

# 恒河猴慢性高眼压模型视乳头和视神经纤维损伤模式

涂姝 李康 黄晶晶 葛坚

**【摘要】** 目的 观察恒河猴慢性高眼压模型与开角型青光眼患者的视乳头和视神经纤维损伤模式是否一致。方法 实验研究。采用眼科多波长激光仪光凝恒河猴(12眼)的小梁网以破坏小梁网功能使眼压升高,建立恒河猴慢性高眼压模型。术前和术后每周行眼压、眼底照相、视乳头参数和视神经纤维层厚度检测。结果 建模的12眼术前眼压为 $(16.08 \pm 2.02)$  mmHg,中央角膜厚度为 $(489.17 \pm 17.82)$   $\mu$ m,眼轴为 $(20.32 \pm 0.84)$  mm。12只用于诱导建模的恒河猴眼,经3~4次激光光凝,11眼被成功诱导。27周平均眼压为 $(30.32 \pm 14.59)$  mmHg,眼压波动幅度为 $(8.19 \pm 7.45)$  mmHg。光学相关断层扫描成像显示整个盘沿面积从 $(1.67 \pm 0.44)$  mm<sup>2</sup>减小到 $(0.43 \pm 0.34)$  mm<sup>2</sup>。平均视神经纤维从 $(97.92 \pm 6.79)$   $\mu$ m减少到 $(64.46 \pm 17.44)$   $\mu$ m。结论 恒河猴慢性高眼压性模型模拟了人类高血压/开角型青光眼发病机制和过程,在视杯对高血压的反应、视杯可逆性缩小、视神经纤维损伤现象等方面一致,是开展高血压性视乳头和视神经纤维层损伤研究理想的动物模型。

**【关键词】** 恒河猴; 动物模型; 高眼压; 视神经纤维

**Patterns of optic nerve head and retinal nerve fiber layer damage in the monkey chronic ocular hypertension model** Tu Shu, Li Kang, Huang Jingjing, Ge Jian. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China  
Corresponding author: Ge Jian, Email: gejian@mail.sysu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate if the chronic ocular hypertension (COHT) in a monkey model presents indistinguishable from humans in its retinal nerve fiber layer (RNFL) and optic nerve head (ONH) damage. **Methods** This was an experimental study. Models of COHT were induced in 12 eyes of rhesus monkeys were induced by using VISULAS Trion to disturb the aqueous humor outflow and cause the elevation of intraocular pressure. Some measurements have been taken such as intraocular pressure (IOP), fundus photography, the ONH parameters, and the RNFL thickness were taken every week before and after laser treatment. **Results** The main results were as follows: the IOP of the twelve eyes of the monkeys was  $16.08 \pm 2.02$  mmHg, the central corneal thickness was  $489.17 \pm 17.82$   $\mu$ m and the ocular axials length was  $20.32 \pm 0.84$  mm. Eleven eyes, underwent 3 to 4 laser photocoagulation treatments, were induced to the COHT model. The average IOP in 27 weeks was  $30.32 \pm 14.59$  mmHg, and the variation was  $8.19 \pm 7.45$  mmHg. Optical coherence tomography displayed revealed the a lost rim area that changed from  $1.67 \pm 0.44$  mm<sup>2</sup> to  $0.43 \pm 0.34$  mm<sup>2</sup> in the monkey COHT model. The RNFL was changed from  $97.92 \pm 6.79$   $\mu$ m to  $64.46 \pm 17.44$   $\mu$ m. **Conclusion** The monkey COHT model mimicks the natural ocular hypertension/open angle glaucoma procedure and shares similar glaucomatous damage patterns, such as the reactivity of ONH to ocular hypertension, and the presence of the optic cup and the damage phenomenon of RNFL. The monkey model is an ideal animal model for studying damage of the optic nerve head and RNFL.

