

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.007

碘酸钠诱导小鼠视网膜色素上皮变性模型的研究*

茅佩瑶 茅希颖 陈 雪 袁松涛 刘庆淮[△]

(南京医科大学第一临床医学院 眼科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探讨股静脉注射不同剂量的碘酸钠后观察 C57BL/6J 小鼠视网膜色素上皮形态学及视网膜功能的变化。**方法:**选取 30 只 6-8 周龄 C57BL/6J 的雄性小鼠,随机分为正常对照组 6 只,实验 1 组(静脉注射碘酸钠 10 mg/kg)6 只,实验 2 组(静脉注射碘酸钠 20 mg/kg)6 只,实验 3 组(静脉注射碘酸钠 35 mg/kg)6 只,实验 4 组(静脉注射碘酸钠 50 mg/kg);正常对照组注射同等剂量的生理盐水。实验组分别经股静脉注射碘酸钠 10、20、35、50 mg/kg,于注射后 1 周行电生理检测,1 周、2 周行 OCT 检测。所有小鼠 2 周后摘除眼球制作冰冻切片以及 RPE 细胞平铺片进行 HE 染色、免疫荧光染色。**结果:**正常对照组小鼠视网膜各层排列整齐,各层之间分界清晰,外核层形态正常,RPE 层细胞排列紧密。注射后 1 周,通过 ERG 可发现碘酸钠 10 mg/kg 组小鼠视锥细胞功能已出现损伤,但 OCT 显示视网膜形态正常;而 20 mg/kg 以及 35 mg/kg 小鼠除了视锥细胞功能出现损伤,视杆细胞的功能均降至对照组 1/2;且视网膜外核层均出现异常高亮区,外层视网膜丧失分界清晰的结构。注射后 2 周,10 mg/kg 组小鼠通过 RPE 细胞平铺片即可发现 RPE 细胞已出现轻微损伤。而 20 mg/kg、35 mg/kg 组小鼠通过 OCT 可发现外核层与对照组相比均明显变薄,视网膜出现退行性改变;且通过 HE 染色和 RPE 细胞平铺片以及冰冻切片,我们可以发现 20 mg/kg、35 mg/kg 小鼠外核层出现波浪状改变,单层 RPE 细胞的连续性被破坏,呈现剂量依赖性。**结论:**碘酸钠 20 mg/kg 组经静脉注射后,可以很好的模拟年龄相关性黄斑变性的发病过程,视网膜出现明显的形态和功能变化,为视网膜色素变性提供一个较好的小鼠动物模型。

关键词:视网膜色素变性;碘酸钠;视网膜色素上皮细胞;光感受器细胞

中图分类号:R-33;R774.13 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)09-1636-06

Study on a Mouse Model of Retinitis Pigmentosa Induced by Sodium Iodate*

MAO Pei-yao, MAO Xi-ying, CHEN Xue, YUAN Song-tao, LIU Qing-huai[△]

(Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To characterize the efficiency of administrating different doses of sodium iodate by intravenous injection in imitating retinitis pigmentosa. **Methods:** Thirty 6-8 weeks old C57BL/6J mice was randomly divided into five groups: control group, 10 mg/kg NaIO₃ group, 20 mg/kg NaIO₃ group, 35 mg/kg NaIO₃ group, 50 mg/kg NaIO₃ group. Then different levels of sodium iodate were administered by intravenous injection into corresponding group of mice. Control group mice were given equivalent dose of PBS by intravenous injection. Functional changes of the retina were assessed at 1 week after injection by electroretinogram (ERG); morphological changes of the retina were assessed at 1,2 weeks following injection by optical coherence tomography (OCT). Eyeballs from all mice were removed 2 weeks after injection for frozen section and RPE flat mount, then HE is staining and immunostaining. **Results:** At 1 week after injection the amplitude of b wave from ectopic ERG in the 10 mg/kg group indicated a mild damage to function of cones, but morphologically the structure of ONL was normal; the amplitudes of b waves from no matter ectopic or scotopic ERG all underwent a drastic decline in the 20 mg/kg and 35 mg/kg group, which showing a damage both of cones but also of rods. Moreover, outer nuclear layer (ONL) of OCT results exerted higher reflection image than control, lacking distinctly stratified structure. At 2 weeks after injection, flat mounts of RPE from 10 mg/kg group exerted multinuclear cell which is a marker of RPE damage. In the 20 mg/kg and 35 mg/kg group, at 2 weeks after injection, the whole thickness of retina was decreased compared to control in a dose-dependent manner, which indicating a degeneration change to the retinas; moreover, H-E staining and immunostaining of RPE flat mount showed ONL in 20 mg/kg and 35 mg/kg groups were wave-like and continuity of monolayer RPE was interrupted, black round deposits and multinuclear RPE appearing. Immunostaining results of RPE specific marker RPE65 were declined both in 20 mg/kg and 35 mg/kg. **Conclusion:** The intravenous injection of sodium iodate can simulate the pathogenesis of retinitis pigmentosa in 20 mg/kg group, which can provide an animal model for retinitis pigmentosa.

