

·论著·

N-亚硝基-N-甲基脲诱导视网膜变性小鼠模型的特征

王晓琴 陈媛媛 邢怡桥

【摘要】 目的 探讨 N-亚硝基-N-甲基脲(MNU)诱导的小鼠视网膜退行性病变的形态和电生理特征。方法 实验研究。32 只 5 周龄的成年 C57/BL 小鼠随机分为对照组和 MNU 造模组,分别腹腔注射 0.9%氯化钠溶液和 MNU($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。在给药后 3、7 和 14 d 取视网膜,免疫荧光染色观察光感受器形态、氧化损伤情况和神经节细胞的数量。电镜观察细胞核、线粒体和带状突触(synaptic ribbon)的超微结构。Ganzfeld 视网膜电图(ERG)检测暗适应最大混合反应。采用独立样本 *t* 检验进行数据分析。结果 免疫荧光显示:注射 MNU 后外核层(ONL)的厚度逐渐减小,OPN1SW 标记的光感受器细胞的外节(OS)逐渐损伤,GFAP 标记的 Müller 细胞增生明显,ONL 层硝基酪氨酸(Nitrotyrosine)着色增多提示 MNU 能导致氧化损伤。Brn-3a 标记的神经节细胞数量减少不明显。扫描电子显微镜显示:MNU 处理后,光感受器细胞的核呈浓染色,线粒体和带状突触消失。ERG 结果显示:MNU 处理后 3 d 最大混合反应的 a 波和 b 波振幅下降。结论 MNU 导致视网膜外核层和外丛状层的凋亡,电生理表现和视网膜色素变性疾病一致。

【关键词】 视网膜变性; N-亚硝基-N-甲基脲; 显微镜检查,电子; 视网膜电描记术; 小鼠

Morphologic characteristics of N-Nitroso-N-methylurea-induced retinal degeneration in mice

Wang Xiaoqin, Chen Yuanyuan, Xing Yiqiao. Department of Ophthalmology, Wuhan University, Renmin Hospital, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Xing Yiqiao, Email: drcyy@whu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the characteristics of N-Nitroso-N-methylurea (MNU) induced retinal degeneration in mice. **Methods** Experimental study. Thirty-two C57/BL mice (5 weeks) in total were randomly divided into two groups: a control group and a MNU group. Sixty $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of MNU was intraperitoneally injected in mice, leading to damage of retinal photoreceptors, while the control group was given physiological saline. The eyes of each group were enucleated at 3 d, 7 d and 14 d after injection. The slides were stained by immunofluorescence labeling to observe the morphological changes to the photoreceptors in MNU-induced retinal damage. Retinal flat-mount immunofluorescence was performed to observe the change in ganglion cells. The ultrastructures of the nucleus, mitochondria and synaptic ribbon were observed under transmission electron microscope. Ganzfeld electroretinogram ERG was used to test the electrophysiological changes. The data were analyzed using independent *t* test. **Results** After MNU administration, immunofluorescence labeling showed a gradual decrease in the thickness of the outer nuclear layer (ONL), the loss of photoreceptors labeled with anti-OPN1SW, reactive gliosis with anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) and oxidative damage in photoreceptors labeled with anti-nitrosylation. Brn-3a labeled ganglion cells did not appear to be lost two weeks after MNU administration. Electron microscopy showed concentrated coloring of the nucleus in the photoreceptor nucleus and the disappearance of mitochondria and metabolic synaptic ribbons after MNU administration. ERGs revealed that mice with MNU treatment showed a-waves and b-waves with reduced amplitudes. **Conclusion** MNU induced retinal apoptosis of ONL and outer plexiform layer. MNU administrated mice show similar electrophysiological results to retinitis pigmentosa.

