

# 早产大鼠与正常大鼠视网膜结构和功能发育程度的比较

杨湘敏 李蓉 王雨生 苏静波 安晶 陈涛 曹青林 张作明

710032 西安,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所(杨湘敏、李蓉、王雨生、苏静波);

710032 西安,第四军医大学航空航天临床医学教研室(安晶、陈涛、曹青林、张作明)

通信作者:王雨生,Email:wangys003@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.010

**【摘要】** **背景** 早产是儿童视觉系统形态和功能发育异常以及伴发眼部疾病的高危因素。观察早产新生大鼠的视网膜结构以及功能发育的规律和特点具有重要意义。**目的** 探讨早产对新生大鼠神经视网膜结构和功能的影响,为相关的进一步研究提供实验依据。**方法** 将 28 只 SD 孕鼠随机分为细菌脂多糖诱导早产(LP)组、米非司酮诱导早产(RP)组、剖宫产早产(CP)组和正常对照组,LP 组、RP 组孕鼠于孕 18 d 时分别于腹腔内注射细菌脂多糖(LPS),剂量为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  或皮下注射米非司酮,剂量为 10  $\text{mg}/\text{kg}$  诱导早产,CP 组孕鼠于孕 19 d 行剖宫产,正常对照组孕鼠于孕 22 d 自然产鼠,每组每窝 10~12 只幼鼠。分别于各组幼鼠出生后 4、7、10 和 14 d 麻醉后用生理盐水和质量分数 4% 多聚甲醛对幼鼠进行体循环灌注,摘取左侧眼球行视网膜组织切片,采用苏木精-伊红染色法观察幼鼠神经视网膜各层分化情况,并计数各层视网膜的细胞层数。分别于出生后 14、21 和 28 d 记录大鼠视网膜电图(ERG)国际标准化 5 项反应,检测各组幼鼠视网膜功能,对早产模型鼠和正常对照组大鼠的检测结果进行比较。**结果** 出生后 4 d 和 7 d,LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠视网膜神经母细胞层数较正常对照组增多,差异有统计学意义(LP 组: $t = -7.07, -4.97$ , 均  $P < 0.01$ ; CP 组: $t = -6.45, -3.61$ , 均  $P < 0.01$ ; RP 组: $t = -6.38, -3.35$ ,  $P = 0.00$ ); 出生后 10 d 和 14 d,LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠视网膜内核层和外核层细胞层数与正常对照组相比差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。与同龄正常对照组幼鼠比较,出生后 14、21 和 28 d,LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠 ERG Rod-b 波、Max-a 波、Max-b 波、OPs、Cone-b 波和闪烁光 ERG 振幅的差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。出生 14 d,与正常对照组幼鼠比较,LP 组幼鼠 Max-a、b 波潜伏值明显延长,差异有统计学意义( $t = -3.94, -3.31$ , 均  $P < 0.01$ ),CP 组幼鼠 Rod-b 波、Max-b 波和 Cone-b 波潜伏值明显延长,差异有统计学意义( $t = -2.42, -2.61, -2.16$ , 均  $P = 0.02$ );RP 组幼鼠 Max-b 波潜伏值明显延长,差异有统计学意义( $t = -3.67, P < 0.01$ )。与正常对照组比较,LP 组出生后 21 d 鼠 Max-a、b 波潜伏值明显延长,差异有统计学意义( $t = -3.18, -3.45$ , 均  $P < 0.01$ ),出生后 28 d 鼠 Max-b 波潜伏值明显延长,差异有统计学意义( $t = -3.61, P < 0.01$ )。**结论** 早产幼鼠出生后早期神经视网膜的结构和功能发育过程较正常幼鼠均滞后,可能是早产儿视网膜疾病发病的解剖学基础。

**【关键词】** 早产/化学和手术诱导; 孕龄; 新生动物; 发育; 视网膜; 视网膜电图; 结构; SD 大鼠

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81271014、81470655、81570856)

**Contrast of retinal structure and function developing of premature rats versus full-term newborn rats** Yang

Xiangmin, Li Rong, Wang Yusheng, Su Jingbo, An Jing, Chen Tao, Cao Qinglin, Zhang Zuoming

Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China (Yang XM, Li R, Wang YS, Su JB); Department of Clinical Aerospace Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China (An J, Chen T, Cao QL, Zhang ZM)