Key words: Retinitis pigmentosa; Sodium iodate; RPE; Photoreceptor

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R774.13 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)09-1636-06

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81970821);国家重大科技专项(2017YFA0104101)

作者简介:茅佩瑶(1994-),女,硕士研究生,电话:15895903328, E-mail: m9p2y0@163.com

[△] 通讯作者:刘庆淮,男,博士生导师,主任医师,教授,研究方向:眼底病的诊断与治疗, E-mail: liuqh@njmu.edu.cn, 电话:025-83714511

(收稿日期:2020-02-20 接受日期:2020-03-15)

前言

视网膜光感受器细胞(photoreceptor, PR)主要分为两类:视锥细胞和视杆细胞,他们是维持视觉功能的重要神经元之一,视杆细胞主要负责周边视力,而视锥细胞主要负责中央视力^[1]。结构上与视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)紧密相连。主要可分为五个部分:外节、纤毛、内节、细胞核区以及突触区,其中细胞核区可对应视网膜结构中的外核层,外节的作用主要是捕捉光信号以及将光信号转变成电信号,因此外节结构在视觉功能的正常工作中起到重要的作用^[2]。而为了维持自身的内稳态,每天光感受器细胞会自我更新 10% 的外节组织,并被 RPE 细胞吞噬^[3]。

RPE 细胞是位于脉络膜毛细血管层以及光感受器细胞外节之间的单层立方状细胞,在维持神经视网膜的内稳态以及维持正常的视觉功能中起到独特的作用^[4]。RPE 细胞除了在对光感受器细胞脱落外节的吞噬作用外,还在多个方面维持光感受器细胞的正常功能,其中包括对光感受器细胞营养素的定向运输作用,光感受器细胞废产物的移除,以及视觉色素的运输和再生。另外,RPE 细胞还会分泌一系列对维持视网膜结构完整性所必要的生长因子^[5]。因此,由环境因素或基因突变所带来的 RPE 细胞损害会导致视网膜功能障碍,严重者会引起视网膜的退行性改变,视力下降,甚至失明。

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一类具有复杂分子病因的遗传性神经退行性眼部疾病,是视网膜退行性疾病最常见的类型之一。其发病率为 1/4000,全球范围内患病人数达 150 万^[6]。RP 的经典症状与主要病理过程相关,随着早期出现视杆细胞的丢失,晚期出现视锥细胞的丢失,其症状表现为初期双眼出现夜盲以及周边视力的逐渐丧失,随着病变的继续进展,出现中央视力的缺失甚至失去视力^[7,8]。主要眼部表现为光感受器细胞以及 RPE 细胞的异常,伴或不伴有黄斑区水肿^[9]。

由于本病病因复杂且 RPE 细胞以及光感受器细胞和 RPE 细胞的低再生性,目前临床上主要采取的治疗手段以及目前研究的热点主要以延缓疾病的进程,对一些症状的治疗以及维持患者视功能为主,其中主要有基因疗法^[9,10]视网膜移植^[11,12] RPE 细胞替代疗法^[13]、神经营养因子^[14]。临床上没有治愈的方法,因此找到一个较好的 RP 动物研究模型是近年来大家非常关注的问题,可能为临床治疗提供新思路。

目前研究 RP 的模型主要局限于基因敲除的应用^[15,16]。而此类动物模型存在着建模时间长,成本过高等问题,因此寻找一个简单经济、可重复性强的动物模型迫在眉睫。碘酸钠(NaIO_3 , Sodium Iodate)是一种稳定的强氧化剂,系统性的注射 NaIO_3 对 RPE 细胞有选择性破坏的作用,会导致 RPE 细胞的丢失^[17]。而 RPE 细胞在多个方面支持光感受器细胞发挥其正常功能。因此,RPE 细胞的破坏也会导致光感受器细胞的损害,以此模拟 RP 模型。

因此,本文拟采用碘酸钠静脉注射小鼠来达到对 RPE 细胞的破坏,并观察后期对于光感受器细胞的影响。并且本文将采用不同剂量的 NaIO_3 ,低 10 mg/kg、中 20 mg/kg、高 35 mg/kg 的碘酸钠对小鼠进行股静脉注射,并运用 ERG 对活体小鼠的视功能检测以及运用 OCT、免疫荧光染色等对小鼠视网膜的

形态进行检测,来探讨 NaIO_3 诱导小鼠 RP 模型。

1 材料与方法

1.1 材料

6-8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 30 只,体质量为 18-22g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。碘酸钠粉末(NaIO_3)购于索莱宝公司,水合氯醛,复方托吡卡胺滴眼液(参天制药株式会社),医用透明质酸钠凝胶。OCT 检测设备为 optvue, ERG 电生理检测设备为 LKC 公司。免疫荧光染色一抗 β -catenin 与 RPE65 均来自 abcam 公司,货号分别为 ab32572 和 ab231782。

1.2 方法

1.2.1 碘酸钠注射 适应性喂养 1 周后,将实验小鼠按正常对照组以及碘酸钠不同剂量分为五组,每组 6 只。造模前配置新鲜 1% 碘酸钠(溶于 PBS 中),通过股静脉分别单次注射 100 μL 碘酸钠溶液,浓度为 2 mg/mL、4 mg/mL、7 mg/mL 以及 10 mg/mL 的碘酸钠(分别对应 10 mg/kg、20 mg/kg、35 mg/kg 和 50 mg/kg 不同碘酸钠处理组),对照组注射同等体积 100 μL 的 PBS。

1.2.2 OCT 检测 取正常对照组和注射后 1 周以及 2 周的不同注射剂量的碘酸钠组小鼠,水合氯醛腹腔麻醉。麻醉后固定小鼠,复方托吡卡胺滴眼液 1:10 稀释后散瞳,医用透明质酸钠凝胶保护角膜,置于 90D 前置镜前,调整进光角度,进行 OCT 检测。

1.2.3 ERG 检测 取注射后 1 周的碘酸钠组小鼠,检测前暗适应 12h,水合氯醛腹腔麻醉。麻醉后固定小鼠,复方托吡卡胺滴眼液稀释 1:10 后散瞳,医用透明质酸钠凝胶保护角膜。按照位置摆放角膜电极等三种电极,进行 ERG 检测。

1.2.4 RPE 细胞平铺片制备 取正常对照组和注射后 2 周的碘酸钠组小鼠,麻醉后取眼球,去除角膜后 4%多聚甲醛固定过夜。第二天去除晶状体后,将视网膜翻转,巩膜侧朝上,用医用镊子镊住视神经乳头部分,沿视网膜边缘用另一把医用镊子将神经视网膜与 RPE 细胞层分开。去除神经视网膜后,将 RPE 层朝上,用医用剪刀按照 12 点、3 点、6 点、9 点方向做朝向视神经乳头的纵切口,制备完成待后续免疫荧光染色。

