

rd12 小鼠短波长敏感的视锥细胞变性过程研究

黎霞 张华 戴旭锋 庞继景

530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院眼科(黎霞); 325027 温州医科大学眼视光学院(张华、戴旭锋、庞继景); 32601 盖思斯维尔, 美国佛罗里达大学眼科(庞继景)

通信作者: 庞继景, Email: jpangoph@hotmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.003

【摘要】 **背景** 视网膜色素变性是先天性盲的重要原因之一, 由于视网膜色素变性患者视杆细胞为原发性变性, 因此无法了解视锥细胞变性的机制和过程。研究发现 Leber 先天性黑矇(LCA) 自发突变小鼠具有与视网膜色素变性类似的自然过程, 有助于深入探讨视网膜色素变性的发病机制及确定疾病基因治疗靶点。**目的** 研究视网膜色素变性模型 LCA 自发突变小鼠视网膜短波长敏感的视锥细胞自然变性过程。**方法** 按出生后天数(P)取 P14、P21、P35、P90 的遗传性视网膜疾病 LCA 的自发突变动物模型 Rpe65rd12(B6[A]-Rpe65rd12/J, rd12) 小鼠各 5 只, 同时选择鼠龄匹配的野生型 C57BL/6J(B6) 小鼠作为对照。采用 Roland Q450SC UV 视觉电生理检测仪行小鼠视网膜电图(ERG)检查, 采用单次白色发光二极管(LED)闪光刺激记录总视锥细胞反应, 刺激强度分别为 1.00 cds/m² 和 1.96 cds/m²; 采用紫外光闪光刺激记录短波长紫外光(UV)敏感的视锥细胞反应, 刺激波长为(363±6)nm, 刺激强度分别为 2.0 mWs/m² 和 3.0 mWs/m²。ERG 记录后次日处死小鼠并制备视网膜铺片, 分别采用 FITC 荧光标记的花生凝集素(FITC-PNA)和 Cy3 荧光染色法检测 2 个组不同鼠龄小鼠视网膜中总视锥细胞和 UV 敏感的视锥细胞的分布和数量变化。**结果** P14 rd12 小鼠明适应 ERG 反应为负波型, 各波潜伏期延长, UV 敏感的视锥细胞 ERG 各波记录不到。P21 rd12 小鼠视锥细胞 ERG b 波振幅较野生型 B6 小鼠下降了约 75%, b 波潜伏期为(102.80±11.39)ms, 较 B6 小鼠的(43.40±5.60)ms 明显延长, 差异有统计学意义($t=-8.106, P=0.001$); P21、P35 和 P90 野生型 B6 小鼠 UV 敏感的视锥细胞 ERG b 波振幅分别为(59.60±36.00)、(82.40±12.22)和(68.43±17.63)μV, P21、P35 和 P90 rd12 小鼠 UV 敏感的视锥细胞反应均记录不到。免疫荧光检测显示, P14 野生型 B6 小鼠视网膜视锥细胞较多, 呈绿色荧光, 大量的视蛋白主要分布在视网膜腹部鼻侧象限 UV 敏感的视锥细胞中, 呈红色荧光, P14、P21、P35 rd12 小鼠视网膜中视锥细胞逐渐减少, 绿色荧光逐渐减弱, UV 敏感的视锥细胞呈散在表达。**结论** rd12 小鼠出生后早期即出现视锥细胞的数量减少和功能异常, 短波长敏感的视锥细胞的丢失和功能异常更早于中长波长的视锥细胞。

【关键词】 视网膜变性/先天性; 眼蛋白/代谢; 光感受器/异常; 视网膜电图; 荧光抗体技术; Leber 先天性黑矇; 近交系 C57BL 小鼠; 动物模型

基金项目: 国家自然科学基金项目(81260155); 广西省自然科学基金项目(2012GXNSFAA053096)

Degeneration of short-wavelength cone cells in rd12 mice Li Xia, Zhang Hua, Dai Xufeng, Pang Jijing
Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Li X);
Eye Hospital, the School of Ophthalmology & Optometry, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China (Zhang H, Dai XF, Pang JJ); Department of Ophthalmology, University of Florida, Gainesville 32601, USA (Pang JJ)
Corresponding author: Pang Jijing, Email: jpangoph@hotmail.com

