鼠模型的不同,可以测量视网膜的不同层次,如视网膜外层定义为内核层与外从状层之间的界限到视网膜色素层表面^[11]。

此外OCT的视网膜容积扫描模式提供了一种更加快速、便利的方法进行小鼠视网膜厚度的比较分析。如Cirrus OCT的Macular cube扫描模式,一次扫描可以提供 6 mm^3 内 512×128 个B Scan,并自动测量视网膜厚度,获得扫描区域内的视网膜容积^[2](见图1)。Bioptrigen提供的图像分析软件也有类似功能,也有实验将获得的图像导入到Photoshop C3中进行体积运算,并以像素点来计算数值^[18]。

4 OCT在小鼠视网膜疾病模型中的应用

目前激光诱导的小鼠CNV模型被应用于AMD的研究,AMD可以损坏光感受器细胞、影响视力,是工业化国家的主要致盲因素。实验过程中运用OCT技术观察CNV模型小鼠的视网膜形态改变并且测量CNV体积变化,Liu等^[10]发现激

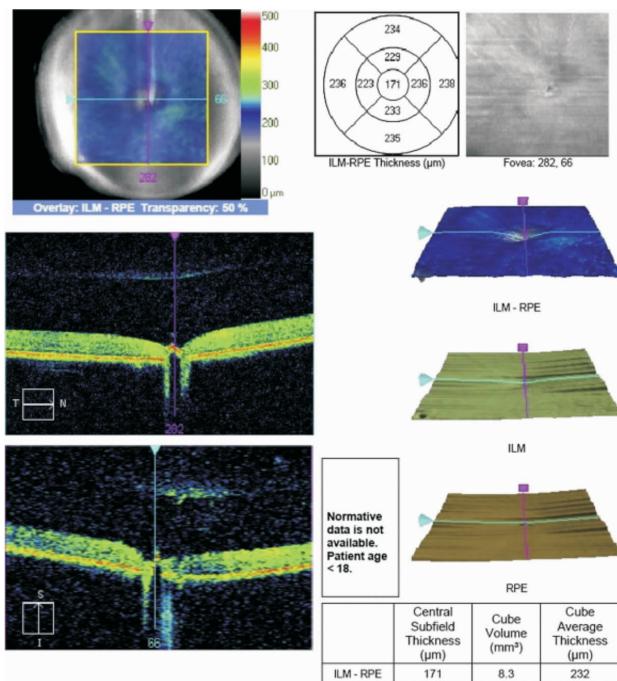


图1 运用Cirrus OCT的Macular cube模式获得的小鼠眼底扫描图像,可以提供平均视网膜厚度和容积。

光诱导的CNV团块于实验第7天处于最大体积,而于实验第14天体积开始下降,与HE染色切片观察到的结果明显相关。与CNV图像应用方法类似的实验小鼠模型还有视网膜脱离模型,经巩膜于视网膜下腔注射透明质酸或无菌平衡盐溶液^[26],造成小鼠视网膜脱离,通过OCT观察小鼠视网膜脱离的体积与视网膜形态的变化,Cebulla等^[26]研究发现视网膜脱离的高度随着病程的进展降低。

不光是观察形态改变和计算病变部位体积,视网膜各层次的厚度分析比较也被应用在很多疾病模型的实验中。例如Akimba糖尿病小鼠^[12]使用OCT测量视网膜全层厚度提示Akimba小鼠视网膜厚度降低,Rs1h-/-y小鼠作为XLR5模型通过OCT发现于3个月鼠龄时视网膜劈裂达到最高峰^[8],Guo等^[27]报道的视网膜色素变性小鼠模型实验结果揭示CCR2-/-rd10与CCR2+/+rd10相比视网膜全层厚度明显增厚。

OCT成像技术不仅应用于成年小鼠的实验中,还可以运用于观察怀孕雌鼠子宫内的胚胎期小鼠,Pax6-SV40 T-抗原转基因视网膜母细胞模型^[28]小鼠的眼球结构于胚胎期运用OCT技术获得,获得的图像与正常胚胎小鼠相比,发现结构差异很明显。