1.2.5 冰冻切片制取 取正常对照组和注射后 2 周的碘酸钠组小鼠,麻醉后取眼球,去除角膜后 4%多聚甲醛固定过夜。第二天去除晶状体后蔗糖溶液 10%、20%、30%梯度脱水,OCT 包埋后切片。冰冻切片按眼轴方向纵切片,厚度 8 μm 。切片室温放置 1 小时,免疫组化笔画圈后待后续免疫荧光染色以及 HE 染色。

1.2.6 免疫荧光染色 冰冻切片 PBS 洗片 3 遍,每遍 10 分钟。冰冻切片以及 RPE 细胞平铺片在封闭液(10% 胎牛血清 FBS, 2% 驴血清 donkey serum,以及 0.2% Triton X-100 溶解于 PBS)封闭 1 小时后一抗 4 度孵育过夜。第二天 PBS 洗 3 遍,每遍 10 分钟后二抗 1:500(荧光二抗, Thermo Fisher)以及 dapi 染料 1:1000 室温孵育 2 小时。后冰冻切片以及 RPE 细胞平铺片洗 3 遍,每遍 10 分钟。最后抗淬灭剂封片,拍照。

1.2.7 HE 染色 冰冻切片 PBS 洗片 3 遍,每遍 10 分钟。固定后苏木精染料染色,1%盐酸酒精分化,氨水反蓝后伊红染料染色,乙醇梯度脱水后中性树脂封片。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件包(IBM 公司,美国)统计学处理,数据以均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,统计方法包括 Student's t 检验(双侧)、单因素方差分析。实验均生物学重复 3 次, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ERG b 波振幅在碘酸钠处理组明显下降

为了检测不同剂量碘酸钠对于小鼠视网膜功能的影响,1

周后,10 mg/kg、20 mg/kg、35 mg/kg 的 a 波振幅在明暗适应的 ERG 中与对照组相比均没有差异。而 10 mg/kg 组的暗适应 b 波振幅与对照组相比也未见差异,20 mg/kg 与 35 mg/kg 组的暗适应 b 波振幅与对照组相比出现差异且呈剂量依赖性加重,20 mg/kg 组暗适应 b 波振幅下降至正常时的 1/2。10 mg/kg、20 mg/kg、35 mg/kg 的明适应 b 波振幅与对照组相比均有差异,且也呈剂量依赖性加重,35 mg/kg 组的明适应 b 波振幅下降至对照组 1/3。

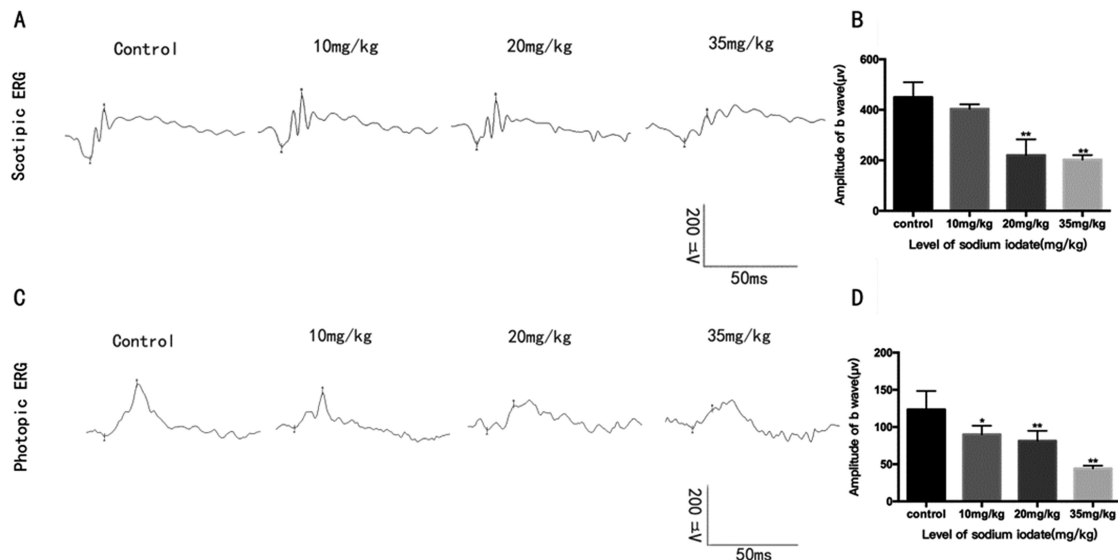


图 1 ERG b 波振幅在碘酸钠处理组明显下降

Fig.1 The amplitude of b wave in ERG results was decreased in sodium iodate treated groups

注:A 图为 1 周后的暗适应 ERG 结果图,B 图为 1 周后暗适应 ERG 的 b 波振幅统计图,C 图为 1 周后的明适应 ERG 结果图,D 图为 1 周后明适应 ERG 的 b 波振幅统计图。Scotopic ERG,暗适应 ERG;Photopic ERG,明适应 ERG;* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note: (A) ERG results in different doses sodium iodate treated groups at 1 week after injection. (B) Quantification of amplitude of b wave in sodium iodate treated groups and control group at 1 week after injection. (C) ERG results in different doses sodium iodate treated groups at 2 weeks after injection. (D) Quantification of amplitude of b wave in sodium iodate treated groups and control group at 2 weeks after injection.