【Abstract】 **Background** Retinitis pigmentosa (RP) is one of the causes of congenital blindness. It is well known that the degeneration process of rod cells is difficult to detect in RP. Retinal degeneration 12 (rd12) mice is a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA), and it is helpful for us to explore the pathogenesis and determine the treating target of RP. **Objective** This study was to investigate the natural disease process of short-length sensitive cone cells in rd12 mice, a LCA Rpe65rd12 (B6[A]-Rpe65rd12/J) mouse. **Methods** The rd12 mice at postnatal (P) 14, P21, P35 and P90 were selected (5 mice for each), and the wild-type C57BL/6J (B6) mice with matched ages were included as controls. Photopic full-field electroretinogram (ERG) was recorded with Roland Q450SC UV visual physiology instrument. Cone response was recorded using single white light-emitting diode (LED) stimulation with the flash intensity of 1.00 cds/m² and 1.96 cds/m², and short wave-length sensitive cone response was recorded using ultraviolet light ([363±6] nm) stimulation with the flash intensity of 2.0 mWs/m² and 3.0 mWs/m². The mice were sacrificed and retinal whole-mounts were prepared. The distribution and number of cone cells and UV-sensitive cone cells were detected by FITC-peanut agglutinin (FITC-

PNA) and Cy3 immunofluorescence staining, respectively. **Results** In P14 rd12 mice, the ERG responses of overall cone cells presented the negative waveform and the latency was delayed, and UV-sensitive cone response was unrecordable. The b-wave amplitude of overall cone cells reduced by 75% in P21 rd12 mice compared with wild-type B6 mice, and the mean latency of b-wave in the P21 rd12 mice was significantly longer than that in the wild-type B6 mice ($[102.80 \pm 11.39] \text{ ms vs. } [43.40 \pm 5.60] \text{ ms}$) ($t = -8.106, P = 0.001$). The mean b-wave amplitudes of UV-sensitive cone cells were (59.60 ± 36.00) , (82.40 ± 12.22) and $(68.43 \pm 17.63) \mu\text{V}$ in the wild-type B6 mice, and those in the rd12 mice were unrecordable. Immunofluorescence showed that a larger number of cone cells with green fluorescence were seen, and the expression of opsin with red fluorescence was displayed in the UV-sensitive cone cells of nasal lateral on retinal ventral side in P14 wild-type B6 mice; while only a few opsin positive-response cells were seen in P14, P21 and P35 rd12 mice. **Conclusions** In rd12 mice, the functional abnormality and quantitative reduction of cone cells appear in the early postnatal days, and the loss of UV-sensitive cone cells is earlier and more obvious.

[Key words] Retinal degeneration/congenital; Eye proteins/metabolism; Photoreceptor/pathology; Electroretinography; Fluorescent antibody technique; Leber congenital amaurosis; Mice, inbred C57BL; Disease models, animal

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81260155); Natural Science Foundation of Guangxi Province (2012GXNSFAA053096)

Leber 先天性黑矇 (Leber congenital amaurosis, LCA) 属于非典型性视网膜色素变性疾病^[1], 可导致患者 1 岁前严重视力损伤, 甚至致盲^[1-2]。rd12 小鼠是自发突变动物模型, 由 *RPE65* 基因突变引起, 接近人类 LCA 的临床特征^[3]。研究发现, *RPE65* 基因缺失的动物早期视网膜锥体细胞的变性早于视网膜杆体细胞。*Rpe65*^{-/-}小鼠约在出生后 14 d (postnatal day 14, P14) ~ P21 视网膜锥体细胞就逐渐发生退行性改变, 视锥细胞中视蛋白的表达量下降, P25 或 P28 的小鼠眼球切片上紫外线 (ultraviolet, UV) 敏感的视锥细胞中未发现视蛋白的表达^[4-5], 而局部代谢产物积聚及视蛋白异位表达的毒性作用可能是导致视网膜变性的主要原因^[3]。目前的研究发现, *RPE65* 缺失小鼠 P5 或 P14 进行基因治疗可以延缓视锥细胞的丢失^[5-7], 而 1 月龄 *RPE65* 缺失小鼠进行基因治疗时则不能防止视锥细胞的变性过程^[5], 但在这些文献中并没有描述视网膜中对不同波长敏感的锥体细胞的疗效。我们先前的研究发现, P14 的 rd12 小鼠视网膜下腔注射携带 *RPE65* 基因的载体可以挽救 UV 敏感的视锥细胞的功能, 但不能挽救 P90 rd12 小鼠 UV 敏感的视锥细胞的功能^[8]。临床试验已经证实, rAAV2/2 载体治疗 *RPE65* 基因突变引起的 LCA2 是安全有效的, 但只能挽救尚未变性的细胞, 其对短波长敏感的视锥细胞的疗效仍不清楚^[9-12]。由于动物实验研究表明 *RPE65* 基因突变小鼠与视锥细胞中视蛋白表达缺失有关, 本研究拟观察 rd12 小鼠出生后视锥细胞, 特别是短波长敏感视锥细胞早期的自然变性过程, 以了解其病变特点, 为视网膜色素变性疾病的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择 P14、P21 和 P35 及 3 月龄 LCA 自发突变动物模型 *Rpe65*rd12 (*B6* [A]-*Rpe65*rd12/J, rd12) 小鼠各 5 只 (购自美国 Jackson 实验室) 作为 rd12 组, 选择年龄匹配的 C57BL/6J (*B6*) 野生型小鼠 (SPF 级) 作为正常对照组 (温州医学院实验动物中心提供), 小鼠体质量为 6.38 ~ 24.12 g。实验期间动物饲养室光照度为 18 lx, 以 12 h 昼/12 h 夜循环交替光照环境饲养。实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术委员会颁发的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 氯胺酮注射液 (福建古田制药有限公司); 兔抗视蛋白抗体蓝 (AB5407)、红/绿 (AB5405) (美国 Chemicon 公司); FITC 免疫荧光标记花生凝集素 (peanut agglutinin, FITC-PNA) 试剂 (美国 Vector 实验室); Cy3 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (武汉博士德公司)。罗兰视觉电生理检测仪 (德国 Roland Consult 公司); HM505E 冰冻切片仪 (德国 MICROM 公司); 倒置荧光显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠视觉电生理检测 采用改装的适用于小鼠的 Roland Q450SC UV 视觉电生理检测仪记录小鼠实验眼视网膜电图 (electroretinogram, ERG), 刺激器为全视野球形刺激器, 采用单次白色发光二极管 (light emitting diode, LED) 闪光刺激, 光刺激强度分别为 1.00 cds/m^2 和 1.96 cds/m^2 , 记录总视锥细胞反应; 短波长 UV 视锥细胞 ERG 反应的记录采用单次紫外线闪光刺激, 波长为 $(363 \pm 6) \text{ nm}$, 刺激强度分别为

