

·论著·

视神经吸断伤动物模型的制作

尹丹萍 孙志东 蔺海燕 陆士恒 喻谦

【摘要】 目的 探索一种简便易行并可用于研究影响视神经再生外加因素的新型视神经损伤模型。**方法** 实验研究。成年 SD 大鼠 20 只,行腹腔麻醉,经眶上缘切口分离至左眼球后极部,暴露视神经,用微波管在球后离视盘 2.0 mm 处完全吸除视神经纤维 0.5 mm,在吸断处注入 PBS 溶液,继而逐层缝合眶上缘切口。另选 5 只大鼠不造模,作为正常组。于损伤后 15 h,在相同测量条件下行造模眼和正常眼视网膜电图(ERG)和视觉诱发电位(VEP)检测。**结果** 通过视神经纵行冰冻切片观察,视神经纤维损伤量较为一致、准确;造模眼 ERG 和 VEP 图像仅为基线,均无正常眼 ERG 和 VEP 图像的波峰及波谷出现;视神经冰冻切片拍照证明,视神经鞘膜保留完整,轴突轴浆已中断,可见 2 个断端。**结论** 采用视神经吸断方法制作动物模型,造模眼视神经轴突已被吸断,无电传导功能,视神经损伤模型造模成功。

【关键词】 视神经; 模型,动物; 吸断伤

A new model for studying regeneration of the rats optic nerve after injury by suction

Yin Danping*, Sun Zhidong, Lin Haiyan, Lu Shiheng, Yu Qian. * The General Hospital of Jinan Military Command Infection Control Division, Jinan 250031, China

Corresponding author: Sun Zhidong, Email: SunzhiDong007@sohu.com

【Abstract】 Objective To explore a simple and feasible new model of optic nerve injury in order to study the apposition factor on the regeneration of the optic nerve. **Methods** Experimental study. The optic nerve was exposed in 25 adult SD rats under abdominal anesthesia by separating the posterior pole of the left eyeball with a supraorbital margin incision. A microwave tube was used to make a resection of the optic nerve 0.5 mm behind the eyeball and 2.0 mm away from the optic disc. A PBS solution was infused into the area where the optic nerve's hyalotome was suctioned off, the supraorbital margin incision was sutured step-by-step. Fifteen hours after the injury, electroretinograms (ERGs) and visual evoked potentials (VEPs) were measured in the retinas of the model and normal eyes. **Results** Observation of the optic nerve's longitudinally frozen section showed that there was consistent and precise damage. The ERGs and VEPs of the model eyes only had baseline activity without the peaks and troughs of the normal eyes. The image of the optic nerve's frozen section confirmed that the optic nerve sheath had been preserved. The axon's axoplasm had been suctioned off and the two broken ends of the axoplasm could be seen. **Conclusion** The model eye's optic nerve axon had been suctioned off and did not function on telefax. The model for injuring an animal's optic nerve by suction was successful.

【Key words】 Optic nerve; Model, animal; Suction injury

视神经损伤是常见的一类眼外伤,伤后预后不良,约有 40%~50%的患者失明。目前临床上尚缺乏有效的治疗手段。国外文献报道,成年哺乳动物视觉

系统受伤后往往会导致视功能缺损,很少或根本没有自然痊愈的机会^[1]。随着神经生物学和分子生物学的进展,视神经损伤和再生的研究成为神经科学研究的热点和难点^[2]。视神经吸断伤动物模型属于视神经损伤动物模型的一种,适合用于视神经修复与再生机制的研究。

1 对象与方法

1.1 对象

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2015.07.009

基金项目:全军十二五医学科研重点项目(BWS12J014)

作者单位:250031 济南军区总医院感染控制科(尹丹萍),医务部(孙志东);200433 上海,第二军医大学解剖学教研室(蔺海燕);200000 上海交通大学附属仁济医院眼科(陆士恒);610500 成都医学院第一附属医院眼科(喻谦)