**【Key words】** Rhesus monkey; Animal model; Ocular hypertension; Retinal nerve fiber layer

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2014.07.012

基金项目:国家自然科学基金(81170846,81371007)

作者单位:510060 广州,眼科学国家重点实验室 中山大学中山眼科中心

通信作者:葛坚,Email:gejian@mail.sysu.edu.cn

与人类同源的非人灵长类动物恒河猴,因眼球解剖结构和生理特性与人类高度一致,成为目前在青光眼研究中逐步被选用的实验动物。然而,尽管激光诱导建立的恒河猴慢性高眼压(chronic ocular hypertension, COHT)模型一定程度上模拟了开角型青光眼(open angle glaucoma, OAG)发病机制和过程,但鉴于此动物模型为外在激光干预小梁网破坏其房水排出功能而致使眼压(intraocular pressure, IOP)升高,故仅能被称为激光诱导恒河猴 COHT 模型,其与青光眼患者在小梁网功能<sup>[1]</sup>、视神经节细胞凋亡<sup>[2-3]</sup>、中枢神经系统损伤<sup>[4]</sup>、自身免疫<sup>[5-6]</sup>等多方面存在不同。本课题组前期已应用恒河猴开展滤过泡瘢痕化<sup>[7]</sup>和脉络膜新生血管<sup>[8]</sup>等研究,掌握了应用恒河猴开展多种眼病研究的经验和方法。此次实验通过建立恒河猴 COHT 模型,比较其与临床青光眼患者在整个疾病进展过程中视乳头和视神经纤维损伤方面表现是否一致,为进一步开展青光眼研究奠定成熟稳定的动物模型基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及麻醉方法

购自广东省蓝岛生物技术有限公司[生产许可证: SCXY(粤)2009-0010]的 4~6 周岁、体质量 4~8 kg 的雄性恒河猴 8 只,排除全身疾病。选取其中 12 眼作为诱导 COHT 动物模型眼 [实验动物许可证号: SYXK(YUE)2010-0058; 伦理号: SYXK(YUE)2012-072]。动物所有的实验操作均在全身麻醉下进行:肌肉注射氯胺酮(5 mg/kg, 盐酸氯胺酮注射液 50<sup>®</sup>, 中国福建古田药业有限公司)联合氯丙嗪(2.5 mg/kg, 盐酸氯丙嗪注射液 50<sup>®</sup>, 中国天津药业焦作有限公司)复合麻醉。

### 1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂 0.5%盐酸丙美卡因滴眼液局部麻醉(比利时 Alcon 公司);0.25%复方托吡卡胺滴眼液散大瞳孔(比利时 Alcon 公司);1%毛果芸香碱滴眼液缩小瞳孔(中山大学中山眼科中心);人工泪液滴眼液眼部润滑(中山大学中山眼科中心);妥布霉素/地塞米松眼膏抗炎预防感染(比利时 Alcon 公司)。

1.2.2 仪器 眼科多波长激光仪(VISULAS Trion, 德国蔡司公司)、回弹式眼压计(TV01, 芬兰)、眼底照相机(TRC 50DX, 日本 Topcon 公司)、OCT (STRATUS OCT 3000, 德国蔡司公司)、眼前段 OCT (Fourier OCT, 德国蔡司公司)、眼科 A 超测定仪(KN-1800, 无锡市康宁医疗电子设备开发公司)、电生理仪(RETIport, 德国罗兰公司)、激光专用房角镜

(美国 Volk 公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 恒河猴 COHT 模型建立 参照 Quigley 和 Hohman<sup>[9]</sup>的建模方法进行适当调整,全身深度麻醉及 1%毛果芸香碱滴眼液缩小瞳孔至针尖样后,将恒河猴头部固定于裂隙灯前,角膜表面放置激光专用房角镜,使用眼科多波长激光仪的绿光光凝全周小梁网,相邻光斑连续,以小梁网产生小气泡为标准,术后涂妥布霉素/地塞米松眼膏及复方托吡卡胺滴眼液减轻炎症反应。激光术后每周行相关眼部检查鉴定动物模型。如眼压未升高或眼压降至 21 mmHg 以下,则间隔 3 周后再次光凝小梁网直至稳定在高眼压水平,观察时间为 27 周。

1.3.2 恒河猴 COHT 模型相关眼部检查 眼压测量:术前和激光光凝术后每周测量眼压。具体操作:由一名实验员帮助动物取坐位,另一名固定的实验员,使用 Tono Vet 回弹式眼压计,于每周固定时间(10:00~16:00)测量眼压,避免表面麻醉药物,连续完成 6 次测量,眼压计自动取平均值。