2.0 mWs/m² 和 3.0 mWs/m²。采用白色背景光 (30 cds/m²)，通频带为 1~100 Hz，电阻小于 10 Ω。不同鼠龄小鼠检查前明适应至少 30 min，检查均在 12:00~17:00 进行。检查前 30 min 用质量分数 2.5% 复方托吡卡胺滴眼液点眼以充分扩瞳，用氯胺酮 (72 mg/kg) 和甲苯噻嗪 (4 mg/kg) 混合液小鼠腹腔内注射行全身麻醉。小鼠固定在实验台上，质量分数 0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液点眼以表面麻醉，角膜表面滴加质量分数 0.1% 羟甲基纤维素滴眼液，于小鼠受检眼角巩膜缘放置直径 0.2 mm 的氯化银丝制成的环形角膜电极，同侧颊部下置不锈钢针参考电极，尾部皮下置不锈钢针接地电极。ERG 记录过程中用 37℃ 水浴恒温记录台保持小鼠体温。

1.2.2 全视网膜铺片免疫荧光检测 为了更好地了解视锥细胞和 UV 敏感的视锥细胞在整个视网膜的分布情况，将整个视网膜神经感觉层进行全视网膜铺片，随后双重染色，免疫荧光法观察视锥细胞分布和数量的变化。于 ERG 记录后次日采用颈椎脱臼法处死小鼠，在角膜 12:00 位做烧灼标记，摘取实验眼眼球，置于质量分数 4% 多聚甲醛溶液浸泡后，将视网膜神经感觉层与眼球壁分离，体积分数 5% 山羊血清封闭 1 h，滴加兔抗视蛋白抗体蓝和 FITC-PNA 4℃ 孵育过夜，0.01 mol/L PBS 漂洗后滴加 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 抗体，室温下湿盒内孵育 4 h，然后以视神经为标记放射状切开视网膜神经感觉层制作视网膜铺片，使视网膜光感受器面朝上，荧光显微镜下观察视蛋白和视锥细胞在视网膜神经感觉层的分布并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件和 Excel 2007 软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间方差经 Levene 检验方差齐。采用均衡独立分组单因素分析研究设计，不同鼠龄 rd12 小鼠组与野生型 B6 小鼠组间 ERG 各波振幅和潜伏期的差异比较均采用独立样本 *t* 检验，*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 个组小鼠视锥细胞和 UV 敏感的视锥细胞明适应 ERG 反应

2.1.1 2 个组小鼠视锥细胞明适应 ERG 反应 刺激强度分别为 1.00 cds/m² 和 1.96 cds/m² 时，rd12 组和 B6 组小鼠 b 波振幅在最大刺激强度 1.96 cds/m² 时最大，P14 rd12 小鼠和 B6 小鼠的 ERG 反应波形均为负波型，rd12 小鼠 a 波潜伏期延长；P21 rd12 小鼠 a 波振