通信作者:孙志东,Email:SunzhiDong007@sohu.com

实验研究。180~220 g 成年健康雄性 SD 大鼠 25 只,购自第二军医大学实验动物中心(医学动物实验号:20080326-5。本实验已通过第二军医大学伦理委员会论证)。光照时间为 6:00~18:00,室温饲养,随意进食饮水。5 只大鼠不造模,作为正常组;另外 20 只大鼠取左眼为造模眼,行视神经吸断伤手术,作为手术组。

1.2 手术器械和仪器

小直、弯钳各 2 把,中持针器 1 把,小刀柄 1 把,短无齿镊 2 把,直、弯眼科剪各 1 把,眼科镊 2 把,眼科撑开器 1 把,线剪 1 把,小组织剪 1 把,针盒(小刀片 2 片、中三角针 2 枚),台秤,1 ml 注射器 1 只,自制动物实验板。

脑立体定向仪由深圳瑞沃德生命科技有限公司生产。眼科手术显微镜由德国蔡司公司生产。YSW-2 型电生理系统由成都永开科技公司生产。CM1900 冷冻切片机由德国莱卡公司生产。Video Pro32 彩色荧光图像分析系统由澳大利亚 Leading Edge Pey Ltd 公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 视神经吸断伤动物模型的建立 每只大鼠均取左眼为造模眼,动物模型制备均在眼科手术显微镜下进行。用 2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉动物,脑立体定向仪固定动物的头部和四肢。将玻璃电极(微玻管)套在 5 ml 一次性注射器的针头上,再将安装了微玻管的针头安装于针管上,保持针管、针头和微玻管连接紧密。

经眶上缘切口分离至左眼球后极,暴露视神经,距眼球视盘 2 mm 处将玻璃电极(微玻管)刺穿视神经外膜,形成小的窗口,微玻管管头穿过此小窗口进入视神经鞘膜内,向上拉动针管上的活塞,感到有稍许阻力,用微玻管将一段长约 0.5 mm 的神经完全吸除,使视神经纤维完全断开,但视神经外膜和血管保持完整。在视神经吸断处注入 PBS 溶液 2 μ l。继而彻底止血,逐层缝合眶上缘切口。缝合完毕后,滴氯霉素滴眼液于损伤眼结膜囊内,以预防伤口感染。