【Key words】 Retinal degeneration; N-Nitroso-N-methylurea; Microscopy, electron; Electroretinogram; Mice

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2015.06.008

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81270998,8127102)

作者单位:430060 武汉大学人民医院眼科

通信作者:邢怡桥,Email:drcyy@whu.edu.cn

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一类重要的致盲眼病, 光感受器细胞功能障碍是这种疾病视力丧失的主要原因。视网膜光感受器细胞损伤的小鼠模型大致分为 2 种: 遗传型和诱导型。在诱导型小鼠模型中, 常见有毒刺激包括光和化学品, 其中 N-亚硝基-N-甲基脲 (N-Nitroso-N-methylurea, MNU) 能诱导视网膜光感受器细胞凋亡, 常用于视网膜变性疾病模型的建立^[1]。基因突变或转基因小鼠是在出生后自发产生光感受器细胞的凋亡, 其出现凋亡的时间和程度是有明显的个体差异的。在诱导型模型中, 可以根据需要, 自主控制损伤的时间和程度, 这是相比遗传型模型而言诱导型模型的主要优点。此外, 遗传型动物模型在胚胎时期就有基因突变, 在视网膜光感受器细胞凋亡之前, 就会对视网膜其他细胞的发育造成影响; 而诱导型模型是在健康成年小鼠上给刺激, 所以就不存在类似问题。MNU 诱导的视网膜变性损伤主要集中在外核层 (outer nuclear layer, ONL) 的光感受器细胞, 与其临近的视网膜色素上皮 (RPE) 层和内核层 (inner nuclear layer, INL) 的大体形态保留, 与其较远的内丛状层 (inner plexiform layer, IPL) 和神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL) 无明显变化。本研究用电镜观察发现介导细胞凋亡的线粒体超微结构和带状突触均有变化, 此外还观察了 MNU 诱导视网膜光感受器细胞凋亡模型的血管损伤情况和电生理特征。

1 对象与方法

1.1 对象

实验采用 5 周龄的 C57/BL 小鼠, 体质量为 18~22 g (武汉大学实验动物中心提供), 饲养在 SPF 级屏障系统, 温度和湿度恒定, 具有 12 h/12 h 昼夜节律。32 只 (雌雄各半) C57/BL 小鼠按随机数字表法分为 2 组: 对照组和 MNU 组。所有动物的饲养与处死均按照美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 的《实验动物管理及使用指南》进行。

1.2 主要试剂

MNU 粉剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 按照生产商的说明, 用无菌的 0.9% 氯化钠溶液配制成 1% 的 MNU 溶液, 4 °C 避光保存备用。羊源 OPN1SW 多克隆抗体、羊源 PKC α 多克隆抗体和羊源 Brn3a 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 鼠源 Nitrotyrosine 单克隆抗体购自 Millipore 公司, 鼠源 VEGF 单克隆抗体购自 Sigma-Aldrich 公司, Alexa Fluor 594 标记的 GS isolectin IB4 购自 Invitrogen 公司。冰冻切片包埋剂 (optimal cutting temperature, OCT) 购自

Sakura 公司。

1.3 造模和组织制备

MNU 组按照 60 mg·kg⁻¹ 的剂量给予小鼠腹腔注射 MNU (含 0.05% 的乙酸), 对照组给予含乙酸 (0.05%) 的无菌 0.9% 氯化钠溶液。给药后 3、7、14 d 对小鼠行颈椎脱臼处死, 剝除眼球后剪除眼前节和玻璃体, 将视杯放在用磷酸盐缓冲液 (PBS) 新鲜配制 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 梯度脱水: 10% 和 20% 的蔗糖溶液中 4 °C 各放置 2 h, 30% 蔗糖溶液中 4 °C 过夜, 蔗糖溶液用 PB 缓冲液配制。标本沉降到 30% 溶液后说明脱水完成, 用 OCT 胶 (Tissue-Tek OCT Compound) 包埋后液氮速冻, 垂直视网膜面以 12 μ m 厚度行冰冻视网膜切片。

1.4 免疫组化实验

视网膜冰冻切片在封闭液中孵育 2 h, 封闭液 (BSAT) 是含 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.2% 的 Triton X-100 的磷酸盐缓冲液。封闭液稀释—抗 4 °C 过夜, 用含 0.2% 的 Triton X-100 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤 5 次, 每次 5 min。用对应的二抗室温孵育 2 h, 用 PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染核 30 min, 用 PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min, 用抗淬灭封片剂 (碧云天公司) 封片。所用一抗包括: 山羊抗 OPN1SW (货号 SC-14363, 1:200 稀释) 用于标记蓝色敏感视锥细胞; 山羊抗 PKC α (货号 SC-208, 1:200 稀释) 用于标记视杆双极细胞; 山羊抗 Brn-3a (货号 SC-31984, 1:200 稀释) 用于标记神经节细胞; 小鼠抗 GFAP (货号 G3893, 1:1000 稀释) 用于标记 Müller 细胞; 小鼠抗 Nitrotyrosine (货号 G3893, 1:100 稀释) 用于标记硝基化的酪氨酸。所用的二抗包括: Cy3 标记的驴抗山羊 IgG (PTGLab 公司, 1:200 稀释) 和 FITC 标记的驴抗小鼠 IgG (PTGLab 公司, 1:200 稀释)。对距离视盘 400 μ m 的视网膜组织进行观察, 图片用荧光显微镜 (BX53, 日本 Olympus 公司) 采集成像。Adobe Photoshop CS5 软件对图片进行剪裁拼接。