幅为 (5.23±2.28) μV，b 波振幅为 (33.22±4.58) μV，明显低于 B6 小鼠的 (17.96±3.93) μV 和 (134.80±13.33) μV，差异均有统计学意义 (*t* = 4.853, *P* = 0.008; *t* = 12.483, *P* = 0.000)，rd12 小鼠实验眼 ERG b 波振幅较 B6 小鼠的 b 波振幅降低了约 75%，rd12 小鼠 b 波潜伏期为 (102.80±11.39) ms，明显长于 B6 小鼠的 (43.40±5.60) ms，差异有统计学意义 (*t* = -8.106, *P* = 0.001)；P35 和 P90 rd12 小鼠 ERG b 波振幅分别为 (23.88±13.71) μV 和 (16.16±4.31) μV，均明显低于 B6 小鼠的 (125.20±11.48) μV 和 (113.30±15.35) μV，差异均有统计学意义 (*t* = 9.814, *P* = 0.001; *t* = 10.553, *P* = 0.000)，P35 和 P90 rd12 小鼠 ERG b 波潜伏期分别为 (85.00±12.67) ms 和 (80.20±10.47) ms，较 B6 小鼠的 (40.40±2.88) ms 和 (43.00±5.48) ms 均明显延长，差异均有统计学意义 (*t* = -5.608, *P* = 0.005; *t* = -5.438, *P* = 0.006) (图 1)。

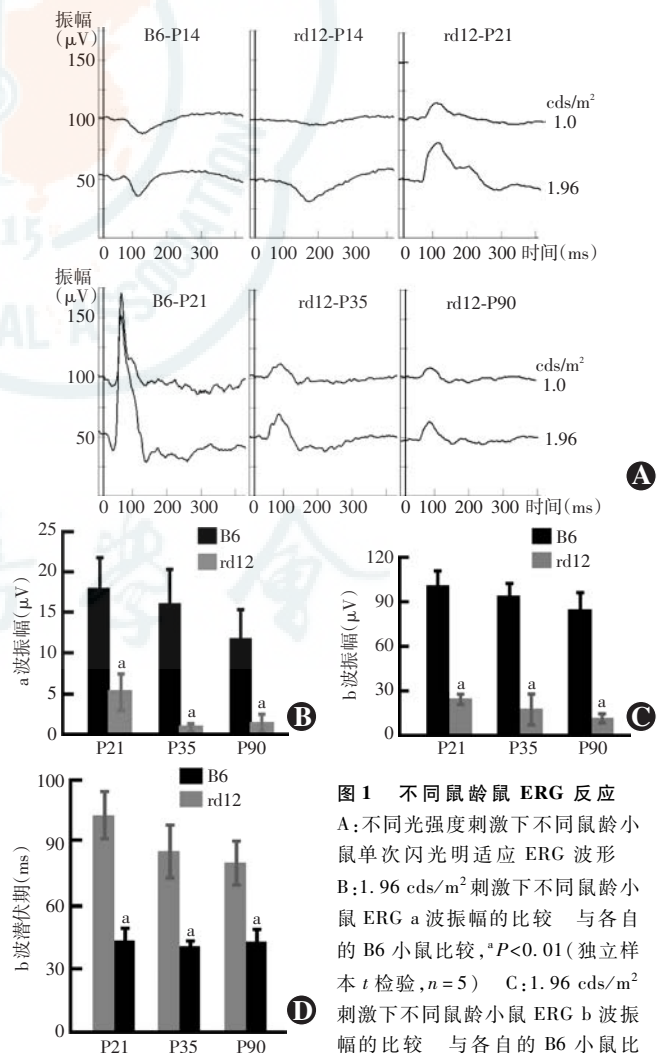


图 1 不同鼠龄鼠 ERG 反应
 A: 不同光强度刺激下不同鼠龄小鼠单次闪光明适应 ERG 波形
 B: 1.96 cds/m² 刺激下不同鼠龄小鼠 ERG a 波振幅的比较 与各自的 B6 小鼠比较，^a*P*<0.01 (独立样本 *t* 检验，*n* = 5)
 C: 1.96 cds/m² 刺激下不同鼠龄小鼠 ERG b 波振幅的比较 与各自的 B6 小鼠比较，^a*P*<0.01 (独立样本 *t* 检验，*n* = 5)
 D: 1.96 cds/m² 刺激下不同鼠龄小鼠 ERG b 波潜伏期比较 与各自的 B6 小鼠比较，^a*P*<0.01 (独立样本 *t* 检验，*n* = 5)
 P: 出生后天数

2.1.2 2 个组小鼠 UV 敏感的视锥细胞明适应 ERG 反应 P14 野生型 B6 小鼠 UV 敏感的视锥细胞明适应 ERG 各波形平坦, P21、P35 和 P90 B6 小鼠 b 波振幅为正波型, 分别为 (59.60 ± 36.00) 、 (82.40 ± 12.22) 和 $(68.43 \pm 17.63) \mu\text{V}$, 不同鼠龄 rd12 小鼠 ERG a 波和 b 波均记录不到(图 2)。