中央角膜厚度测量:使用眼前段 OCT,采用软件中角膜模块程序。测量中需特别注意动物的眼睛位置保持正位及扫描线通过角膜中央。

眼底照相、OCT 等形态学检测:动物在散大瞳孔状态下,使用眼底照相仪每周采集 20°范围后极部眼底彩照及黑白眼底照片了解视乳头的改变及中央血管变化情况。使用 OCT 每周测量视乳头参数及各象限视神经纤维层厚度(retinal nerve fiber layer thickness, RNFLT)。多次测量,选用信号为 7 以上的图片。采集方式:以视乳头为中心,围绕视盘盘周(直径为 3.4 mm)环形扫描以检测视神经纤维层厚度;通过视乳头视杯中央垂直扫描以获取视乳头参数。

视功能检查:术前及实验终点行图形 ERG (pattern ERG, PERG) 及图像 VEP (pattern VEP, PVEP) 以评估视功能损伤。动物被放置距离屏幕 50 cm 处,连接电极,注意眼睛固视。参数为:刺激模式为 8 Hz 棋盘格翻转,刺激亮度为 75 cd/m<sup>2</sup>,对比度为 >97%,电阻 <5 kΩ。

### 1.4 统计学方法

实验研究。所有数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,恒河猴术前 IOP、中央角膜厚度和眼轴长度以及建模后每周 IOP、视乳头参数、RNFLT 等检测结果,均求平均数,表达方式为  $\bar{x} \pm s$ 。

## 2 结果

### 2.1 恒河猴 COHT 模型基本特征观察

首次激光光凝前健康恒河猴(12 眼)的眼压为  $(16.08 \pm 2.02)$  mmHg; 中央角膜厚度为  $(489.17 \pm 17.82)$   $\mu$ m; 眼轴为  $(20.32 \pm 0.84)$  mm。健康恒河猴眼压与人类眼压相似, 但中央角膜厚度较人类更薄、眼轴更短。所有用于建模的健康恒河猴(12 眼), 11 眼被成功诱导建立恒河猴 COHT 模型。整个建模过程中, 需 3~4 次反复激光光凝。光凝小梁网产生不可避免的并发症: 虹膜萎缩、虹膜后粘连、瞳孔散大或变形、色素沉着于晶状体。形态学上, RNFLT 显著变薄(见图 1A)。通过眼底照相和 OCT 可观察到视乳头的改变(见图 1B), 生理学上视杯对称完整, 高眼压性视乳头表现苍白和扩大视杯、变窄盘沿(实线)、切迹、中央血管扩张及偏鼻侧(虚线)和大量丢失的视神经纤维(星号)。视功能上, 检测到恒河猴 COHT 模型 P-VEP 及 P-ERG 振幅明显降低、潜伏期延长(见图 1C)。

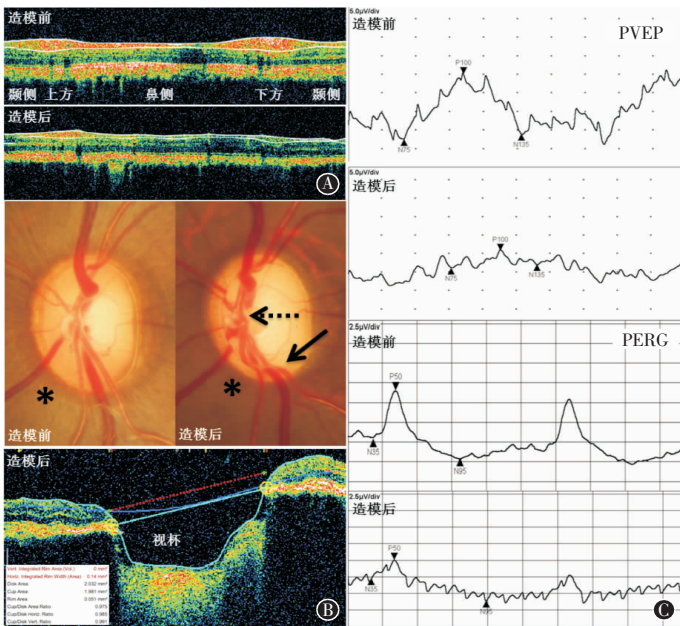


图 1 恒河猴慢性高血压模型鉴定图

## 2.2 恒河猴 COHT 模型眼压波动曲线

建模成功的恒河猴 COHT 模型一般在首次激光后第 3 周眼压开始升高, 以后每次光凝均较前一次有更大幅度眼压升高, 眼压与激光光凝呈依赖性, 27 周平均眼压为  $(30.32 \pm 14.59)$  mmHg, 波动范围为  $(8.19 \pm 7.45)$  mmHg。而未建模成功的恒河猴眼压始终维持在 25 mmHg 以下(见图 2)。