1.5 电子显微镜观察

组织取材后 2.5% 戊二醛前固定, 0.1 mmol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次后再用锇酸 (O₃O₄ 1%) 固定, 0.1 mmol/L 的 PB 磷酸缓冲液漂洗 3 次, 梯度酒精脱水 (50%、70%、80%、95%、100% 2 次), 每次 15 min。纯丙酮脱水 2 次 (15 min), EPON812: 丙酮 (1:1) 浸透 30 min, 纯包埋液浸透 1 h, 纯包埋液固化 37 °C 放置 24 h, 再 60 °C 放置 48 h。瑞典 BROMMA 公司产 LKB-V 型超薄切片机切片后, 用醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色, 经日本日立公司生产的日立 H-600 型

透射电镜观察。

1.6 全视网膜铺片免疫荧光

去除眼前节、晶状体和玻璃体的视杯在新鲜配制的4%多聚甲醛中固定1 h,4个钟点位做松解切口,去除巩膜,神经节细胞面朝上行视网膜铺片,在封闭液BSAT中进行室温孵育2 h,用封闭液稀释羊抗Brn3a在4℃孵育48 h,用PBST洗涤5次,每次10 min,用Cy3标记的驴抗山羊IgG室温孵育4 h,用抗淬灭封片剂封片,用荧光显微镜(BX53)观察和拍照。

1.7 视网膜血管染色

去除眼前节的视杯在新鲜配制的4%多聚甲醛中固定30 min,在4个钟点位做松解切口,去除巩膜后,神经节细胞面朝上行视网膜铺片,在封闭液BSAT中进行室温孵育2 h,Alexa Fluor 594标记的GS isolectin IB4(货号:121413,1:200)用BSAT封闭液稀释,在4℃孵育16 h,用PBS洗涤5次,每次10 min,用抗淬灭封片剂封片,用荧光显微镜(BX53)观察和拍照。

1.8 视网膜电图(ERG)检查

小鼠在暗室内暗适应12 h后,在暗室内弱红光照明下,用10%水合氯醛腹腔注射(0.4 g/kg)麻醉,固定小鼠到Gansfield ERG(Phoenix公司MICRO IV系列)金属试验台的保温垫上,参考电极和接地电极分别插入到两耳之间和尾根部皮下,用眼内黏弹剂涂抹眼球表面保护角膜和降低干扰,移动金属试验台后微调,使角膜和金属环形记录电极接触,金属试验台与放大器连接地线,通过给单色光(绿光)刺激闪光模式进行数据采集。根据国际临床视觉电生理学学会(ISCEV)2008年制定的标准化方案^[2],记录暗适应后的最大混合反应a波和b波的振幅。