2.2 视锥细胞免疫荧光检测

P14 野生型 B6 小鼠 UV 敏感的视锥细胞视蛋白主要分布在视网膜腹部鼻侧象限, 荧光染色为细小的红色颗粒, 视蛋白主要分布在 PNA 染色阳性细胞的一端; P14 rd12 小鼠视网膜在低倍镜下未见视网膜 UV 敏感的视锥细胞中视蛋白阳性表达, 高倍镜下仅见少量细胞染色。P21 rd12 小鼠在低倍镜下未见视网膜 UV 敏感的视锥细胞中视蛋白阳性表达, 高倍镜下视蛋白阳性细胞明显减少。P35 rd12 小鼠视网膜腹部鼻侧象限区域视蛋白阳性细胞明显减少(图 3)。

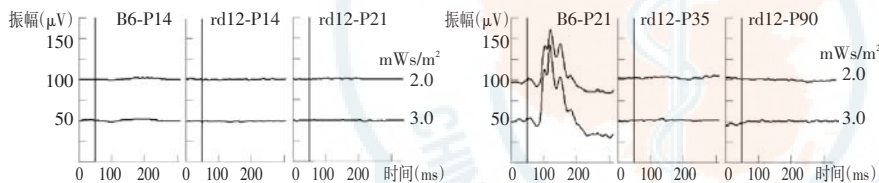


图 2 2 个组小鼠单次闪光刺激视网膜 UV 敏感的视锥细胞明适应 ERG 波形 P: 出生后天数

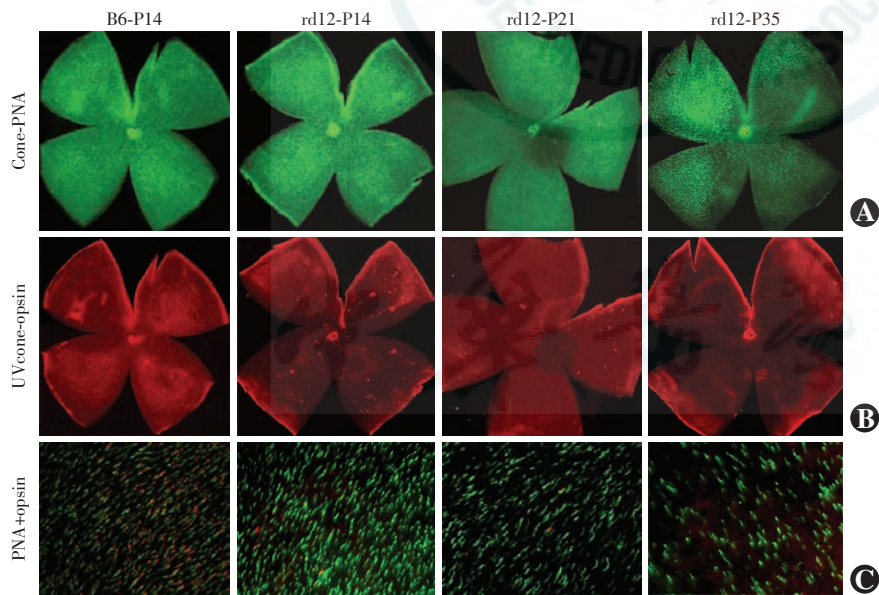


图 3 不同鼠龄小鼠视网膜 UV 敏感的视锥细胞中视蛋白的表达和定位 A: 不同鼠龄小鼠视网膜铺片视锥细胞呈绿色荧光(PNA $\times 5$) B: 视网膜 UV 敏感的视锥细胞中视蛋白表达呈红色荧光(Cy3 $\times 5$) C: A 图与 B 图高倍镜下视网膜腹部鼻侧象限区域融合图($\times 40$) UV: 紫外线 P: 出生后天数

3 讨论

目前研究 LCA 亚型 LCA2 的动物模型包括 *Rpe*^{-/-} Swedish Briard 狗、*Rpe65*^{-/-} 小鼠、*RPE65*^{-/-} 灵长类和

rd12 小鼠^[3,7,13-15], 本研究中采用 rd12 小鼠对视网膜视锥细胞变性过程进行研究。rd12 是自发突变的 LCA 动物模型, Pang 等^[3] 研究发现该小鼠视网膜有白色斑点样沉着, 是较为接近人类 LCA 临床特征的动物模型。本研究中发现, rd12 小鼠自出生睁眼后较早出现 ERG 异常, 小鼠 UV 敏感的视锥细胞发生明显的退行性改变, 同时免疫荧光检测也发现了相应的形态学异常。