2.2 碘酸钠处理组 20 mg/kg 以及 35 mg/kg 视网膜整层以及外核层显著变薄

为了检测不同时间点不同剂量碘酸钠对于小鼠视网膜形态的影响,注射碘酸钠 1 周后,正常对照组小鼠视网膜 OCT 分层清晰,各层结构排列整齐。10 mg/kg 组小鼠 OCT 结果未见明显异常,RPE 层结构完整。20 mg/kg 组小鼠外层视网膜以及玻璃体腔出现异常高反射浑浊物,视网膜丧失分层清晰的结构;35 mg/kg 组小鼠外核层同样出现高反射区,且整层视网膜厚度变薄,且有两只小鼠出现黄斑区水肿。黄斑区水肿被报道是 RP 的并发症之一^[18]。注射碘酸钠 2 周后,10 mg/kg 组小鼠 OCT 结果与对照组相比没有明显变化;20 mg/kg 组小鼠外核层的高反射消失,但全层视网膜以及外核层变薄且 RPE 层出现数个高反射突起;35 mg/kg 小鼠视网膜全层以及外核层视网膜变薄,呈现剂量依赖性。文献中有报道,RP 中外核层的厚度变薄^[19]。通过查阅文献,我们发现在临床患者的 OCT 结果中光感受器细胞的外核层也会出现异常高反射区,这种结果可见于光感受器细胞发生急性缺血性状态时,例如中枢旁急性中黄斑病变 PAMM^[20]。由此可以推断,本实验中碘酸钠处理 1 周后的小鼠与临床上的 PAMM 相似,外核层的急性病理改变可导致在

SD-OCT 结果中的外核层高反射改变,即碘酸钠处理小鼠 SD-OCT 结果中外核层反射变强与光感受器细胞的急性死亡反应相关。而这个外核层高反射改变也可在视网膜色素上皮变性的基因编辑动物模型 *arrestin-/-* 小鼠以及 *rd10* 小鼠的 OCT 结果中看到^[21]。从碘酸钠处理 2 周后的结果,光感受器细胞外核层明显变薄且恢复正常发射,我们也可以发现 1 周后 OCT 结果是一过性的急性病变。

2.3 碘酸钠处理组 20 mg/kg 以及 35 mg/kg 光感受器细胞结构紊乱,RPE 细胞丧失连续性

为了更清晰地观察不同剂量碘酸钠对于小鼠视网膜整体形态的影响,我们对注射不同剂量碘酸钠的小鼠进行了 HE 染色。我们发现 HE 结果与 OCT 结果一致,图 A 对照组小鼠各层细胞排列整齐,RPE 层结构完好。注射不同剂量碘酸钠 2 周后,10 mg/kg 组小鼠与对照组相比没有明显差异,RPE 层结构完整。20 mg/kg 组小鼠外核层呈波浪状改变,RPE 层正常单层连续结构消失,出现黑色类圆形沉积物,但此时内核层与外核层的分界尚清晰。35 mg/kg 组小鼠外节层消失,外核层与消失正常结构的 RPE 层相连,黑色类圆形沉积物依旧存在,外丛状层结构消失,内核层与外核层分界不清晰。

2.4 碘酸钠处理组 RPE 细胞损伤

为了观察不同剂量碘酸钠对于 RPE 层细胞的形态以及细胞间的紧密连接的影响,我们对 RPE 细胞平铺片进行了 β -catenin 的免疫荧光染色。 β -catenin 是细胞间紧密连接的组成成分之一。如图 A 所示,正常 RPE 细胞成正六边形且呈双核结构。从图 B 可以看到,10 mg/kg 小鼠的 RPE 层与对照组相比整

体差异不明显,但出现数个多核细胞,如图箭头所示,表明 RPE 细胞已经受到轻微损伤。图 C 为 20 mg/kg 处理组小鼠,可见 RPE 细胞进一步增大,且单核细胞明显增多,但此时尚有细胞可维持六边形形态。图 D 为 35 mg/kg 处理组小鼠,可见细胞完全丧失六边形结构且细胞面积进一步增大。因此,RPE 细胞破坏呈现剂量依赖性。