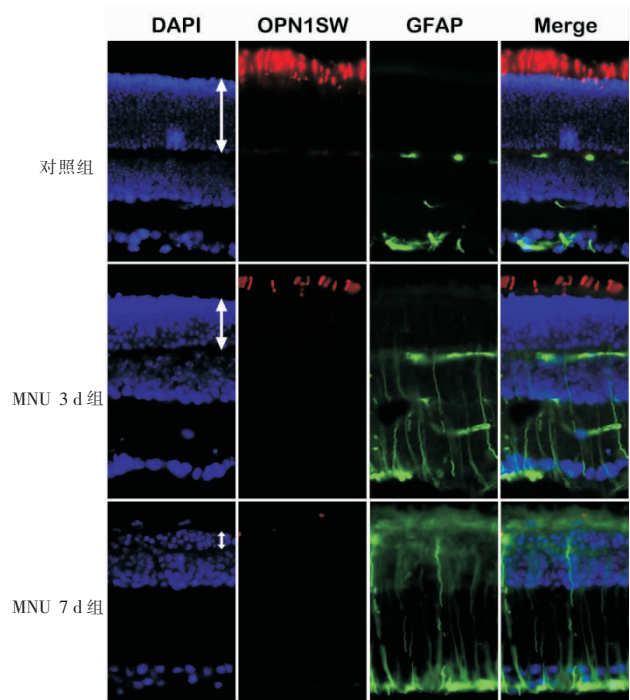
1.9 统计学方法

实验研究。用Image J软件对每平方微米面积的神经节细胞个数进行计数,使用SPSS 16.0统计软件进行分析,对照组和造模组神经节细胞数目的比较采用独立样本t检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MNU导致光感受器损伤和免疫增生

对给药后3 d和7 d的视网膜切片进行免疫荧光染色(见图1)。在对照组,DAPI染色显示视网膜核分布呈正常形态,由外向内分为ONL、INL和GCL 3个核层,在视网膜的中周边部分,ONL的厚度大约是INL厚度的2倍;OPN1SW标记的短波长视锥细



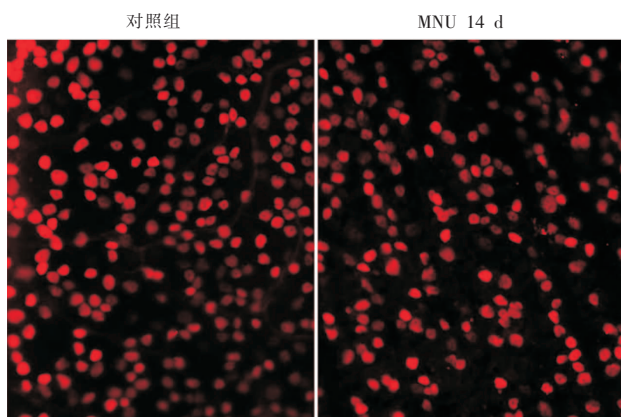
在对照组,DAPI染色显示3个核层(蓝色),视网膜ONL(双箭头)厚度约为INL的2倍;通过免疫荧光染色,OPN1SW标记(红色)的视锥细胞密集,GFAP标记(绿色)的Müller细胞散在分布于视网膜的内层。MNU处理后3 d,ONL(双箭头)明显变薄,INL和GCL的厚度无明显变化;视锥细胞大量丢失,Müller细胞反应性增生,遍及整个视网膜。MNU处理后7 d,ONL(双箭头)仅剩2~3个细胞核层,视锥细胞完全消失,胶质增生反应遍及整个视网膜。

图1 N-亚硝基-N-甲基脲(MNU)导致小鼠光感受器的逐渐丢失和Müller细胞信号增多($\times 400$)

胞浓密完整,红色荧光着色的外节(outer segment, OS)呈竖杆状结构;GFAP用于标记Müller细胞,在垂直切面上观察,绿色荧光信号主要集中在内侧的视网膜。MNU处理后3 d,视网膜出现明显的损伤,ONL厚度变薄,和INL厚度接近,而INL和GCL厚度未见明显变化;OPN1SW标记的视锥细胞数量明显减少,红色的杆状OS结构变短;GFAP标记的Müller细胞增生非常明显,分布于整层视网膜。MNU处理后7 d,光感受器细胞丢失更严重,ONL仅剩2~3层细胞核,而INL和GCL厚度仍未见明显变化;OPN1SW标记的视锥细胞OS层完全消失,GFAP标记的Müller细胞增生更明显。

2.2 MNU对视网膜神经节细胞的影响

用Brn3a抗体进行视网膜铺片免疫荧光染色,Brn3a标记神经节细胞的核,观察给MNU前后神经节细胞的数量变化(见图2)。与对照组相比,给MNU后14 d的神经节细胞形态和数量变化不明显,用Image J软件对2组(每组4个样本)的单位面积(每平方毫米)的神经节细胞个数进行计数,2组



通过视网膜铺片,对神经节细胞进行 Brn3a 免疫荧光染色,显示神经节细胞的核。在对照组和 MNU 处理后 14 d 组,神经节细胞的数量减少不明显

图 2 N-亚硝基-N-甲基脘(MNU)对小鼠视网膜神经节细胞的影响($\times 400$)