Corresponding author: Wang Yusheng, Email: wangys003@126.com

**[Abstract]** **Background** Premature birth is a high risk factor of abnormal development in the morphology and function of vision system. To observe the effect of premature birth on the structural and functional development of neonatal retina is of great importance. **Objective** This study aimed to compare the differences of retinal structure and function between premature rats and normal rats. **Methods** Twenty-eight gestational SD rats were randomized to bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced preterm (LP) group, mifepristone-induced preterm (RP) group,

cesarean section-induced preterm (CP) group and normal control group, with 10-12 rats from each nest. LPS (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or mifepristone (10  $\text{mg}/\text{kg}$ ) was injected on the 18 th day of gestation in the LP group and RP group, respectively, to establish premature birth rat models, and cesarean delivery was performed on the 19 th day of gestation in the CP group. Full-term newborn rats born in 22 days after gestation in the normal group. Systemic circulatory perfusion was carried out in the neonatal rats using normal saline solution and 4% triformal on postnatal 4, 7, 10 and 14 days and then the retinal sections of the left eyes were prepared for the hematoxylin and eosin staining to examine the retinal layers and cells counting. Electroretinogram (ERG) based on international standardization was recorded in the rats on postnatal 14, 21 and 28 days to evaluate the retinal function. All the results were compared between the premature rats and the normal rats. The use and care of the animals complied with the Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** The number of neuroblast layers was more on postnatal 4-day and 7-day rats in the LP group, CP group and the RP group than those in the normal control group (LP:  $t = -7.07, -4.97$ , both at  $P < 0.01$ ; CP:  $t = -6.45, -3.61$ , both at  $P < 0.01$ ; RP:  $t = -6.38, -3.35$ , both at  $P = 0.00$ ). No significant difference was found in the number of inner and outer nuclear layers in postnatal 10-day and 14-day rats between the normal group and LP group, CP group or RP group (all at  $P > 0.05$ ). Compared with the normal group, the amplitudes of Rod-b wave, Max-a and b waves, oscillatory potentials (OPs), Cone-b wave and flicker ERG were not significantly changed on postnatal 14-day, 21-day and 28-day rats among the LP group, CP group and RP group (all at  $P > 0.05$ ). However, the latencies of Max-a and b waves were significantly extended on postnatal 14-day rats in the LP group ( $t = -3.94, -3.31$ , all at  $P < 0.01$ ), and the latencies of Rod-b wave, Max-b wave and Cone-b wave were prolonged in the CP group in comparison with the normal group ( $t = -2.42, -2.61, -2.16$ , all at  $P = 0.02$ ). Also, the latency of Max-b wave was extended in the RP group in comparison with the normal group ( $t = -3.67, P < 0.01$ ). In addition, the latencies of Max-a and b waves in 21-day rats and Max-b latency in 28-day rats in the LP group were significantly longer than those in the normal group ( $t = -3.18, -3.45, -3.61$ , all at  $P < 0.01$ ). **Conclusions** The developing lags of retinal structure and function probably are the anatomical basis of preterm children prone to retinal diseases.

[Key words] Premature/chemically and surgery induced; Gestational age; Animals, newborn; Development; Retina; Electroretinogram; Structure; Rats, Sprague Dawley

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81271014, 81470655, 81570856)

早产儿提前脱离子宫内的生长环境,处于敏感发育阶段的视觉系统暴露于外界环境,且早产儿出生后从母体中获得与视觉系统发育相关的  $\Omega$ -3 族脂肪酸等营养成分的机会被剥夺<sup>[1-3]</sup>,因此早产成为患儿视觉系统形态和功能发育异常以及伴发眼部疾病的高危因素<sup>[4-5]</sup>。与足月儿相比,早产儿早期眼部结构发育及后期视觉功能具有一定的特殊性,视觉损害和眼部发育的异常情况较为常见,如弱视、早产儿视网膜病变等<sup>[6-7]</sup>,因此研究早产儿视网膜形态和功能的变化对相关疾病的预防和治疗有重要意义。由于获得人体相关研究材料困难,且研究已证实早产啮齿动物能更好地模拟人类早产儿出生时的生理病理状态<sup>[8]</sup>,故早产大鼠模型已用于多种相关疾病的研究。为系统了解早产儿视网膜结构及功能的改变,本研究中拟观察早产新生大鼠的视网膜结构及功能发育的规律和特点,为相关疾病的基础和临床研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 成年清洁级 SD 大鼠 28 只(第四军医大学动物中心),雌雄比例 1:1 合笼过夜,次日见阴栓者定为胚胎 0 d。受孕雌鼠单笼饲养,所有大鼠均置于明暗交替(7:00~19:00 明/20:00~6:00 暗)的环境中饲养,温度保持在 25  $^{\circ}\text{C}$ 。实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、米非司酮(mifepristone, RU-486)、戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司);速眠新(批号:070031582,吉林圣达动物药品有限公司);氯胺酮(批号:100818,福建古田药业有限公司);黑色纹身染料(批号:20110966KS,江苏梦得电镀化学品有限公司)。RETI-scan 系统(德国 Roland Consult 公司);BX51 型显微镜及图像采集系统(日本奥林巴斯株式会社)。