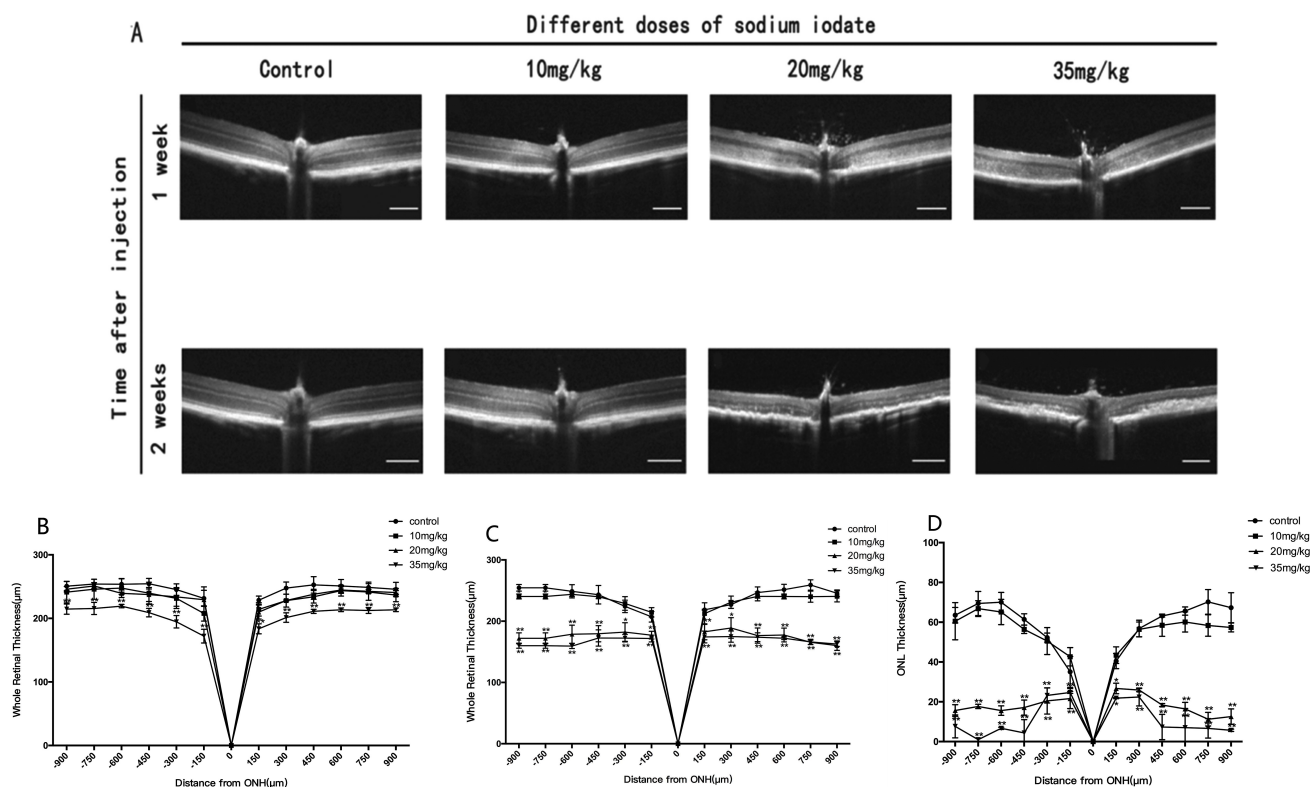


图 2 碘酸钠处理组 20 mg/kg 以及 35 mg/kg 视网膜整层以及外核层显著变薄

Fig. 2 The whole retinal thickness and ONL thickness were reduced both in 20 mg/kg group and 35 mg/kg group

注: A 图为碘酸钠处理 1 周以及 2 周的不同剂量 OCT 结果图, B 图为处理 1 周的不同碘酸钠剂量视网膜全层厚度统计图, C 图为处理 2 周的不同碘酸钠剂量视网膜全层厚度统计图, D 图为处理 2 周的不同碘酸钠剂量视网膜外核层厚度统计图。OCT: Optical Coherence Tomography, 光学相关断层扫描技术; ONH: Optic Nerve head, 视神经乳突; ONL: Outer Nuclear Layer, 外核层; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, scale bar: 250 μm 。

Note: (A) OCT results at 1 week and 2 weeks after injection in different doses of sodium iodate. (B) Quantification of whole retinal thickness at 1 week after injection in different doses of sodium iodate. (C) Quantification of whole retinal thickness at 2 weeks after injection in different doses of sodium iodate. (D) Quantification of outer nuclear layer thickness at 2 weeks after injection in different doses of sodium iodate* $P<0.05$, ** $P<0.01$, scale bar: 250 μm .

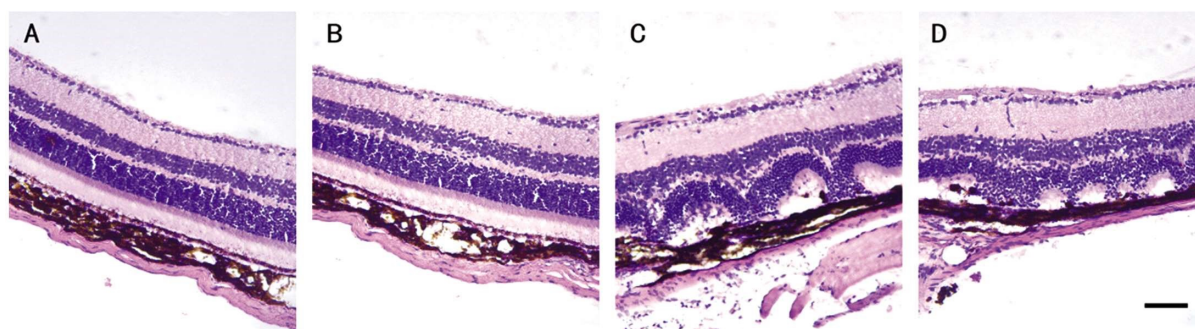


图 3 不同剂量碘酸钠分别处理 2 周后的 HE 染色结果图

Fig. 3 HE staining of frozen sections from sodium iodate treated groups and control group

注: A 图为正常对照组, B 图为碘酸钠 10 mg/kg, C 图为 20 mg/kg 碘酸钠组, D 图为 35 mg/kg 碘酸钠组。Scale bar: 20 μm

Note: (A) normal control group (B) 10 mg/kg sodium iodate treated group (C) 20 mg/kg sodium iodate treated group

(D) 35 mg/kg sodium iodate treated group, Scale bar: 20 μm .

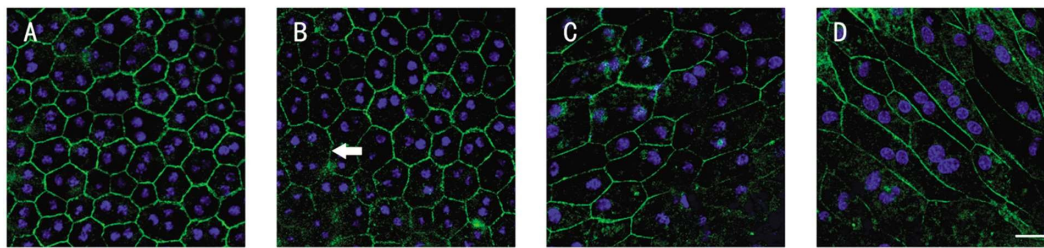


图 4 不同剂量碘酸钠分别处理两周后 RPE 细胞平铺片 β -catenin 免疫荧光染色结果图

Fig. 4 Immunostaining of β -catenin in RPE flat mount from sodium iodate treated groups and control group

注: A 图为正常对照组, B 图为碘酸钠 10 mg/kg, C 图为 20 mg/kg 碘酸钠组, D 图为 35 mg/kg 碘酸钠组。

(图中绿色荧光为 β -catenin; Scale bar: 20 μ m)

Note: (A) normal control group (B) 10 mg/kg sodium iodate treated group (C) 20 mg/kg sodium iodate treated group

(D) 35 mg/kg sodium iodate treated group, Scale bar: 20 μ m.