差异无统计学意义($t=0.58, P>0.05$)。

2.3 MNU 诱导模型的氧化损伤

为了观察 MNU 诱导模型的氧化损伤情况,用氧化损伤标记物对视网膜切片进行免疫荧光染色(见图 3)。在对照组的视网膜,仅见散在的 Nitrotyrosine 着色分布在内层的视网膜;注射 MNU 后 7 d, ONL 丢失明显,但可观察到明显的 Nitrotyrosine 信号增多。首次用 GS isolection IB6 对 MNU 模型的视网膜血管进行染色观察(见图 4)。在对照组视网膜显示正常形态的血管;给 MNU 后 14 d,发现视网膜的大血管结构被破坏,在末梢血管,出现特征性的膨大的血管丛样结构。

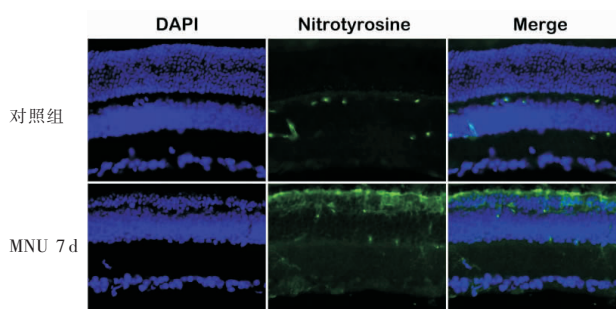
2.4 MNU 导致视网膜损伤的超微结构特征

用高分辨率透射电子显微镜观察到 MNU 导致的视网膜的亚细胞超微结构变化(见图 5)。在未经处理的对照组,显示正常的光感受器细胞核形态;给 MNU 后,光感受器细胞的核固缩,呈浓染色。正常对照组,线粒体位于外节和外核层之间的内节(inner segment, IS);给 MNU 后 3 d, OS 消失, IS 变薄,线粒体的数量急剧下降,观察到的残余线粒体结构出现肿胀。带状突触(ribbon synapse)是释放神经递质的一个重要细胞结构。正常情况下,带状突触位于外丛状层(outer plexiform layer, OPL),在电镜下,典型的带状突触位于 1 个三角结构的夹角部位,是呈拱形的电子高致密的结构。小鼠的突触带一般有 30 nm 厚,长 200~1 000 nm,位于突触前,锚定在突触前膜上,电镜上常观察到带状突触两侧有囊泡结构,是相邻的水平细胞形成的内陷部位^[9],下游的双极细胞树突也参与组成这一特殊类型的突触结构。如图箭

头所示显示 2 个邻近的带状突触(见图 5E)。在 MNU 给药 3 d 后,在 ONL 的囊泡和细胞间缝隙连接结构尚存。但带状突触大部分消失;和正常带状突触结构相比,观察到的残留的少量带状突触,其长度变短,结构界限模糊,缺乏典型的内陷的突触结构(见图 5F)。MNU 给药 7 d 后, ONL、IPL 和 GCL 的结构在电镜下观察未见明显变化。在实验中,未见明显的细胞迁移现象,仅观察到光感受器的色素颗粒形成双层的结构。

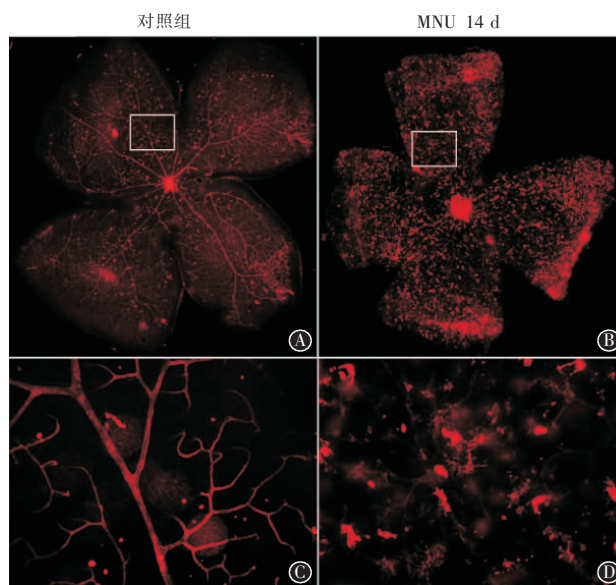
2.5 MNU 导致 ERG 变化

ERG 结果显示:MNU 处理后,小鼠 ERG 最大混合反应的 a 波和 b 波振幅明显下降(见图 6)。对照组的 a 波振幅为 $(51.9 \pm 3.7) \mu V$, MNU 处理 3 d 后, a 波