**1.1.3 实验分组及早产鼠模型的建立** 将受孕雌鼠随机分为 4 个组,足月生产的正常幼鼠(孕 22 d)作为正常对照组,而根据不同的诱导早产方法将早产的鼠分为 LPS 诱导早产(LPS induced preterm group, LP)组、米非司酮诱导早产组(RU-486 induced preterm

group, RP) 组和剖宫产早产组 (cesarean section induced preterm group, CP) 组。根据本研究组前期的研究方法,发现在孕 19 d 诱导出生的早产幼鼠有成活率较高且发育不完全的特点<sup>[8]</sup>,因此本研究中仍将孕 19 d 定义为早产。每窝幼鼠数量控制在 10~12 只。雌鼠在孕 18 d 时腹腔内注射细菌 LPS 诱导早产,注射剂量为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[9]</sup>,获得在孕 19 d 出生的早产幼鼠 5 窝共 59 只。孕 18 d 时按 10 mg/kg 的剂量皮下注射米非司酮诱导早产<sup>[10]</sup>,获得在孕 19 d 出生的早产幼鼠 4 窝共 52 只。CP 组雌鼠孕 19 d 时经乙醚麻醉后,仰卧位固定在操作台上,消毒铺巾,沿腹中线切开皮肤,分离肌肉,暴露子宫,止血钳夹住子宫颈与两侧输卵管并切断,将子宫放入传递盘中,在 3 min 内撕破子宫取出胎鼠,产后由哺乳期母鼠代乳<sup>[11]</sup>。CP 组获得孕 19 d 出生的早产幼鼠 7 窝共 80 只。正常对照组获得孕 22 d 出生的幼鼠 5 窝共 58 只。

## 1.2 方法

### 1.2.1 新生大鼠的视网膜组织学检查

分别于出生后 4、7、10 和 14 d 任意取各组幼鼠 6 只,戊巴比妥钠麻醉后用生理盐水和质量分数 4% 多聚甲醛对幼鼠进行体循环灌注,摘取左侧眼球,在幼鼠眼球的 3:00 位用黑色纹身染料进行标记,眼球行常规固定、脱水、包埋,然后以视盘为原点,沿垂直方向制备厚 5  $\mu\text{m}$  的切片,行苏木精-伊红染色,用图像采集系统观察并拍照,每只眼球得到经视神经的切片 6 张,任意选取 3 张,400 倍光学显微镜下计数第 4 d 和第 7 d 幼鼠标记侧距离视盘边缘 500  $\mu\text{m}$  处神经母细胞层的细胞层数以及第 10 d 和第 14 d 大鼠相应部位视网膜内核层及外核细胞层数。

### 1.2.2 视觉电生理检测

任意选取正常对照组和各早产组幼鼠各 1 窝,分别于生后第 14、21 和 28 d 记录大鼠的视网膜电图 (electroretinogram, ERG)。每次 ERG 检测的时间均为当日 14:00~17:00,由同一实验员操作完成。根据第四军医大学航空医学系视觉电生理实验室制定的小动物视觉电生理标准化方案<sup>[12]</sup>,按

0.2 ml/100 g 的剂量将氯胺酮、速眠新和无菌生理盐水 ( $V_{\text{氯胺酮}}:V_{\text{速眠新}}:V_{\text{生理盐水}}=2.0:0.5:6.0$ ) 混匀后腹腔内注射麻醉幼鼠,用复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。暗适应 5 min 后,记录 ERG 标准 5 项基本反应,包括视杆细胞反应、最大混合反应、振荡电位 (oscillatory potentials, OPs)、视锥细胞反应、闪烁反应,测量主要波形的潜伏值及振幅。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析,采用 Origin7.5 软件制作统计图表。本研究中测量指标的数据资料经 Sapiro-Wilk 检验均符合正态分布,以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间均属经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组单因素干预多水平实验设计,LP 组、CP 组、RP 组和正常对照组间视网膜各层细胞层数及 ERG 各波振幅和潜伏值的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett *t* 检验。采用双尾检测法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组幼鼠视网膜结构发育变化