5 展望

综上所述,OCT检查技术在小鼠视网膜图研究领域发挥了重要的作用。目前获取小鼠眼底OCT图像主要通过小鼠专用OCT设备或经过附加光学组件的临床OCT设备,临床OCT设备优势在于节约设备成本,小鼠OCT的优势在于专用,不需要附加光学镜头,操作简单。小鼠眼底OCT检查方法今后有可能完全替代组织切片光镜测量,提供更方便快捷的实验方法,但是目前无论使用哪一种检查设备都需要计算出

OCT图像和组织切片图像在生物学测量数值上是否存在放大倍率问题。如果这一目标得以实现,即可对小鼠视网膜进行动态测量,将会节约大量人力和实验动物成本。OCT在小鼠眼底研究方面将有更广阔的前景。

参考文献:

- Fischer MD, Zhou A, Kernstock CJ. Phenotyping of mouse models with OCT[J]. Methods Mol Biol, 2013, 935: 79-85.
- Song Q, Sun X, Nie Q, et al. A novel method of multi-parameter measurements for the mouse retina in vivo using optical coherence tomography[J]. Exp Eye Res, 2014, 121: 66-73.
- Ferguson LR, Balaiya S, Grover S, et al. Modified protocol for in vivo imaging of wild-type mouse retina with customized miniature spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) device[J]. Biol Proced Online, 2012, 14: 1-6.
- Zhi Z, Yin X, Dziennis S, et al. Optical microangiography of retina and choroid and measurement of total retinal blood flow in mice[J]. Biomed Opt Express, 2012, 3: 2976-2986.
- Gabriele ML, Ishikawa H, Schuman JS, et al. Reproducibility of spectral-domain optical coherence tomography total retinal thickness measurements in mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51: 6519-6523.
- Liu T, Hui L, Wang Y, et al. In-vivo investigation of laser-induced choroidal neovascularization in rat using spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT)[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2013, 251: 1293-1301.
- Chauhan BC, Stevens KT, Levesque JM, et al. Longitudinal in vivo imaging of retinal ganglion cells and retinal thickness changes following optic nerve injury in mice[J]. PLoS One, 2012, 7: e40352.
- Zhou A, Bolz S, Grimm C, et al. In vivo imaging reveals novel aspects of retinal disease progression in Rs1h (-/Y) mice but no therapeutic effect of carbonic anhydrase inhibition[J]. Vet Ophthalmol, 2012, 15: 123-133.
- Schmucker C, Schaeffel F. A paraxial schematic eye model for the growing C57BL/6 mouse[J]. Vision Res, 2004, 44: 1857-1867.
- Fischer MD, Huber G, Beck SC, et al. Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography[J]. PLoS One, 2009, 4: e7507.
- McLenahan S, Chen X, McMenamin PG, et al. Absence of clinical correlates of diabetic retinopathy in the Ins2Akita retina[J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2013, 41: 582-592.
- Rakoczy EP, Rahman ISA, Binz N, et al. Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization [J]. Am J Pathol, 2010, 177: 2659-2670.
- Gabriele ML, Ishikawa H, Schuman JS, et al. Optic nerve crush mice followed longitudinally with spectral domain optical coherence tomography[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52: 2250-2254.
- Pennesi ME, Michaels KV, Magee SS, et al. Long-term characterization of retinal degeneration in rd1 and rd10 mice using spectral domain optical coherence tomography[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53: 4644-4656.
- Alex AF, Heiduschka P, Eter N. Retinal fundus imaging in mouse models of retinal diseases[J]. Methods Mol Biol, 2013, 935: 41-67.
- Sham CW, Chan AM, Kwong JMK, et al. Neuronal Programmed cell death-1 ligand expression regulates retinal ganglion cell number in neonatal and adult mice[J]. J Neuroophthalmol, 2012, 32: 227-237.
- Mohan K, Harper MM, Kecova H, et al. Characterization of