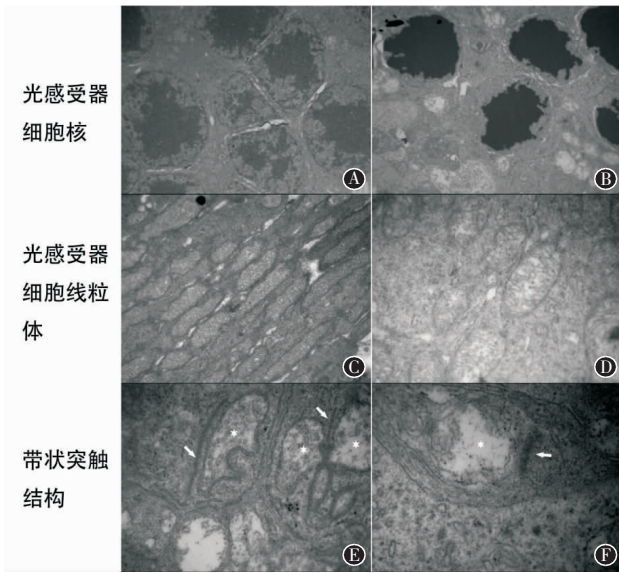
对视网膜进行染色,在对照组, Nitrotyrosine 信号少量着色散在分布于 OPL、ONL、IPL;在 MNU 处理后 7 d,在 ONL 层观察到浓密的 Nitrotyrosine 着色。MNU 示 N-甲基-N-亚硝基脘

图 3 Nitrotyrosine 抗体染色显示 N-亚硝基-N-甲基脘(MNU)对小鼠视网膜的氧化损伤情况($\times 400$)



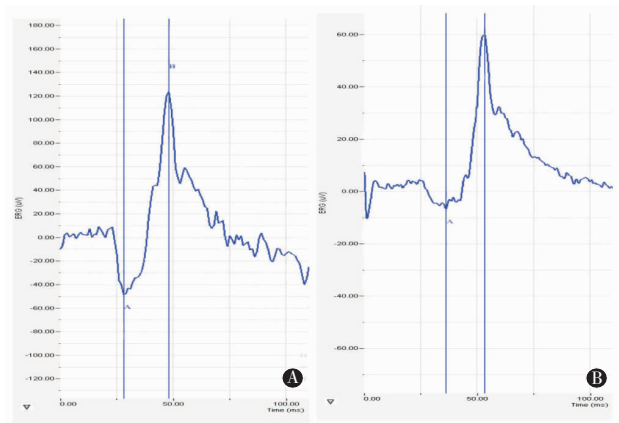
A, 在对照组,视网膜血管呈正常的形态($\times 40$); B, 在 MNU 处理后 14 d, 视网膜血管壁受到破坏($\times 40$)。下图分别为对应上图的局部(白框内)放大, C, 对照组视网膜呈现正常的血管末梢, D, MNU 处理后, 可见末梢血管呈膨大的血管丛样结构($\times 200$)

图 4 GS Isolection IB4 染色显示经 N-亚硝基-N-甲基脘(MNU)处理后的小鼠视网膜血管



A, 对照组的正常形态的光感受器细胞核($\times 10\ 000$); B, MNU 处理后 3 d 光感受器的核固缩浓染($\times 10\ 000$); C, 对照组的正常的线粒体超微结构($\times 20\ 000$); D, MNU 处理后 3 d 肿胀的线粒体超微结构($\times 20\ 000$); E, 对照组 2 个邻近的典型的带状突触结构(箭头), 其两侧可见水平细胞(星号)的内陷结构($\times 20\ 000$); F, MNU 处理后 3 d 的带状突触结构, 其长度变短, 边界模糊, 缺乏特征性的凹陷结构($\times 20\ 000$)