#### 2.1.1 各组幼鼠视网膜组织形态学表现

LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠在出生后 4、7、10 和 14 d 的视网膜神经感觉层的分化趋势及细胞形态与正常对照组大鼠无明显差异。大鼠出生后 4 d,视网膜由视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE)、神经母细胞层 (neuroblast, NBL)、内丛状层 (inner plexiform layer, IPL) 及神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL) 组成;出生后 7 d, NBL 分化出内核层 (inner nuclear layer, INL) 和外核层 (outer nuclear layer, ONL),正常对照组幼鼠可见明显的视网膜 INL 和 ONL 之间的分界线,即外丛状层 (outer plexiform layer, OPL),而 LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠的 OPL 分化不明显;出生后 10 d,4 个组幼鼠视网膜感光细胞内外节均已分化, GCL 变为单层细胞;出生后 14 d 4 个组幼鼠视网膜各层结构已分化成熟,呈现典型的 10 层结构 (图 1~4)。

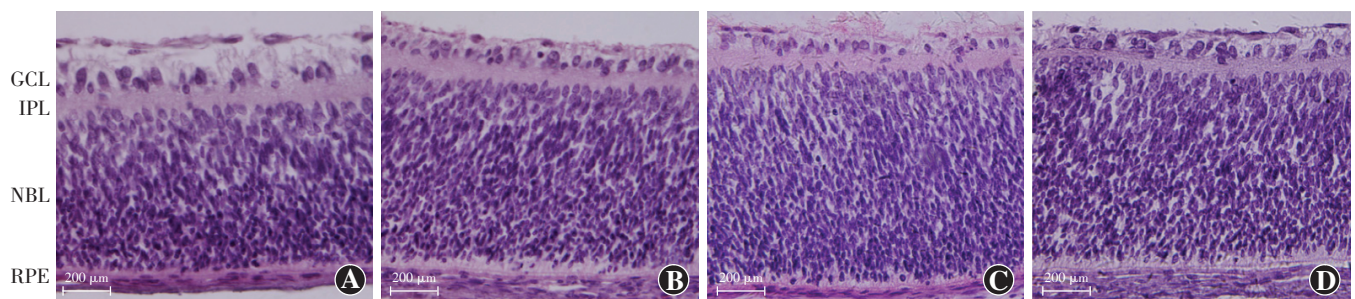


图 1 各组出生后 4 d 幼鼠视网膜形态学比较 (HE 标尺 = 200  $\mu\text{m}$ ) 幼鼠 NBL 均分化出 INL、ONL, 2 层细胞间尚无分界线 GCL 较薄 A: 正常对照组 B: LP 组 C: CP 组 D: RP 组 NBL: 神经母细胞层; RPE: 视网膜色素上皮; IPL: 内丛状层; GCL: 神经节细胞层



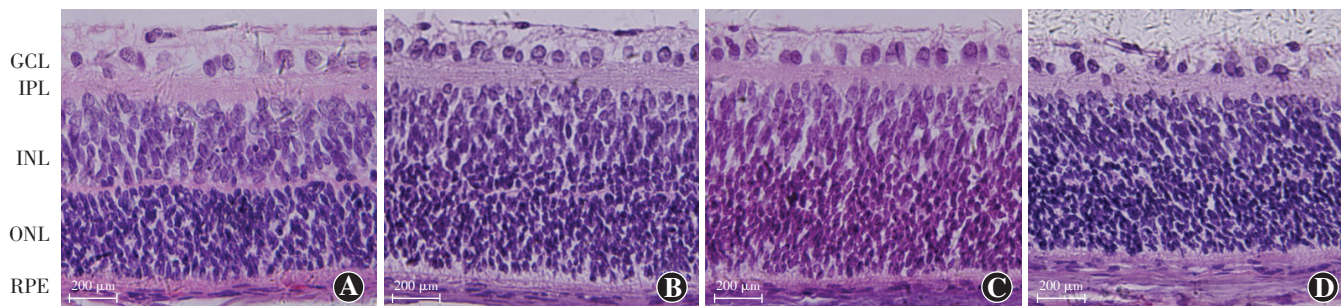


图 2 各组出生后第 7 d 幼鼠视网膜形态学的比较(HE 标尺=200 μm) 幼鼠 NBL 均分化出 INL 和 ONL 正常 LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠 INL 与 ONL 之间的分界线不明显 A:正常对照组视网膜可见 INL 与 ONL 之间由清晰的分界线 B:LP 组幼鼠 INL 与 ONL 之间可见较细的分界线 C:CP 组幼鼠 INL 与 ONL 之间分界线不明显 D:RP 组 INL 与 ONL 之间分界线不清晰 RPE:视网膜色素上皮;IPL:内丛状层;INL:内核层;ONL:外核层;GCL:神经节细胞层