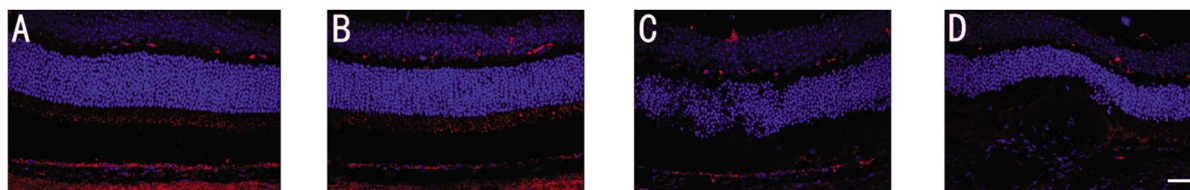


图 5 不同剂量碘酸钠处理 2 周后视网膜冰冻切片 RPE65 免疫荧光染色结果图

Fig. 5 Immunostaining of RPE65 in frozen sections from sodium iodate treated groups and control group

注: A 图为正常对照组, B 图为碘酸钠 10 mg/kg, C 图为 20 mg/kg 碘酸钠组, D 图为 35 mg/kg 碘酸钠组。

(图中红色荧光为 RPE65; Scale bar: 20 μ m)

Note: (A) normal control group (B) 10 mg/kg sodium iodate treated group (C) 20 mg/kg sodium iodate treated group

(D) 35 mg/kg sodium iodate treated group, Scale bar: 20 μ m.

2.5 RPE 细胞特异性标志表达下调且呈现剂量依赖性

RPE65 基因特异性地在 RPE 细胞中表达且编码一种异构水化酶, 这种酶能催化在 RPE 细胞中的全 - 反视黄醛异构化为 11- 顺视黄醛, 促进 11- 顺视黄醛的再生, 维持类视色素的循环, 在视觉发挥正常功能中起到重要的作用^[22]。而 11- 顺视黄醛有感光的作用, 在视觉转导中起到非常重要的作用, 他与视蛋白结合起始视觉产生的第一步。因此, 若缺乏 RPE65, 则 11- 顺视黄醛无法再生, 单视蛋白无法感光, 光感受器细胞发生退行性改变。因此 RPE65 免疫荧光染色不仅能反应 RPE 细胞的功能, 也能在一定程度反应光感受器细胞的状态^[23-25]。

为了进一步观察不同剂量碘酸钠对于 RPE 细胞的功能变化, 对视网膜冰冻切片进行了 RPE 细胞特异性蛋白 RPE65 的免疫荧光染色。结果如图所示, 图 A 是正常组小鼠, 可见视网膜外核层排列整齐, RPE65 包绕在 RPE 细胞的核外, 图 B 为 10 mg/kg 组, 可见与对照组相比, RPE65 蛋白的表达情况差异不大, 且与 HE 染色一致, 外核层细胞排列整齐。图 C 为 20 mg/kg 组小鼠, 可见 RPE65 蛋白表达连续性中断, 外核层光感受器细胞核呈现波浪状改变, 外节消失。图 D 为 35 mg/kg 组小鼠, 可见 RPE65 蛋白表达消失。因此, 从免疫荧光染色的结果来看, RPE65 的表达呈现剂量依赖性, 说明 RPE 细胞与光感受器细胞损伤也随着剂量的加大损伤越严重。

3 讨论

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 属于视网膜退行性疾病, 最常见的初始症状是光感受器细胞中的视杆细胞依

赖性的外周视力以及暗视力的丢失, 视锥细胞的功能保持完好直至疾病进展到后期有所减退。尽管大部分病例都是非综合性的, 仍有 20-30% 的 RP 患者会有非眼部的其他症状^[26]。且本病在儿童时期就可发病, 表现为在黑暗中视物困难^[27], 且随着年龄的增长病情逐渐加重。而目前此病的治疗手段有限, 临床上尚未找到有效的治愈方法^[28]。因此找到一个高效且可重复性高的动物模型是近年来研究的热点。

从传统观点上看来, 静脉注射无机氧化剂碘酸钠会介导氧自由基的生成, 从而会对 RPE 细胞产生高度特异性的损害^[29]。RPE 细胞是血 - 视网膜屏障的重要组成部分之一, 发挥着吞噬脱落的光感受器细胞外节以及从脉络膜毛细血管向光感受器细胞运输营养成分以供光感受器细胞合成新的外节的作用。因此, RPE 细胞的丢失对光感受器细胞的存活以及发挥正常功能可能会存在影响。但通过查阅文献, 我们发现近年来有研究报道发现碘酸钠会导致大鼠中内层视网膜神经元直接且剧烈的损伤^[30], 还有文献报道碘酸钠处理会对光感受器细胞有直接的损害作用^[31, 32], 而视网膜色素变性最常见的症状就是光感受器细胞的丢失。

在本文中, 我们发现, 低剂量组 10 mg/kg 在碘酸钠仅处理 1 周后出现了明适应 ERG 的 b 波振幅下降, 而在 OCT 结果看来外层视网膜结构未有明显变化。且 10 mg/kg 碘酸钠处理 2 周后的 HE 染色显示外核层排列整齐, RPE 层细胞完整连续, 仅在视网膜 RPE 细胞平铺片中发现了数个多核细胞的出现。虽然多核细胞是 RPE 细胞出现损伤的标志^[33], 但是数个多核细胞的出现并不足以对光感受器细胞的功能产生影响, 因此本文

的发现支持了碘酸钠处理会对光感受器细胞有直接损害的理论。但从结果来看,由于 10 mg/kg 给药量对于视网膜损伤过轻,可能需要重复多次注射,造模时间过长,不利于反复多次实验。

另外,在本研究中,我们发现 50 mg/kg 超高剂量的碘酸钠除了会导致小鼠视网膜迅速的炎症反应,还会有致死可能性,对研究过程不利(本实验中 50 mg/kg 组 4/6 的致死可能性)。