造模眼眼球后极与吸断处之间的视神经为视神经近侧段,视神经吸断处与视交叉之间的视神经段为视神经远侧段。

视神经吸断伤动物模型制作过程如图 1-4 所示。

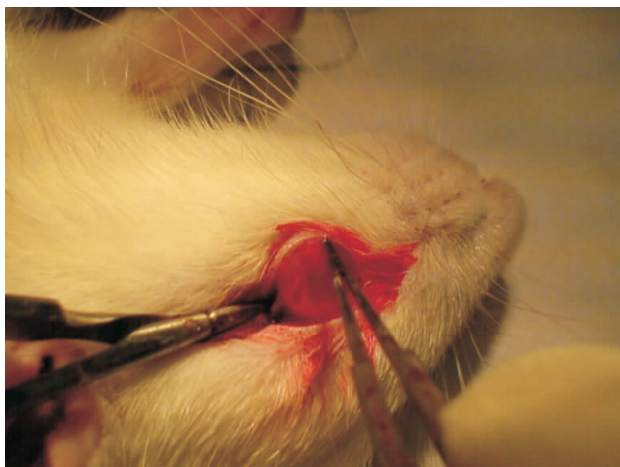


图 1 分离大鼠视神经周围组织



图 2 充分暴露大鼠视神经

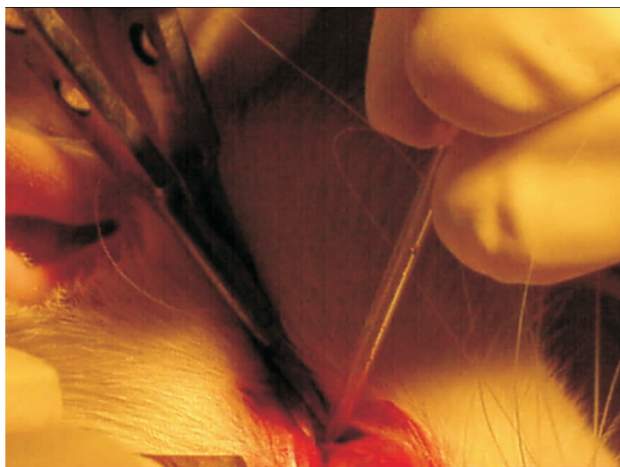


图 3 微玻管头已进入大鼠视神经鞘膜内

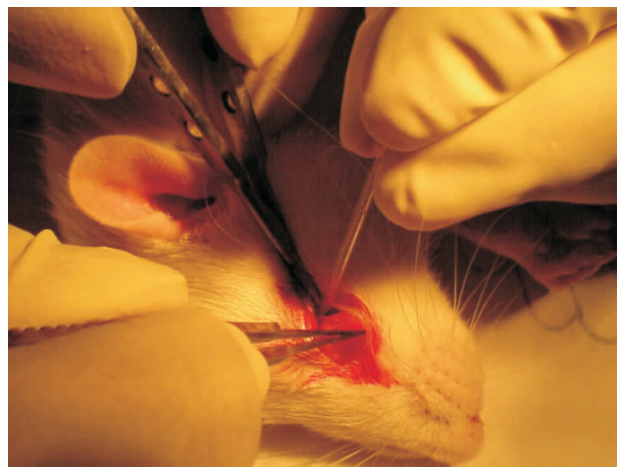


图 4 特制极细微波管吸断大鼠视神经轴浆

如图3所示,微波管头已进入视神经内,视神经鞘膜保留完整。微波管壁上可见吸出的视神经轴浆,视神经轴浆呈黏稠糊状,贴附在微波管的尖端和前部管壁上。管头拔出后,视神经鞘膜可自动收缩闭合。

1.3.2 电生理检测方法 于损伤后15 h时,在相同测量条件下行造模眼和正常眼ERG、VEP检测。大鼠视网膜电图(ERG)、视觉诱发电位(VEP)检测使用YSW-2型电生理系统。电极安装在暗室中,大鼠充分散瞳,暗适应30 min后,用特制支架进行固定。ERG采用不锈钢针电极,记录电极自颞侧角膜缘内插入大鼠板层角膜内约0.3 mm,参考电极插入大鼠前额正中皮下,地电极插入耳尖皮下。VEP参考电极及地电极放置与ERG相同,记录电极为不锈钢针,直接刺入大鼠视皮质区皮下。刺激参数为:采用全视野白色闪光刺激,刺激强度 $1.6 \text{ cd}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 。ERG记录a、b波潜伏期和振幅。VEP记录 P_{100} 波的潜伏期和振幅。

1.3.3 制作标本行冰冻切片 均于损伤后20 h时,行术眼玻璃体内注射霍乱毒素B亚单位(CTB)溶剂,顺行标记视神经轴突。于损伤后68 h时,将灌注固定后的大鼠置于手术显微镜下,分离眼球周围组织、眶部视神经,打开视神经管周围及部分颅底骨质分离至视交叉,取出视神经眶内段至颅内段全长并带部分巩膜壳(以确定方向),置于4%多聚甲醛4℃冰箱中固定2 h。将视神经移入30%蔗糖溶液(4℃)过夜脱水,第2天取出已沉底的组织块,专用包埋胶包埋,冰冻纵面连续切片(CM1900冷冻切片机,德国徕卡Microsystems Nussloch公司生产),片厚20 μm。收集所有切片,直接贴于涂有明胶的载玻片上,对中层3~4张切片在荧光显微镜下观察。切片避光保存,用UV滤光片(362或437 nm)激发CTB荧光。