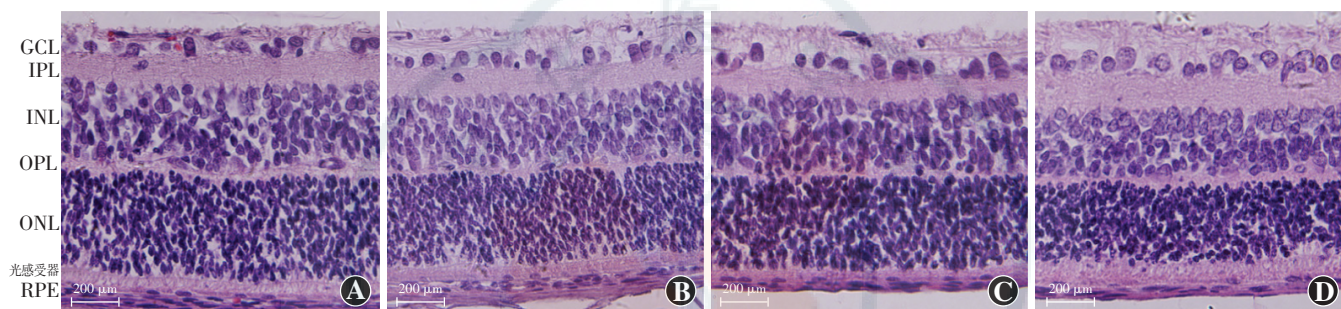


图 3 各组出生后 10 d 幼鼠视网膜形态学的比较(HE 标尺=200 μm) 幼鼠 OPL 分化形成,开始出现光感受器层 A:正常对照组 B:LP 组 C:CP 组 D:RP 组 RPE:视网膜色素上皮;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;GCL:神经节细胞层

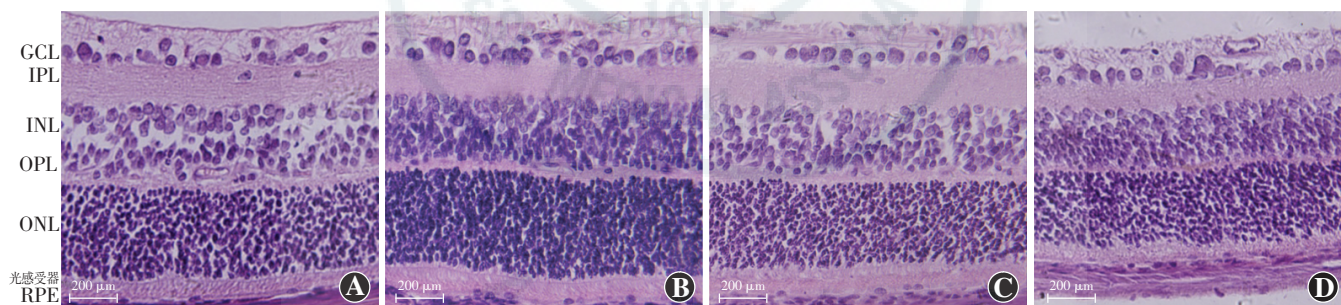


图 4 各组出生后 14 d 幼鼠视网膜形态学的比较(HE 标尺=200 μm) 幼鼠视网膜各层结构均已完全分化成熟,呈现典型的 10 层结构 A:正常对照组 B:LP 组 C:CP 组 D:RP 组 RPE:视网膜色素上皮;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;GCL:神经节细胞层

### 2.1.2 各组幼鼠视网膜细胞层数比较

幼鼠视网膜 NBL 层数分析结果显示,出生后 4 d 和 7 d,LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠视网膜 NBL 层数均多于正常对照组,差异均有统计学意义(LP 组: $t_{4d} = -7.07, P = 0.00; t_{7d} = -4.97, P = 0.00$ ;CP 组: $t_{4d} = -6.45, P = 0.00; t_{7d} = -3.61, P = 0.00$ ;RP 组: $t_{4d} = -6.38, P = 0.00; t_{7d} = -3.35, P = 0.00$ );出生后 10 d 和 14 d,LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠视网膜 INL 和 ONL 细胞层数与正常对照组相比差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )(表 1)。