高剂量 35 mg/kg 组光感受器细胞以及 RPE 细胞损伤过于严重,2 周后的 OCT 结果显示 35 mg/kg 的外核层即光感受器细胞核层厚度在小鼠中外围几乎下降为零,Birch 等学者在他们的研究中也观察到了类似的现象^[33]。视网膜 RPE 细胞平铺片中几乎观察不到正常的 RPE 细胞,且对 RPE 细胞特异性表达的标志 RPE65 的免疫荧光染色可以发现高剂量组 RPE65 表达几乎完全消失。因此我们认为 35 mg/kg 的给药量对视网膜的损伤过于严重,可能存在不可逆的情况,而这种情况对研究 RP 的治疗效果不利。

而 20 mg/kg 碘酸钠处理组在注射后 1 周首先出现明暗适应 ERG 的 b 波振幅均下降,但暗适应 ERG 的 b 波振幅几乎下降到正常对照组的 1/2,表明视杆细胞的功能损伤程度大于视锥细胞,而这与视网膜色素变性首先受损的细胞类型是视杆细胞相似。1 周后 OCT 结果显示视网膜以及玻璃体腔出现异常高反射浑浊物,视网膜结构分层不清晰,这些高反射浑浊物可能是被激活的胶质细胞,代表此时视网膜处于急性炎症反应阶段。2 周的 OCT 结果显示,视网膜 ONL 显示,视网膜恢复正常反射,炎症吸收,但是整体视网膜尤其视网膜外核层厚度出现明显下降,光感受器细胞大量丢失,视网膜呈现退行性改变。Wang 等学者在他们的研究中也发现碘酸钠 20 mg/kg 处理 3 天以及 8 天后出现了同样的现象^[34]。两周后固定染色发现 RPE 细胞平铺片中 RPE 细胞出现破坏,但仍有部分正常的细胞,RPE65 表达量降低。因此,我们认为用做研究的合适剂量为 20 mg/kg。

本研究采用碘酸钠进行小鼠股静脉注射,通过对注射后的小鼠 OCT、ERG 等功能学观察,视网膜组织切片的 HE 染色、免疫荧光染色,模拟视网膜色素变性的发病过程,选取 20 mg/kg 碘酸钠为进一步研究视网膜色素变性的发病机制以及治疗方法提供合适的动物模型。但是,由于视网膜色素变性平均发病年龄为 35.1,最高发病年龄可达 65 岁^[35],结合相关文献,我们发现碘酸钠造模运用的基本都是 6-8 周龄的年轻小鼠^[36],碘酸钠对视网膜的损害作用和年龄是否相关,关于此更深入的机制我们将在今后的研究中进行探索。

参考文献(References)

- [1] Kevany B M, K Palczewski. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors[J]. Physiology (Bethesda), 2010, 25(1): 8-15
- [2] Molday R S, O L Moritz. Photoreceptors at a glance [J]. J Cell Sci, 2015, 128(22): 4039-45
- [3] Petit L, Ma S, Cipi J, et al. Aerobic Glycolysis Is Essential for Normal Rod Function and Controls Secondary Cone Death in Retinitis Pigmentosa[J]. Cell Rep, 2018, 83(9): 2629-2642
- [4] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function [J]. Physiol Rev, 2005, 85(3): 845-81
- [5] Sparrow J R, Hicks D, Hamel C P. The retinal pigment epithelium in health and disease[J]. Curr Mol Med, 2010, 10(9): 802-823
- [6] Pagon R A. Retinitis pigmentosa[J]. Surv Ophthalmol, 1988, 33(3): 137-77
- [7] Hartong D T, Berson E L, Dryja T P. Retinitis pigmentosa [J]. Lancet, 2006, 368(9549): 1795-809
- [8] Daiger S P, Sullivan L S, Bowne S J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa[J]. Clin Genet, 2013, 84(2): 132-41
- [9] Strong S, Liew G, Michaelides M. Retinitis pigmentosa-associated cystoid macular oedema: pathogenesis and avenues of intervention[J]. Br J Ophthalmol, 2017, 101(1): 31-37
- [10] Wang X, Yu C, Tzekov R T, et al. The effect of human gene therapy for RPE65-associated Leber's congenital amaurosis on visual function: a systematic review and meta-analysis[J]. Orphanet J Rare Dis, 2020, 15(1): 49
- [11] Maguire A M, Simonelli F, Pierce E A, et al. Safety and efficacy of genetransfer for Leber's congenital amaurosis[J]. N Engl J Med, 2008, 358(21): 2240-2248
- [12] Mills J O, Jalil A, Stanga P E. Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present[J]. Eye (Lond), 2017, 31(10): 1383-1398
- [13] da Cruz L, Dorn J D, Humayun M S, et al. Five-Year Safety and Performance Results from the Argus II Retinal Prosthesis System Clinical Trial[J]. Ophthalmology, 2016, 123(10): 2248-54
- [14] Lund R D, Wang S, Klimanskaya I, et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats [J]. Cloning Stem Cells, 2006, 8(3): 189-99
- [15] Birch D G, Weleber R G, Duncan J L, et al. Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa[J]. Am J Ophthalmol, 2013, 156(2): 283-292.e1
- [16] Rösch S, Johnen S, Müller F, et al. Correlations between ERG, OCT, and Anatomical Findings in the rd10 Mouse[J]. J Ophthalmol, 2014, 2014: 874751
- [17] Ross J W, Fernandez de Castro J P, Zhao J, et al. Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(1): 501-7
- [18] Franco L M, Zulliger R, Wolf-Schnurrbusch U E, et al. Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low-dose sodium iodate[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(8): 4004-10
- [19] Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, et al. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms[J]. Curr Genomics, 2011, 12(4): 238-49
- [20] D Sarraf, E Rahimy, A A Fawzi, et al. Paracentral acute middle maculopathy[J]. JAMA Ophthalmology, 2013, 131(10): 1275-1287
- [21] E. S. Levine, A. Zam, P. Zhang, et al. Rapid light-induced activation of retinal microglia in mice lacking Arrestin-1 [J]. Vision Research, 2014, 102: 71-79
- [22] T Hasegawa, H O Ikeda, N. Nakano, et al. Changes in morphology and visual function over time in mouse models of retinal degeneration: an SD-OCT, histology, and electroretinography study [J]. Japanese Journal of Ophthalmology, 2016, 60(2): 111-125