## 2.3 恒河猴 COHT 模型视乳头和视神经纤维损伤特点

2.3.1 慢性高眼压性视乳头损伤 视乳头高眼压性损伤形态改变多样性: 根据盘沿形态及宽度, 图 3 总结了各种高眼压性视乳头形态学改变, 除此之外, 我们还观察到中央视网膜动脉血管搏动。然而, 在大多数 OHT/OAG 患者上表现的视乳头出血在恒河猴 COHT 模型上始终没有观察到。

视乳头改变较 OCT 检测 RNFLT 改变更快反映

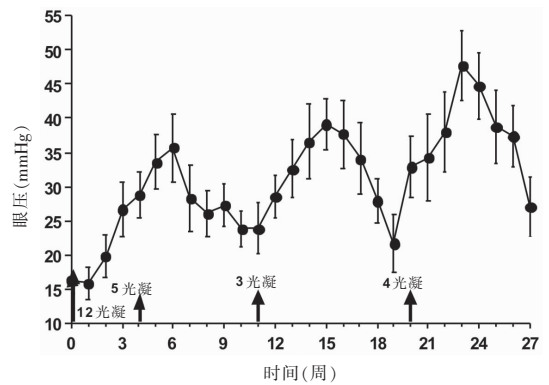


图 2 恒河猴慢性高血压模型眼压波动曲线图

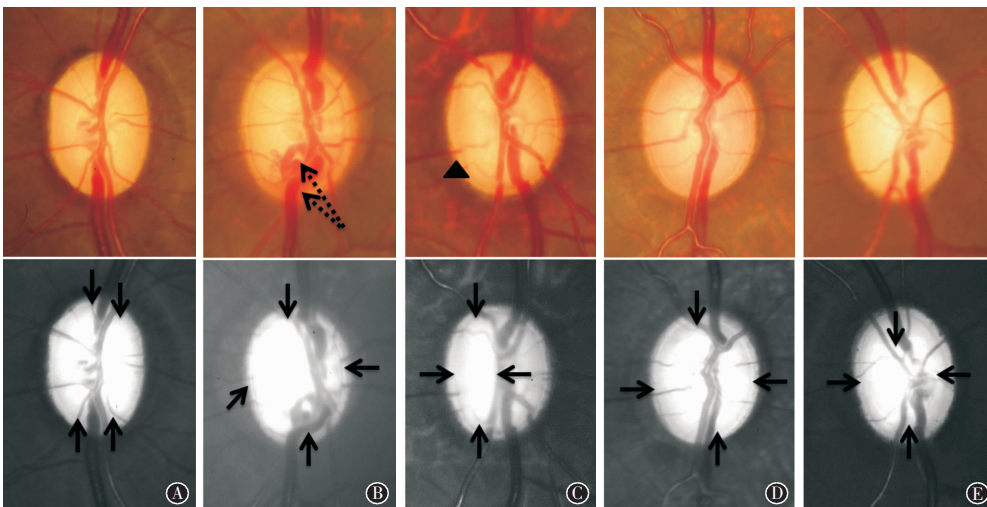


图 3 恒河猴慢性高血压模型高眼压性视乳头形态改变图



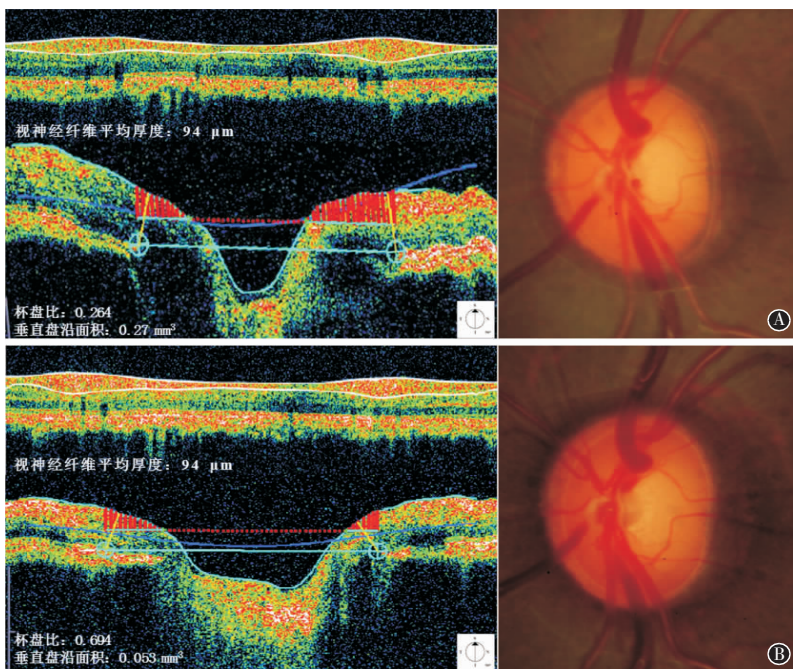
高眼压性损伤:图4显示,RNFLT在前19周始终保持94 μm,而OCT检测到杯盘比大小却从0.264扩大至0.694,盘沿面积相应的从0.27 mm<sup>2</sup>缩窄至0.053 mm<sup>2</sup>。眼底照相反映的杯盘比扩大及中央血管偏鼻侧亦证明了视乳头的高眼压性改变。