表 1 出生后各组幼鼠视网膜各层细胞层数的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	出生后 4 d NBL	出生后 7 d NBL	出生后 10 d		出生后 14 d	
				INL	ONL	INL	ONL
正常对照组	6	20.55±1.05	14.88±1.47	9.00±1.42	9.67±1.21	8.57±1.05	12.81±0.47
LP 组	6	26.53±1.38 <sup>a</sup>	18.57±1.05 <sup>a</sup>	7.83±0.98	9.83±1.17	8.16±1.17	12.52±1.37
CP 组	6	28.33±1.51 <sup>a</sup>	17.55±1.05 <sup>a</sup>	8.50±1.05	10.60±1.63	7.83±0.98	12.10±1.47
RP 组	6	27.11±1.03 <sup>a</sup>	18.11±1.94 <sup>a</sup>	8.33±1.03	11.30±0.82	8.67±1.86	11.10±1.94

注:与各自的正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,Dunnett  $t$  检验) LP:细菌脂多糖诱导早产;CP:剖宫产诱导早产;RP:米非司酮诱导早产;NBL:神经母细胞层;INL:内核层;ONL:外核层

### 2.2 各组幼鼠 ERG 各波的动态改变

LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠出生后 14、21 和 28 d 的 Rod-b 波、Max-a、b 波、OPs、Cone-b 波、闪烁光的振幅

值与正常对照组比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ); 出生后 14 d, LP 组幼鼠 Max-a、b 波潜伏值较正常对照组幼鼠明显延长, 差异有统计学意义(Max-a 波:  $t = -3.94, P = 0.00$ ; Max-b 波:  $t = -3.31, P = 0.00$ ); CP 组幼鼠 Rod-b 波、Max-b 波和 Cone-b 波潜伏值较正常对照组幼鼠明显延长, 差异有统计学意义(Rod-b 波:  $t = -2.42, P = 0.01$ ; Max-b 波:  $t = -2.61, P = 0.02$ ; Cone-b 波:  $t = -2.16, P = 0.01$ ); RP 组幼鼠 Max-b 波潜

伏值较正常对照组幼鼠明显延长, 差异有统计学意义(Max-b 波:  $t = -3.67, P = 0.00$ )。出生后 21 d, LP 组幼鼠 Max-a 波和 Max-b 波潜伏值较正常对照组幼鼠明显延长, 差异有统计学意义(Max-a 波:  $t = -3.18, P = 0.00$ ; Max-b 波:  $t = -3.45, P = 0.00$ ); 出生后 28 d, LP 组幼鼠 Max-b 波潜伏值较对照组幼鼠明显延长, 差异有统计学意义(Max-b 波:  $t = -3.61, P = 0.00$ ) (表 2~7)。

表 2 出生后 14 d 各组幼鼠 ERG 各波振幅值 ( $\bar{x} \pm s, \mu V$ )

组别	样本量	Rod-b 波	Max		$\Sigma$ OPs	Cone-b 波	闪烁光反应
			a 波	b 波			
正常对照组	10	28.06±6.38	39.57±6.51	56.06±5.16	13.56±2.90	8.83±1.41	1.85±1.02
LP 组	11	29.08±3.37	43.76±3.56	53.51±5.23	13.15±2.79	8.90±1.99	1.98±0.67
CP 组	11	27.16±1.07	41.36±4.03	56.64±5.78	12.63±2.90	9.56±2.56	1.69±0.32
RP 组	10	25.01±4.56	42.39±6.47	55.69±2.67	14.23±3.18	9.82±1.52	1.59±0.94

注: (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) LP: 细菌脂多糖诱导早产; CP: 剖宫产诱导早产; RP: 米非司酮诱导早产; Rod: 杆体细胞反应; OPs: 振荡电位; Max: 最大混合反应; ERG: 视网膜电图; Cone: 锥体细胞反应

表 4 出生后 21 d 幼鼠 ERG 各波振幅 ( $\bar{x} \pm s, \mu V$ )

组别	样本量	Cone-b 波	Max		$\Sigma$ OPs	Cone-b 波	闪烁光反应
			a 波	b 波			
正常对照组	10	214.40±21.34	208.40±25.34	447.01±43.21	129.07±12.70	93.01±5.67	48.24±4.23
LP 组	11	218.64±20.65	216.36±14.93 <sup>a</sup>	445.36±59.87 <sup>a</sup>	127.70±9.98	94.19±10.64	50.28±4.23
CP 组	11	206.89±32.17	207.44±23.45	425.00±54.12	132.61±21.52	91.69±11.82	49.79±4.54
RP 组	10	210.58±21.45	204.76±16.34	451.36±35.34	135.47±12.09	95.03±7.09	50.49±5.75