LCA 患者早期 ERG 各波形记录不到是其重要的临床特征^[16]。研究发现, 5 周龄的 Swedish Briard-Beagle 狗即可出现明适应 ERG b 波振幅降低或记录不到^[17], 也有研究表明成年 *RPE65*^{-/-}; *Rho*^{-/-} 双基因敲除小鼠明适应 ERG 反应记录不到, 但在较高强度光刺激下能检测到暗适应 ERG 反应, 认为其来源于视杆细胞^[18], 而 Rohrer 等^[4] 在白光背景下用最大光强度单次闪烁光刺激在 *RPE65*^{-/-}; *Rho*^{-/-} 双基因敲除小鼠

模型记录到很小的明适应 ERG 反应, 认为其来源于视锥细胞, 并且视锥细胞的功能在 4~5 周龄时完全丢失, 但本研究显示, 明适应白光刺激下在年龄较大的 rd12 小鼠(如 P90) 仍可检测到振幅较低的视锥细胞反应。Hasegawa 等^[19] 对 rd12 小鼠的研究也发现, 13 月龄的 rd12 小鼠可检测到明适应 ERG 的 b 波, 因此认为 13 月龄的 rd12 小鼠仍处于视锥细胞变性的过程, 而我们先前的研究结果提示残余的 ERG 反应可能来自视杆细胞^[20]。

小鼠视网膜只有 2 种类型的视锥细胞, 即中波长敏感的视锥细胞(M 锥体细胞)和 UV 敏感的视锥细胞(UV 锥体细胞)^[21]。小鼠视网膜以视杆细胞为主, 视锥细胞仅占感光细胞的 3%^[22], 其中中波长敏感的视锥细胞分布于整个视网膜中, UV 敏感的视锥细胞主要分布于视网膜腹侧, 小鼠视网膜中短波长敏感的视色素吸收峰值为 359 nm (UV)^[23]。在本研究中, 未经治疗的 rd12 小鼠任何鼠龄都检测不到 UV 敏感的视锥细胞反应, 与 Allocca 等^[24] 有关 *RPE65*^{-/-} 小鼠的检测结果类似。本研究中发现, 同一 rd12 小鼠眼 UV 敏感的视锥细胞反应记录不到, 视蛋白表达阳性的 UV 敏感的视

锥细胞明显减少或消失,因此本研究中认为 rd12 小鼠 UV 敏感的视锥细胞数量减少可导致 ERG 反应异常。

我们先前的研究发现,rd12 小鼠早期视锥细胞快速发生退行性改变,其改变从视网膜中央向腹部鼻侧象限方向进展,仅残留视网膜背部颞侧象限的 PNA 阳性染色视锥细胞^[8]。本研究中,随着 rd12 小鼠鼠龄的增加,视网膜中视蛋白阳性表达的 UV 敏感视锥细胞逐渐减少,P35 的 rd12 小鼠视网膜腹部鼻侧锥体细胞明显减少,视蛋白阳性表达的 UV 敏感的视锥细胞消失。因此本研究中推测鼠龄较大的 rd12 小鼠视网膜中残余的视锥细胞多属于功能不良和结构不完整的中波长敏感的视锥细胞,而 UV 敏感的视锥细胞变性较早且较快。

本研究还发现,与野生型 B6 小鼠相比,rd12 小鼠视锥细胞的 PNA 染色和视蛋白染色均明显异常,视网膜视锥细胞 ERG 各波振幅下降且潜伏期延长。有学者认为,rd12 小鼠视网膜免疫荧光检测结果的异常和 ERG 的改变与视蛋白不能从视锥细胞的内节转运到外节,使视蛋白残留在内节有关^[4],而 mRNA 翻译过程中核糖体与 mRNA 结合不紧密可能是影响视功能的因素之一^[25]。Jacobson 等^[26-28]研究发现,RPE65 基因突变的患者视网膜中仍有视锥细胞残留,用不同颜色光刺激 ERG 检查可发现视网膜中残留的长波长敏感的视锥细胞功能,但未检测到短波长敏感的视锥细胞功能。

UV 敏感的视锥细胞主要分布于野生型小鼠视网膜腹部鼻侧象限。rd12 小鼠视网膜腹侧鼻下象限的视锥细胞早期即发生退行性改变,这个区域的 M 锥体细胞和 UV 敏感的视锥细胞功能明显下降。然而,本研究中虽然发现了上述改变,但该区域的 UV 敏感的视锥细胞是否对 RPE65 基因突变的反应较中波长敏感的视锥细胞更为敏感,中波长敏感的视锥细胞的变性是否是继发于 UV 敏感的视锥细胞病变,或者是某些因素同时影响该区域的各种类型的视锥细胞,目前仍不清楚。本研究中发现 UV 敏感的视锥细胞变性较早,ERG 检查和免疫荧光检测均证实其形态和功能均出现明显异常,提示我们应及时进行基因治疗以挽救 UV 敏感的视锥细胞。关于 RPE65 基因的研究表明,RPE65 为光信号传导通路的异构酶,光照对 rd12 变性模式的影响尚不能排除。