视杯大小可逆性回复:当眼压下降,尤其持续性降低至正常眼压时,杯盘比较前缩小。图5显示,1周内眼压从48 mmHg降为25 mmHg,杯盘比被检测到从0.514缩小为0.352,而盘沿面积也相应从0.150 mm<sup>2</sup>扩大为0.171 mm<sup>2</sup>。然而,亦观察到当视杯扩大至某种程度时,即使眼压持续性降低,视杯大小不能回复。

视乳头参数:健康恒河猴盘沿面积、视盘面积、视

杯面积、杯盘比和垂直杯盘比分别为(1.67±0.44)mm<sup>2</sup>, (2.25±0.32)mm<sup>2</sup>, (0.64±0.23)mm<sup>2</sup>, 0.29±0.12, 0.47±0.09。恒河猴COHT模型盘沿面积、视盘面积、视杯面积、杯盘比和垂直杯盘比分别为(0.43±0.34)mm<sup>2</sup>, (2.24±0.32)mm<sup>2</sup>, (1.81±0.58)mm<sup>2</sup>, 0.79±0.17, 0.85±0.12。

2.3.2 恒河猴COHT模型慢性高眼压性视神经纤维损伤 视神经纤维损伤现象:健康恒河猴RNFLT呈双峰曲线图,下方RNFLT为153 μm,上方为105 μm,鼻颞侧最薄,约为60~65 μm(见图6A)。恒河猴COHT模型视神经纤维损伤,首先从下方开始,损伤最为严重,厚度约为88 μm(见图6B),其次为上方,厚度减少至97 μm,鼻颞侧损伤不明显(见图6C)。