注: (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) LP: 细菌脂多糖诱导早产; CP: 剖宫产诱导早产; RP: 米非司酮诱导早产; Rod: 杆体细胞反应; OPs: 振荡电位; Max: 最大混合反应; Cone: 锥体细胞反应; ERG: 视网膜电图

表 6 出生后 28 d 幼鼠 ERG 各波振幅值 ( $\bar{x} \pm s, \mu V$ )

组别	样本量	Rod-b 波	Max		$\Sigma$ OPs	Cone-b 波	闪烁光反应
			a 波	b 波			
正常对照组	10	333.13±23.45	252.11±16.34	542.40±34.33	151.50±9.87	96.18±6.56	54.23±3.45
LP 组	11	343.72±10.67	274.82±12.34	535.64±45.23	162.27±9.42	100.53±10.79	58.02±8.83
CP 组	11	346.25±20.45	267.89±24.23	557.22±53.37	156.67±12.53	98.59±9.65	60.28±4.59
RP 组	10	339.00±20.69	263.48±15.52	550.80±47.25	165.20±16.83	91.72±10.69	59.32±7.55

注: (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) LP: 细菌脂多糖诱导早产; CP: 剖宫产诱导早产; RP: 米非司酮诱导早产; Rod: 杆体细胞反应; OPs: 振荡电位; Max: 最大混合反应; Cone: 锥体细胞反应; ERG: 视网膜电图

表 3 出生后 14 d 幼鼠 ERG 各波潜伏值 ( $\bar{x} \pm s, ms$ )

组别	样本量	Rod-b 波	Max		Cone-b 波
			a 波	b 波	
正常对照组	10	123.60±9.62	20.70±2.87	80.30±9.77	61.90±7.58
LP 组	11	133.64±12.41	26.91±2.91 <sup>a</sup>	97.27±10.26 <sup>b</sup>	71.73±5.67
CP 组	11	135.22±11.10 <sup>a</sup>	20.44±1.92	91.89±9.16 <sup>b</sup>	74.22±5.89 <sup>a</sup>
RP 组	10	127.10±13.17	23.30±2.13	96.20±9.76 <sup>a</sup>	67.40±4.34

注: 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) LP: 细菌脂多糖诱导早产; CP: 剖宫产诱导早产; RP: 米非司酮诱导早产; Rod: 杆体细胞反应; OPs: 振荡电位; Max: 最大混合反应; Cone: 锥体细胞反应; ERG: 视网膜电图

表 5 出生后 21 d 幼鼠 ERG 各波潜伏值 ( $\bar{x} \pm s, ms$ )

组别	样本量	Rod-b 波	Max		Cone-b 波
			a 波	b 波	
正常对照组	10	73.64±5.62	14.52±2.01	66.10±3.70	53.50±3.56
LP 组	11	75.82±7.40	18.36±3.32 <sup>a</sup>	77.09±7.54 <sup>a</sup>	58.27±8.93
CP 组	11	69.56±7.21	12.89±1.45	65.55±3.81	54.11±4.96
RP 组	10	74.75±6.32	15.22±2.82	69.20±4.29	55.78±5.49

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) LP: 细菌脂多糖诱导早产; CP: 剖宫产诱导早产; RP: 米非司酮诱导早产; Rod: 杆体细胞反应; OPs: 振荡电位; Max: 最大混合反应; Cone: 锥体细胞反应; ERG: 视网膜电图

表 7 出生后 28 d 幼鼠 ERG 各波潜伏值 ( $\bar{x} \pm s, ms$ )

组别	样本量	Rod-b 波	Max		Cone-b 波
			a 波	b 波	
正常对照组	10	67.37±3.37	12.88±1.03	58.10±3.21	47.50±2.01
LP 组	11	65.45±8.21	13.09±1.65	71.09±4.53 <sup>a</sup>	49.18±6.58
CP 组	11	62.33±8.55	13.56±2.29	60.89±8.83	53.67±6.34
RP 组	10	70.44±11.05	11.51±2.01	65.17±3.58	44.65±5.35

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) LP: 细菌脂多糖诱导早产; CP: 剖宫产诱导早产; RP: 米非司酮诱导早产; Rod: 杆体细胞反应; OPs: 振荡电位; Max: 最大混合反应; Cone: 锥体细胞反应; ERG: 视网膜电图

### 3 讨论

早产容易导致严重的新生儿疾病。循证医学证据表明, 早产是新生儿支气管发育不良、婴儿脑性瘫痪和

早产儿视网膜病变的根本原因<sup>[13-15]</sup>。本研究组先前的研究将早产这一危险因素引入, 采用 LP、CP 及 RP 等方式建立早产鼠模型, 发现早产对幼鼠的体质量增长及视网膜血管发育产生影响<sup>[8]</sup>。