参考文献

[1] Tombran-Tink J. Retinal degenerations: biology, diagnostics, and therapeutics[M]. New Jersey:Humana Press Inc.,2007:61.
[2] Koeneke RK. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to

understand human retinal development [J]. Surv Ophthalmol, 2004, 49(4): 379-398. DOI:10.1016/j.survophthal.2004.04.003.
[3] Pang JJ, Chang B, Hawes NL, et al. Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA) [J]. Mol Vis, 2005, 11: 152-162.
[4] Rohrer B, Lohr HR, Humphries P, et al. Cone opsin mislocalization in Rpe65^{-/-} mice: a defect that can be corrected by 11-cis retinal [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(10): 3876-3882. DOI:10.1167/iovs.05-0533.
[5] Bemelmans AP, Kostic C, Crippa SV, et al. Lentiviral gene transfer of RPE65 rescues survival and function of cones in a mouse model of Leber congenital amaurosis [J/OL]. PLoS Med, 2006, 3(10): e347 [2016-04-10]. http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0030347. DOI:10.1371/journal.pmed.0030347.
[6] Chen Y, Moiseyev G, Takahashi Y, et al. RPE65 gene delivery restores isomerohydrolase activity and prevents early cone loss in Rpe65^{-/-} mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(3): 1177-1184. DOI:10.1167/iovs.05-0965.
[7] Pang JJ, Chang B, Kumar A, et al. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis [J]. Mol Ther, 2006, 13(3): 565-572. DOI:10.1016/j.yimthe.2005.09.001.
[8] Li X, Li W, Dai X, et al. Gene therapy rescues cone structure and function in the 3-month-old rd12 mouse: a model for midcourse RPE65 leber congenital amaurosis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(1): 7-15. DOI:10.1167/iovs.10-6138.
[9] Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis [J]. N Engl J Med, 2008, 358(21): 2231-2239. DOI:10.1056/NEJMoa0802268.
[10] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis [J]. N Engl J Med, 2008, 358(21): 2240-2248. DOI:10.1056/NEJMoa0802315.
[11] Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, et al. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial [J]. Hum Gene Ther, 2008, 19(10): 979-990. DOI:10.1089/hum.2008.107.
[12] Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, et al. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis [J]. N Engl J Med, 2015, 372(20): 1887-1897. DOI:10.1056/NEJMoa1414221.
[13] van Hooser JP, Liang Y, Maeda T, et al. Recovery of visual functions in a mouse model of Leber congenital amaurosis [J]. J Biol Chem, 2002, 277(21): 19173-19182. DOI:10.1074/jbc.M112384200.
[14] Samardzija M, von LJ, Tanimoto N, et al. R91W mutation in Rpe65 leads to milder early-onset retinal dystrophy due to the generation of low levels of 11-cis-retinal [J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(2): 281-292. DOI:10.1093/hmg/ddm304.
[15] Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness [J]. Nat Genet, 2001, 28(1): 92-95. DOI:10.1038/88327.
[16] den Hollander AI, Roepman R, Koeneke RK, et al. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms [J]. Prog Retin Eye Res, 2008, 27(4): 391-419. DOI:10.1016/j.preteyeres.2008.05.003.
[17] Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, et al. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(35): 12413-12418. DOI:10.1073/pnas.0503460102.
[18] Seeliger MW, Grimm C, Stählberg F, et al. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis [J]. Nat Genet, 2001, 29(1): 70-74. DOI:10.1038/ng712.
[19] Hasegawa T, Ikeda HO, Nakano N, et al. Changes in morphology and visual function over time in mouse models of retinal degeneration: an

- SD-OCT, histology, and electroretinography study [J]. Jpn J Ophthalmol, 2016, 60(2) : 111-125. DOI:10. 1007/s10384-015-0422-0.
- [20] Dai X, Zhang H, He Y, et al. The frequency-response electroretinogram distinguishes cone and abnormal rod function in rd12 mice [J/OL]. PLoS One, 2015, 10(2) : e0117570 [2016-03-12]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0117570. DOI: 10.1371/journal.pone.0117570.
- [21] Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, et al. The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning [J]. Neuron, 2000, 27(3) : 513-523.
- [22] Carter-Dawson LD, LaVail MM. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy [J]. J Comp Neurol, 1979, 188(2) : 245-262. DOI:10.1002/cne.901880204.
- [23] Weber M, Rabinowitz J, Provost N, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery [J]. Mol Ther, 2003, 7(6) : 774-781.
- [24] Allocca M, Doria M, Petrillo M, et al. Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice [J]. J Clin Invest, 2008, 118(5) : 1955-1964. DOI: 10.1172/JCI34316.
- [25] Wright CB, Chrenek MA, Feng W, et al. The Rpe65 rd12 allele exerts a semidominant negative effect on vision in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(4) : 2500-2515. DOI:10.1167/iovs.13-13574.
- [26] Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, et al. Photoreceptor layer topography in children with leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(10) : 4573-4577. DOI:10.1167/iovs.08-2121.
- [27] Jacobson SG, Aleman TS, Cideciyan AV, et al. Human cone photoreceptor dependence on RPE65 isomerase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(38) : 15123-15128. DOI:10.1073/pnas.0706367104.
- [28] Jacobson SG, Aleman TS, Cideciyan AV, et al. Defining the residual vision in leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(5) : 2368-2375. DOI:10.1167/iovs.08-2696.