2 结果

2.1 视神经吸断伤功能学鉴定

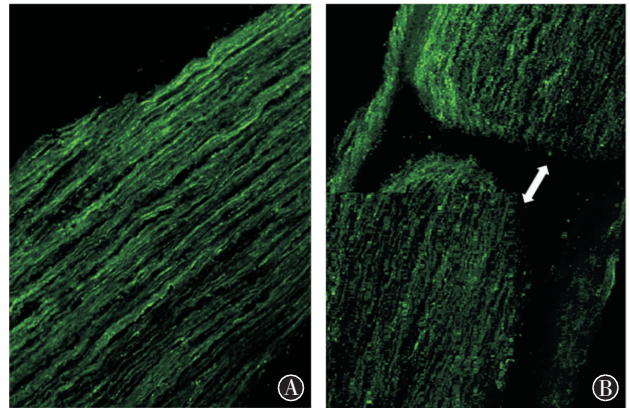
正常组大鼠双眼在10档不同强度光线刺激下,VEP的 P_{100} 波和ERG的a波、b波潜伏期和振幅均在正常范围内,波形正常。造模眼ERG和VEP图像仅为基线,均无与正常眼ERG、VEP图像类似的波峰及波谷出现,说明造模眼已无电传导功能,证明造模成功。

20只大鼠造模眼均造模成功,经ERG、VEP验证,视神经均无电传导功能。

2.2 视神经吸断伤形态学鉴定

实验中,20只大鼠造模眼均造模成功,冰冻切片

经激光器激发CTB荧光验证,视神经均已吸断,可见视神经吸出处轴浆空缺及两边断端(见图5B),证实造模眼视神经已吸断成功,2个断端彻底断开。



A, 正常眼,大鼠视神经纵切面,可见视神经鞘膜与视神经纤维连续、完整,视神经鞘膜与神经纤维间有一狭窄腔隙,视神经致密;B,造模眼,示视神经吸断后视神经纵切面图像,可见神经鞘膜仍然完整,视神经已断开,中间有明显腔隙,可见2个断端(图5中白色箭头所指位置)

图5 荧光显微镜下霍乱毒素B亚单位顺行标记视神经冰冻切片图像比较($\times 250$)

3 讨论

关于视神经的损伤机制和视神经功能恢复的研究^[3]已有相当成就,建立视神经损伤的动物模型是众学者科研过程中的重要步骤,在研究视神经系统修复方面起到了重要作用。视神经全长42~47 mm,分为球内段、眶内段、管内段和颅内段。视神经颅内段为视交叉至视神经管近端部分,由脑组织及脑膜保护,不易受伤;眶内段最长,长25~30 mm,呈“S”型,眼球顿挫伤时外力极易通过眼球软组织传递到眼球底部,使眼球壁与眼眶发生剧烈碰撞、挤压,极易损伤视神经眶内段,引起眶内段视神经水肿或断裂。因此,实验中视神经吸断处取眶内段,更接近于临床常见损伤状态,较贴近视神经真实损伤部位及环境,用此模型进行损伤机理及治疗药剂的研究更具普遍性和代表性。在视交叉以前损伤,又避免了术眼与未手术眼的相互影响。

相对于其他视神经损伤模型,视神经吸断伤模型简便易行。在解剖显微镜下用微波管在球后,即离视盘2.0 mm处完全吸除视神经纤维(损伤长度约0.5 mm),保证了视神经纤维损伤量的一致性和准确性,避开了外力钝挫致伤或钳夹致伤的模糊性;对视神经再生长度对比更显著、直观,有利于用统计数据客观评判各干预因素对视神经修复再生的干预效果。

视神经吸断伤模型较视神经切断伤(横断伤)动物模型具有优越性。视神经吸断伤模型损伤位置避开了供应视网膜的主要血管,保持了视网膜节细胞良好的血供,能更好地模拟临床真实视神经损伤状况^[4]。视神经吸断伤动物模型只将轴浆吸除,保留了神经外膜的完整性。视神经生长较为缓慢,吸断后的伤口可自动闭合,密闭的鞘膜环境能较好地容纳周围神经和外加的营养因子等,能较长时间存留移植的神经和注入的试剂等,以验证或对比不同的实验药剂对促进神经生长的远期效果,为进一步研究影响神经再生的外加因素提供了空间。目前研究表明:外伤性视神经损伤后积极进行受伤局部营养因子修复神经治疗是有效、可行的未来临床治疗策略^[1]。