图 5 电子显微镜显示 N-亚硝基-N-甲基脘(MNU)诱导的小鼠视网膜光感受器细胞超微结构的变化



A, 对照小鼠全视野 ERG 最大混合反应的波形; B, MNU 处理后 3 d 小鼠的全视野 ERG 混合反应的波形

图 6 对照组和 N-亚硝基-N-甲基脘(MNU)组小鼠的 ERG

振幅是 $(15.4 \pm 4.4) \mu V$ 。对照组最大混合反应 b 波振幅为 $(144.4 \pm 15.8) \mu V$, MNU 处理 3 d 后, b 波振幅是 $(52.3 \pm 7.2) \mu V$ 。经 MNU 处理后, a 波和 b 波的波幅明显下降, 2 组差异有统计学意义 ($t=6.4, 5.3, P<0.05$)。

3 讨论

MNU 是烷基化衍生物, 也是一种强效致癌物质, 常作为致畸和诱变剂用于实验室动物模型的建立, 文献报导 MNU 也能导致视网膜变性, 并且其发

生较早, 往往早于肿瘤的发生, 单次腹腔给药能在 1 周之内造成严重的光感受器细胞损害^[4]。虽然视网膜色素变性也有其他模型, 比如转基因动物模型^[5-6], 但 MNU 诱导的视网膜变性疾病模型仍具有独特的优势, 体现在以下几个方面: 诱导疾病发生的时间可以很灵活地控制, 其损伤的严重性和剂量有关系, 因此可以控制损伤的程度; MNU 诱导模型可以排除基因缺陷本身对视网膜组织发育的影响; 实验操作方便, 单次腹腔处理就能达到实验目的; 此外, MNU 可以诱导多种动物视网膜变性损伤^[7], 并且各种动物中的损伤特点基本一致, 主要位于光感受器细胞层。在此基础之上, 笔者进一步观察了 MNU 诱导的视网膜退行性病变模型的突触超微结构、氧化损伤情况和血管形态变化。

MNU 导致的凋亡呈现由外至内逐渐发展的趋势, 并在 7 d 左右稳定。给 MNU 后 1~2 d, OS 损伤, 位于 OPL 的正常形态的带状突触结构减少; 给 MNU 后 3~4 d, OS 消失, 位于 IS 的光感受器细胞线粒体严重肿胀或消失, 带状突触结构消失; 给 MNU 后 5~7 d, IS 和 OS 全部消失, 光感受器细胞的核呈浓染或消失。但观察到 MNU 后 2~4 周, 仍未见明显的 IPL 和 GCL 的细胞丢失, 和以往文献报道^[8]一致。实验还观察到 GFAP 表达增多, 显示视网膜的 Müller 细胞增生, 提示视网膜内的免疫保护机制被启动。视网膜全铺片染色观察神经节细胞的密度, 经统计分析, 造模组和对照组之间差异没有统计学意义。

电镜显示 MNU 损伤后 ONL 细胞核呈浓染色, 和以往光感受器的损伤的报道^[4]是一致的。此外还首次观察了线粒体和带状突触的结构变化。MNU 处理后的前 3 d, 线粒体就大量消失, 残留的线粒体显示肿胀的形态。正常情况下, 光感受器细胞的线粒体位于 OS 和 ONL 之间, 给 MNU 后 3 d, 位于光感受器 IS 的线粒体大量消失, 电镜下显示 RPE 细胞层几乎与浓缩的细胞核紧邻。带状突触是光感受器视网膜释放神经递质的重要的特异性结构, 在 MNU 处理后的第 3 天, 由于大部分带状突触结构消失, 仅观察到少量异化的带状突触结构, 带状突触与顶角部位的距离变长, 典型的内陷结构消失, 电子高密度结构消失, 说明视网膜的神经递质释放的结构也发生紊乱。此外, 本研究首次观察到 MNU 模型中较大血管受到损伤, 末梢血管呈膨大的血管丛样结构, 这一结构和遗传性视网膜色素变性动物 RCS 大鼠中观察到的血管结构一样^[9-10]。

本实验所用的最新一代的小鼠 ERG 仪器可以给 2 种单色光: 紫外和绿光。和人类不同, 啮鼠动物

只有2种视锥细胞;S型和M型,视杆细胞和M型视锥细胞对绿光(中等波长)敏感,S型视锥细胞对紫外光(短波长)敏感。因此用绿光检测视杆细胞和M型视锥细胞的电生理活动。a波起源于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。MNU损伤主要位于视网膜的ONL,所以a波振幅下降。双极细胞作为光感受器细胞的下游神经元,其树突其实是损伤的^[8],因此造成了b波振幅一定程度的下降。