(收稿日期:2016-12-11 修回日期:2017-10-09)

(本文编辑:尹卫靖)

· 病例报告 ·

他莫昔芬相关黄斑病变和干眼一例

何艳茹 王海燕 王雨生

710032 西安,空军军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

通信作者:王海燕, Email: whyeye@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.004

患者,女,45岁,因双眼干涩、畏光、视力下降1年于2014年8月10日至西京医院眼科门诊就诊。患者发病过程中无眼前黑影飘动、视物变形、眼痛、眼胀等不适。2009年行右侧乳腺癌根治术,术后行化学疗法治疗,术后2个月开始口服他莫昔芬,每天10mg,共服用36.5g。否认家族史和其他合并用药。目前,乳腺癌控制情况良好。眼科检查:最佳矫正视力右眼为0.6,左眼为0.5;眼压右眼为14mmHg(1mmHg=0.133kPa),左眼为12mmHg。双眼泪液分泌试验(Schirmer II test, S II t)均为0mm/5min,双眼泪膜破裂时间(breakup time of tear film, BUT)均为5s,荧光素染色双眼均为阴性。双眼睑缘略钝圆,无充血,无分泌物滞留,结膜稍充血,角膜尚透明,前房深度正常,瞳孔等大等圆,直径为3mm,对光反应灵敏,晶状体透明,眼底检查视盘边界清楚,C/D约为0.3,视网膜平伏,黄斑中心凹可见点状黄白色病灶,中心反光不清(图1)。光相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)

提示双眼黄斑区视网膜内有局灶性低反射,可见点状高反射主要位于内层视网膜,光感受器复合体内节/外节(inner segment/outer segment, IS/OS)部分断裂,反射不清(图2)。荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)提示双眼黄斑区可见透见荧光(图3)。血清学检查提示抗SSA/SSB抗体(-)。唇腺活检(-)。诊断:双眼他莫昔芬相关黄斑病变和干眼。患者就诊期间给予人工泪液缓解干眼不适,出院后未能复诊,电话随访停用他莫昔芬后干眼症状缓解,但视力无明显提高。

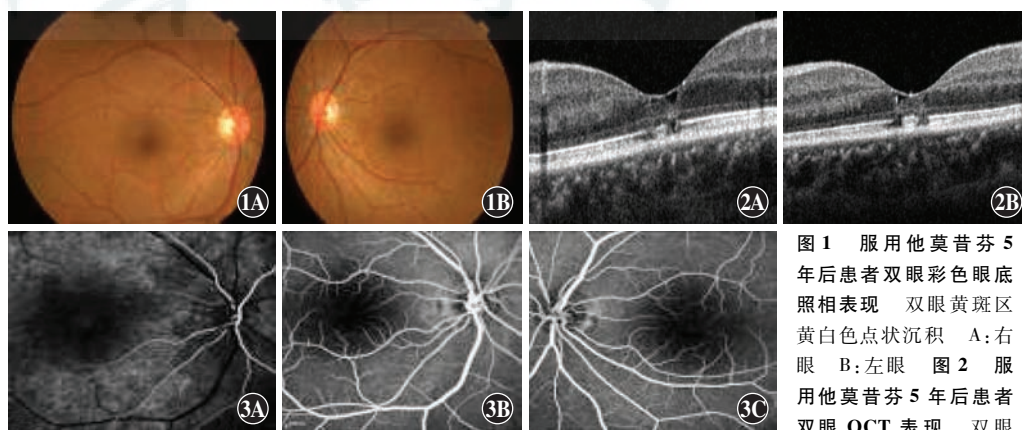


图1 服用他莫昔芬5年后患者双眼彩色眼底照相表现 双眼黄斑区黄白色点状沉积 A:右眼 B:左眼 图2 服用他莫昔芬5年后患者双眼OCT表现 双眼黄斑中心凹视网膜可见点状高反射物质,视网膜有低反射区,IS/OS连接部分断裂 A:右眼 B:左眼 图3 服用他莫昔芬5年后患者双眼FFA表现 双眼黄斑区可见透见荧光 A:右眼早期 B:右眼晚期 C:左眼晚期