VEP 检查是一种重要的检验视神经电传导功能的视觉电生理检查方法。VEP 中 P₁₀₀ 或 P₂ 波形相对较固定,其峰值和潜伏期的变化能对视力恢复的程度及手术效果进行评估,是一种比较敏感、先进的客观视功能检查方法。在以往建立视神经损伤动物模型的研究中已有应用^[5]。研究中采用 VEP 进行造模视神经传导功能检验,验证是否造模成功。视神经被吸断后神经电冲动传导通路中断,视网膜各层细胞电传导受阻,显著影响 ERG 检测图像,因此

ERG 可辅助 VEP 鉴定视路传导障碍。CTB 可经玻璃体注射后顺行标记视神经轴突,冰冻切片在荧光激发下可见绿色荧光标记的视神经轴突,由图像可见视神经轴浆空缺处和两边断端,为造模成功提供了形态学依据。研究中,经功能学和形态学双重验证,20 只大鼠造模眼全部造模成功,成功率 100%。

视神经吸断伤模型制作简单、设计合理、成功率高,较以往视神经损伤模型有一定优势,是研究视神经损伤与功能保护的理想模型。视神经吸断伤模型的研究可为进一步建立更理想的视神经损伤动物模型及进行相关前瞻性实验研究提供参考。

参考文献:

- [1] Ridderström M, Ohlsson M. Brilliant blue G treatment facilitates regeneration after optic nerve injury in the adult rat[J]. *Neuroreport*, 2014, 25(17): 1405-1410.
- [2] 林超,董艳,侯立军,等. 创伤性视神经损伤动物模型研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2012, 33(4): 429-431.
- [3] 刘如恩,雷德强,邓兴力,等. 视神经损伤后睫状神经营养因子的神经保护效应[J]. *中华神经外科杂志*, 2011, 27(2): 203-207.
- [4] 蔺海燕,许家军,刘芳,等. 大鼠视神经吸断伤后相关分子表达的变化[J]. *解剖学杂志*, 2006, 29(1): 30-34.
- [5] 于荣国,于金国,申战省,等. 外伤性视神经损伤动物模型的建立及 F-VEP 评价[J]. *眼科研究*, 2010, 28(1): 39-43.

(收稿日期:2014-11-15)

(本文编辑:毛文明)

·消息·

第一届全国干眼学术会议征文通知

第一届全国干眼学术会议(The 1st Chinese Dry Eye Congress)定于 2015 年 11 月 28-29 日在厦门召开。大会由亚洲干眼协会中国分会主办,厦门大学医学院眼科研究所,厦门大学附属厦门眼科中心和北京同仁眼科中心,北京市眼科研究所承办。本届大会主题“关注干眼,规范诊疗”。大会名誉主席谢立信院士,大会主席刘祖国教授和孙旭光教授诚邀各专业关注干眼诊治的同道参加。

本届大会将邀请国内外知名干眼专家做重要发言,会议主要设置专题讲座、病例讨论、热点问题争论等板块。会议将就干眼相关的临床治疗和基础研究问题进行热烈讨论。参会者授予国家级继续教育项目 I 类学分 3 分。

会议时间:2015 年 11 月 28-29 日

会议地点:厦门

大会语言:中文和英文

会议主要内容范围:干眼相关的临床及基础研究。

征文要求:投稿摘要 800 字左右,注明文题、作者单位、邮编、姓名,摘要以结构式方式,即分目的、方法、结果和结论 4 部分书写,论文要求未在国内外公开发行的刊物上发表。

投稿方式:请登录大会网站 www.ganyannet.com 进行在线投稿

投稿截止日期:2015 年 10 月 1 日

联系人:黄彩虹 梁凌毅 邮箱:ganyannet@hotmail.com 联系电话:0592-6019161

亚洲干眼协会中国分会