- structure and function of the mouse retina using pattern electroretinography, pupil light reflex, and optical coherence tomography[J]. *Vet Ophthalmol*, 2012, 15: 94–104.
- [18] Ruiz A, Mark M, Jacobs H, et al. Retinoid content, visual responses, and ocular morphology are compromised in the retinas of mice lacking the retinolbinding protein receptor, STRA6[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 3027–3039.
- [19] Yang X, Chou TH, Ruggeri M, et al. A new mouse model of inducible, chronic retinal ganglion cell dysfunction not associated with cell death[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54: 1898–1904.
- [20] Hoerster R, Muether PS, Vierkotten S, et al. In-vivo and ex-vivo characterization of laser-induced choroidal neovascularization variability in mice[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250: 1579–1586.
- [21] Yazdanfar S, Rollins AM, Izatt JA. In vivo imaging of human retinal flow dynamics by color Doppler optical coherence tomography[J]. *Arch Ophthalmol*, 2003, 121: 235–239.
- [22] Liu JJ, Grulkowski I, Kraus MF, et al. In vivo imaging of the rodent eye with swept source/Fourier domain OCT[J]. *Biomed Opt Express*, 2013, 4: 351–363.
- [23] Knott EJ, Sheets KG, Zhou Y, et al. Spatial correlation of mouse photoreceptor-RPE thickness between SD-OCT and histology[J]. *Exp Eye Res*, 2011, 92: 155–160.
- [24] Nakano N, Ikeda HO, Hangai M, et al. Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52: 8754–8762.
- [25] Yang Q, Cho KS, Chen H, et al. Microbead-induced ocular hypertensive mouse model for screening and testing of aqueous production suppressants for glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 3733–3741.
- [26] Cebulla CM, Ruggeri M, Murray TG, et al. Spectral domain optical coherence tomography in a murine retinal detachment model[J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90: 521–527.
- [27] Guo C, Otani A, Oishi A, et al. Knockout of ccr2 alleviates photoreceptor cell death in a model of retinitis pigmentosa[J]. *Exp Eye Res*, 2012, 104: 39–47.
- [28] Larina IV, Syed SH, Sudheendran N, et al. Optical coherence tomography for live phenotypic analysis of embryonic ocular structures in mouse models[J]. *J Biomed Opt*, 2012, 17: 081410–081411.

(收稿日期:2014-07-03)

(本文编辑:季魏红)

·读者·作者·编者·

本刊行业公知公认名词缩略语

中文全称	英文全拼, 缩写
单纯疱疹病毒	herpes simplex virus,HSV
单纯疱疹病毒性角膜炎	herpes simplex keratitis,HSK
穿透性角膜移植术	penetrating keratoplasty,PKP
前板层角膜移植术	anterior lamellar keratoplasty,ALK
深板层角膜移植术	deep lamellar keratoplasty,DLK
晶状体后囊膜混浊	posterior capsular opacification,PCO
白内障囊内摘除术	intracapsular cataract extraction,ICCE
白内障囊外摘除术	extracapsular cataract extraction,ECCE
人工晶状体	intraocular lens,IOL
原发性闭角型青光眼	primary angle-closure glaucoma,PACG
原发性开角型青光眼	primary open angle glaucoma,POAG
眼内压	intraocular pressure,IOP
视网膜色素上皮	retinal pigment epithelium,RPE
脉络膜新生血管	choroidal neovascularization,CNV
眼底荧光素血管造影	fundus fluorescein angiography,FFA
吲哚菁绿血管造影	indocyanine green angiography,ICGA
中心性浆液性脉络膜视网膜病变	central serous chorioretinopathy,CSC
年龄相关性黄斑变性	age-related macular degeneration,AMD
视网膜电图	electroretinogram,ERG
视觉诱发电位	visual evoked potential,VEP
硬性透氧性角膜接触镜	rigid gas-permeable contact lens,RGPCL
屈光性角膜切削术	photorefractive keratectomy,PRK
准分子激光角膜原位磨镶术	laser in situ keratomileusis,LASIK
准分子激光角膜上皮瓣下磨镶术	laser epithelial keratomileusis,LASEK
前弹力层下角膜磨镶术	sub-Bowman's keratomileusis,SBK
飞秒激光小切口透镜取出术	small incision lenticule extraction,SMILE
中央角膜厚度	central corneal thickness,CCT
角膜上皮下混浊	haze
光学相干断层扫描	optical coherence tomography,OCT
超声生物显微镜	ultrasound biomicroscopy,UBM
最佳矫正视力	best corrected visual acuity,BCVA
裸眼视力	uncorrected visual acuity,UCVA