- Implications for Downstream Process Development [J]. *Biotechnol. Bioeng*, 2010, 105: 306-316
- [7] Aboulaich N, Chung W, Thompson J, et al. A Novel Approach to Monitor Clearance of Host Cell Proteins Associated with Monoclonal Antibodies[J]. *Biotechnol Prog*, 2014, 30: 1114-1124
- [8] Vanderlaan M, Zhu-Shimoni J, Lin S, et al. Experience with Host Cell Protein Impurities in Biopharmaceuticals[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 34: 828-837
- [9] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 41-43
- [10] Food and Drug Administration. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use [J]. *J. Immunother*, 1997, 20(3): 214-23
- [11] European Medicines Agency. Guideline on development, production, characterization, and specification for mAb and related products[Z]. EMA/CHMP/BWP/532517/2008, 2016-7-21, 1-13
- [12] ICH: Guidance for Industry Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biotechnology Products[J]. *Fed Regist*, 1999, 64(159): 44928-44935
- [13] Shukla A, Hinckley P. Host Cell Protein Clearance During Protein A Chromatography: Development of an Improved Column Wash Step [J]. *Biotechnol. Prog*, 2008, 24: 1115-1121
- [14] Gilgunn S, Bones J. Challenges to industrial mAb bioprocessing removal of host cell proteins in CHO cell bioprocesses [J]. *Curr Opin Chem Eng*, 2018, 22: 98-106
- [15] Mead E, Chiverton L, Smales C, et al. Identification of the limitations on recombinant gene expression in CHO cell lines with varying luciferase production rates[J]. *Biotechnol. Bioeng*, 2009, 102: 1593-1602
- [16] Grzeskowiak J, Tscheliessnig A, Toh P, et al. 2-D DIGE to expedite downstream process development for human monoclonal antibody purification[J]. *Protein Expression Purif*, 2009, 66: 58-65
- [17] Yu M, Hu Z, Pacis E, et al. Understanding the Intracellular Effect of Enhanced Nutrient Feeding Toward High Titer Antibody Production Process[J]. *Biotechnol. Bioeng*, 2011, 108: 1078-1088
- [18] Khattak S, Xing Z, Kenty B, et al. Feed Development for Fed-Batch CHO Production Process by Semisteady State Analysis[J]. *Biotechnol. Prog*, 2010, 26: 797-804
- [19] Marks D. Equipment design considerations for large scale cell culture [J]. *Cytotechnol*, 2003, 42: 21-33
- [20] Hippach M, Schwartz I, Pei J, et al. Fluctuations in dissolved oxygen concentration during a CHO cell culture process affects monoclonal antibody productivity and the sulfhydryl-drug conjugation process[J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34: 1427-1437
- [21] Kirdar A, Conner J, Baclaski J, et al. Application of Multivariate Analysis toward Biotech Processes: Case Study of a Cell-Culture Unit Operation[J]. *Biotechnol Prog*, 2007, 23: 61-67
- [22] Xing Z, Kenty B, Li Z, et al. Scale-Up Analysis for a CHO Cell Culture Process in Large-Scale Bioreactors[J]. *Biotechnol. Bioeng*, 2009, 103: 733-746
- [23] Schmidt F. Optimization and scale up of industrial fermentation processes[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68: 425-435

(上接第 1641 页)

- [23] ME Pennesi, KV Michaels, SS Magee, et al. Long-Term characterization of retinal degeneration in rd1 and rd10 Mice using spectral domain optical coherence tomography, [J]. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2012, 53(8): 4644-4656
- [24] G. Moiseyev, Y Chen, Y Takahashi, B X Wu, et al. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle [J]. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, vol. 102, no. 35, pp. 3088-3093, 2005
- [25] Crouch R K, Chader G J, Wiggert B, et al. Retinoids and the visual process[J]. *Photochem Photobiol*, 1996, 64: 613-621
- [26] Verbakel S K, van Huet R A C, Boon C J F, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 66: 157-186
- [27] Hamel C. Retinitis pigmentosa[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2006, 1: 40
- [28] Todd L, C Zelinka. Valproic Acid for a Treatment of Retinitis Pigmentosa: Reasons for Optimism and Caution[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(21): 5215-5217
- [29] Hanus J, Anderson C, Sarraf D, et al. Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate[J]. *Cell Death Discov*, 2016, 2: 16054
- [30] Tao Zui, Dai Jia-man, He Jian-rong, et al. The Influence of NaIO₃-Induced Retinal Degeneration on Intra-retinal Layer and the Changes of Expression Profile/Morphology of DA-ACs and mRGCS [J]. *Molecular Neurobiology*, 2013, 47(1): 241-260
- [31] Carido M, Zhu Y, Postel K, et al. Characterization of a mouse model with complete RPE loss and its use for RPE cell transplantation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(8): 5431-44
- [32] Wang J, Iacovelli J, Spencer C, et al. Direct effect of sodium iodate on neurosensory retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(3): 1941-53
- [33] Chen M, Rajapakse D, Fraczek M, et al. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye - a mechanism to repair damage and maintain homeostasis[J]. *Aging Cell*, 2016, 15(3): 436-45
- [34] Machalinska A, Lejkowska R, Duchnik M, et al. Dose-dependent retinal changes following sodium iodate administration: application of spectral-domain optical coherence tomography for monitoring of retinal injury and endogenous regeneration[J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39(10): 1033-41
- [35] Tsujikawa M, Wada Y, Sukegawa M, et al. Age at onset curves of retinitis pigmentosa[J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126(3): 337-40
- [36] Kannan R, D R Hinton. Sodium iodate induced retinal degeneration: new insights from an old model [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(23): 2044-5