视网膜变性疾病的根源位于为视网膜神经细胞提供营养支持的RPE和脉络膜,最常见的是基因缺陷导致RPE细胞上蛋白的功能异常,最终导致光感受器细胞的凋亡。本实验组利用电镜观察,发现给MNU后RPE细胞的大体轮廓存在,但色素颗粒向视网膜的内侧稍移位,形成双层色素颗粒的结构。MNU对视网膜血管是有损伤的,通过全身给药,MNU很可能对富含血管的脉络膜也有损伤。失去脉络膜和RPE细胞的营养支持,也是光感受器细胞损伤的一个重要机制。光感受器细胞的外节盘膜每日更新,对营养物质的需求较大,内节富含大量的线粒体,光感受器细胞是能量代谢旺盛的组织,因此可能对MNU导致氧化损伤更敏感,成为损伤最严重的视网膜细胞。

MNU造成视网膜损伤的分子机制公认是通过凋亡来实现的^[11],在同为神经元变性疾病的阿尔兹海默疾病的研究中发现,氧自由基通过硝基(Nitrotyrosine)和亚硝基化(Nitrosylation)途径能抑制线粒体复合物I的活性^[12],从而启动线粒体凋亡途径,与本实验观察到的硝基化信号增多和线粒体损伤结果一致。据文献报道,MNU诱导的光感受器细胞凋亡还可能通过以下信号途径:Caspase-3、Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)、nuclear factor-kB^[13-15]。综合以上特征,通过MNU诱导,造成选择性的视网膜光感受器细胞损伤,病理生理改变上,与视网膜变性疾病有很多共同的机制,能为研究视网膜变性疾病提供一定意义上较为理想的动物模型。

参考文献:

- [1] Nambu H, Yuge K, Nakajima M, et al. Morphologic characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in C57BL mice[J]. *Pathol Int*,1997,47(6):377-383.
- [2] Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update)[J]. *Doc Ophthalmol*,2009,118(1):69-77.
- [3] Sterling P, Matthews G. Structure and function of ribbon synapses[J]. *Trends Neurosci*,2005,28(1):20-29.
- [4] Taomoto M, Nambu H, Senzaki H, et al. Retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea in Syrian golden hamsters[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*,1998,236(9):688-695.
- [5] McCall MA, Gregg RG, Merriman K, et al. Morphological and physiological consequences of the selective elimination of rod photoreceptors in transgenic mice[J]. *Exp Eye Res*,1996,63(1):35-50.
- [6] Hong DH, Pawlyk BS, Shang J, et al. A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000,97(7):3649-3654.
- [7] Yoshizawa K, Tsubura A. Characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals and application for the therapy of human retinitis pigmentosa[J]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*,2005,109(6):327-337.
- [8] Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, et al. Early remodeling in an inducible animal model of retinal degeneration [J]. *Neuroscience*,2009,160(2):517-529.
- [9] Adamus G, Wang S, Kyger M, et al. Systemic immunotherapy delays photoreceptor cell loss and prevents vascular pathology in Royal College of Surgeons rats [J]. *Mol Vis*,2012,18(9):2323-2337.
- [10] Villegas-Perez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, et al. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium[J]. *J Comp Neurol*,1998,392(1):58-77.
- [11] Yuge K, Nambu H, Senzaki H, et al. N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in the mouse retina[J]. *In Vivo*,1996,10(5):483-488.
- [12] Chinta SJ, Andersen JK. Nitrosylation and nitration of mitochondrial complex I in Parkinson's disease[J]. *Free Radic Res*,2011,45(1):53-58.
- [13] Yoshizawa K, Yang J, Senzaki H, et al. Caspase-3 inhibitor rescues N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in Sprague-Dawley rats[J]. *Exp Eye Res*,2000,71(6):629-635.
- [14] Uehara N, Miki K, Tsukamoto R, et al. Nicotinamide blocks N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in rats through poly(ADP-ribose) polymerase activity and Jun N-terminal kinase/activator protein-1 pathway inhibition[J]. *Exp Eye Res*,2006,82(3):488-495.
- [15] Yang JN, Chen JM, Luo L, et al. Tetramethylpyrazine protected photoreceptor cells of rats by modulating nuclear translocation of NF-kappaB[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2005,26(7):887-892.

(收稿日期:2014-10-14)

(本文编辑:季魏红)