A,造模前;B,小梁网首次光凝术后第19周。当杯盘比扩大和盘沿面积变窄时(OCT红条纹),RNFLT无改变

图4 恒河猴慢性高眼压模型视乳头改变较OCT检测视网膜神经纤维层厚度改变更快,反映高眼压性损伤

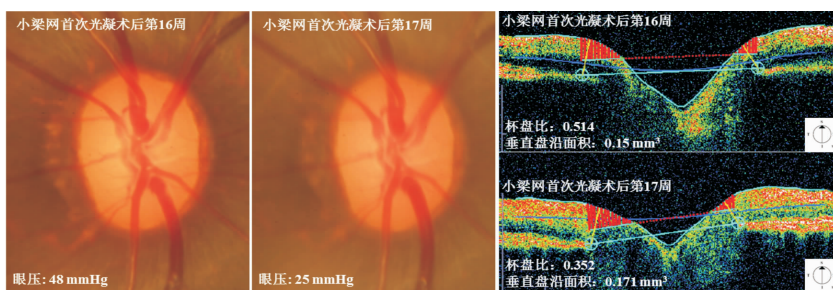
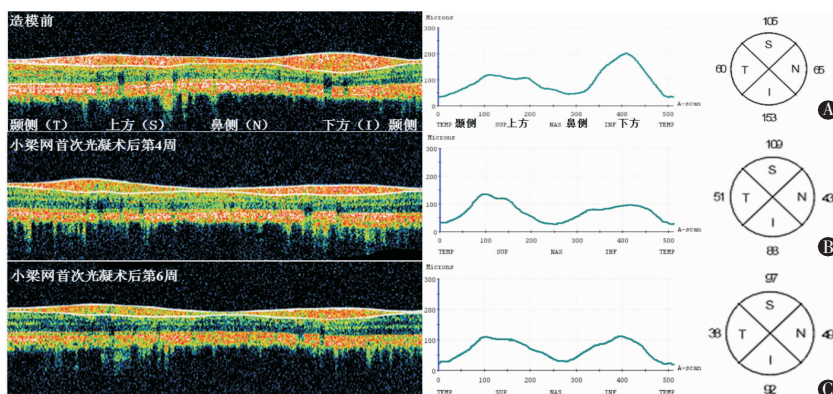


图5 恒河猴慢性高眼压模型眼压相关性视杯大小可逆性回复



A,造模前,视网膜神经纤维层厚度呈双峰曲线;B,神经纤维层损伤首先从下方开始;C,其次为上方,鼻颞侧损伤不明显

图6 恒河猴COHT模型视神经纤维损伤现象

视神经纤维厚度:健康恒河猴下方、上方、鼻侧、颞侧及平均 RNFLT 分别为 $(140.08 \pm 14.59) \mu\text{m}$ ,  $(116.67 \pm 8.58) \mu\text{m}$ ,  $(65.83 \pm 10.76) \mu\text{m}$ ,  $(69.25 \pm 12.34) \mu\text{m}$ ,  $(97.92 \pm 6.79) \mu\text{m}$ 。恒河猴 COHT 模型下方、上方、鼻侧、颞侧及平均 RNFLT 分别为  $(77.27 \pm 27.56) \mu\text{m}$ ,  $(80.55 \pm 27.95) \mu\text{m}$ ,  $(48.27 \pm 12.80) \mu\text{m}$ ,  $(52.64 \pm 16.13) \mu\text{m}$  和  $(64.46 \pm 17.44) \mu\text{m}$ 。

### 3 讨论

1974 年, Gaasterland 和 Kupfer<sup>[10]</sup>首先报道通过氩激光光凝全周小梁网建立恒河猴 COHT 模型, 成功率为 70%。随实验技术的不断提高, 我们亦成功并稳定的建立该动物模型。总结成功建模的一些因素如下: ①激光光凝参数。Quigley 和 Hohman<sup>[9]</sup>通过比较不同参数氩激光光凝小梁网建立此模型, 明确最为理想的建模参数为  $1.0 \text{ watt} \times 50 \mu\text{m} \times 0.5 \text{ s} \times 10^4$  次。本实验在此基础上, 根据恒河猴的个体差异, 进行了微调。并证实间隔时间低于 0.3 s, 即使更多激光次数也难以成功建模。②激光光凝位置。准确光凝小梁网, 以小气泡的产生为标准, 而仅仅致使小梁网产生灰白色斑是不充分的。③建模过程中, 从下方小梁网开始光凝, 逆时针或顺时针完成整个光凝过程, 有利于前房积血的下沉。④光凝术后的 1 周内, 前房出现轻至中度炎症反应, 予复方托吡卡胺滴眼液和妥布霉素地塞米松眼膏滴眼液减轻光凝后的炎症反应是重要的。

恒河猴 COHT 模型与 OHT/OAG 患者在眼底损伤等方面是否一致尚有争论。本研究证实恒河猴 COHT 模型与 OHT/OAG 患者在视杯对高眼压的反应<sup>[11]</sup>、眼压相关性视杯可逆性回复<sup>[11]</sup>和视神经纤维损伤次序<sup>[12]</sup>等方面一致。然而, 恒河猴 COHT 模型具有自身独特的眼压波动特点。恒河猴 COHT 模型的眼压升高与激光光凝直接相关, 每次光凝均较前一次有更大幅度的眼压升高。考虑到高眼压是青光眼发生进展的主要危险因素, 因此不同的眼压波动模式可能产生不同的视乳头和 RNFL 损伤。OHT/OAG 患者<sup>[12]</sup>盘沿面积自  $(1.65 \pm 0.35) \text{ mm}^2$  损伤为  $(0.68 \pm 0.53) \text{ mm}^2$ , RNFLT 自  $(114.81 \pm 4.65) \mu\text{m}$  损伤为  $(64.6 \pm 28.8) \mu\text{m}$ 。恒河猴整个盘沿面积丢失更多, 自  $(1.67 \pm 0.44) \text{ mm}^2$  损伤为  $(0.43 \pm 0.34) \text{ mm}^2$ , 原因可能为恒河猴视乳头疏松的组织所致, 虽然恒河猴盘沿面积丢失更多, 但其视神经纤维损伤程度却不及 OHT/OAG 患者视神经纤维损伤明显, 其自造模前的  $(97.92 \pm 6.79) \mu\text{m}$  变薄为  $(64.46 \pm 17.44) \mu\text{m}$ , 考虑原因可能为恒河猴 COHT 模型在视乳头血液供应<sup>[13]</sup>、视神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 分布和数量<sup>[14-15]</sup>以

及 RGC 对高眼压的反应性<sup>[2]</sup>等方面与 OHT/OAG 患者不同。

本研究报道恒河猴 COHT 模型, 模拟了人类 OHT/OAG 发病过程, 在视杯对高眼压的反应、眼压相关性视杯大小可逆性回复、视神经纤维损伤次序等方面一致, 是开展高眼压性 ONH 和 RNFL 损伤研究的理想动物模型。

### 参考文献:

- [1] Kawase Y, Okisaka S, Mizukawa A, et al. Histopathologic study on cyclocryotherapy of human and monkey eyes[J]. Nihon Ganka Gakkai Zasshi, 2004, 108:339-346.
- [2] Nork TM, Kim CB, Heatley GA, et al. Serial multifocal electroretinograms during long-term elevation and reduction of intraocular pressure in non-human primates[J]. Doc Ophthalmol, 2010, 120:273-289.
- [3] Nork TM, Ver HJ, Poulsen GL, et al. Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas[J]. Arch Ophthalmol, 2000, 118:235-245.
- [4] Lutjen-Drecoll E. Choroidal innervation in primate eyes[J]. Exp Eye Res, 2006, 82:357-361.
- [5] Girard MJ, Suh JK, Bottlang M, et al. Biomechanical changes in the sclera of monkey eyes exposed to chronic IOP elevations [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52:5656-5669.
- [6] Jonas JB, Hayreh SS, Yong T. Thickness of the lamina cribrosa and peripapillary sclera in Rhesus monkeys with nonglaucomatous or glaucomatous optic neuropathy[J]. Acta Ophthalmol, 2011, 89:e423-e427.
- [7] Ye H, Qian Y, Lin M, et al. Cationic nano-copolymers mediated IKKbeta targeting siRNA to modulate wound healing in a monkey model of glaucoma filtration surgery[J]. Mol Vis, 2010, 16:2502-2510.
- [8] Lai K, Jin C, Tu S, et al. Intravitreal injection of (99)Tc-MDP inhibits the development of laser-induced choroidal neovascularization in rhesus monkeys[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2014, 252:1049-1057.
- [9] Quigley HA, Hohman RM. Laser energy levels for trabecular meshwork damage in the primate eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983, 24:1305-1307.
- [10] Gaasterland D, Kupfer C. Experimental glaucoma in the rhesus monkey[J]. Invest Ophthalmol, 1974, 13:455-457.
- [11] 周文炳. 临床青光眼[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983:187-188, 309.
- [12] 刘杏, 黄时洲. 眼科临床光学相干断层成像学[M]. 广州: 广东科技出版社, 2006:311, 313, 340.
- [13] Hayreh SS. Anatomy and physiology of the optic nerve head[J]. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol, 1974, 78:240-254.
- [14] Kim CB, Tom BW, Spear PD. Effects of aging on the densities, numbers, and sizes of retinal ganglion cells in rhesus monkey [J]. Neurobiol Aging, 1996, 17:431-438.
- [15] Weber AJ, Chen H, Hubbard WC, et al. Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41:1370-1379.

(收稿日期: 2014-04-25)

(本文编辑: 季魏红, 毛文明)