鼠类视网膜的发育分为 2 个阶段,即胚胎期发育阶段和出生后发育期,其出生后发育过程中随着生长发育视网膜 INL、ONL 细胞层数逐渐减少,而神经纤维层持续发育或加快发育速度<sup>[16]</sup>。本研究中发现,出生后 4 d 的 LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠视网膜由 RPE、GCL、NBL 和 IPL 组成,出生后 7 d 的 NBL 分化出 INL 和 ONL,且 OPL 开始发育。LP 组、CP 组和 RP 组幼鼠 NBL 向 INL、ONL 的分化过程较正常出生的同龄幼鼠延迟,且 OPL 发育较晚;各组出生后 10 d 的小鼠 INL 和 ONL 间已形成纤维间隙,OPL 已形成,感光细胞出现分化;到生后 14 d 时,4 个组幼鼠视网膜分化成熟,呈现典型的视网膜 10 层结构。本研究中还显示,出生后 4 d 和 7 d,3 个早产模型组幼鼠 NBL 层数均较正常对照组幼鼠多,而出生后 10 d 和 14 d,其 INL 和 ONL 的细胞层数与正常对照组幼鼠比较差异无统计学意义。本研究中选择在胚胎 19 d 进行干预建立早产模型,此时正常胎鼠视网膜内、外神经细胞层之间开始出现淡染的 Chievitz 层,该层在胚胎 20 d 时变宽,形成 IPL<sup>[17]</sup>。早产模型鼠神经视网膜在出生时发育较正常鼠不成熟,在生后早期 NBL 向 INL 和 ONL 以及 OPL 的分化过程均滞后于正常鼠,但本研究中早产幼鼠神经视网膜的发育最终与正常幼鼠一致,可能与本研究中幼鼠营养供给充分且避免其他危险因素干预有关。

本研究中还利用 ERG 对早产模型鼠的视网膜功能进行动态研究,发现 3 种方法诱导的早产幼鼠出生后 28 d 内 Rod-b 波、Max-a 波、Max-b 波、OPs、Cone-b 波和闪烁光 ERG 的振幅值逐渐增高,潜伏值逐渐缩短,与正常幼鼠发育趋势一致,但组间比较发现出生后 14、21 和 28 d,3 个早产组间幼鼠 ERG 各波振幅与正常对照组比较未见明显差异,出生后 14 d CP 组幼鼠 Rod-b 波、Max-b 波和 Cone-b 波潜伏值以及 RP 组幼鼠 Max-b 波潜伏值均较正常对照组明显延长。大鼠生后视觉系统发育可塑性的关键时期是出生后 5~30 d,此期内视网膜神经元和突触受到外界环境如光线、图形等刺激后逐步完善和调节其结构,因此推测早产幼鼠视网膜光感受器以及神经突触发育程度较正常幼鼠低,对光刺激的反应经历的时间较长。本研究中显示,出生后 21 d 和 28 d CP 组和 RP 组幼鼠 ERG 各波潜伏值与正常对照组的差异无统计学意义,提示早产幼鼠视网膜光感受器及神经突触的发育程度已接近正常幼鼠。LP 组出生后 14 d 和 21 d 的幼鼠 Max-a、Max-b 波潜伏值较正常幼鼠明显延长,至出生后 28 d 时,其 Max-b 波潜伏值仍延长。已有研究显示,雌鼠孕晚期 LP 新生鼠脑部组织中白细胞介素-1、白细胞介素-6 和

肿瘤坏死因子- $\alpha$  等炎性因子及氧自由基表达增强,引起幼鼠脑神经细胞凋亡,导致成年鼠海马神经元数量显著减少,神经电生理显示海马区长时程增强明显<sup>[18-20]</sup>。体外研究证实,LPS 可增加视网膜中前炎性因子,刺激胶质细胞和 RPE 细胞引起炎症应答和激活细胞凋亡信号<sup>[21-22]</sup>。据此推测,LP 组幼鼠 Max-a、Max-b 波潜伏值较长可能与早产后视网膜光感受器和神经突触的发育程度较低及 LPS 毒性有关。LPS 刺激母鼠产生的炎性因子、活性氧自由基等通过胎盘屏障进入胎鼠体内,引起光感受器功能异常,其具体机制需进一步研究证实。LPS 的毒性呈剂量依赖性,本研究中所用剂量较小且未直接干预幼鼠,可能并未引起感光细胞变性,仅 HE 组织切片尚无法判断感光细胞是否变性。

临床研究证实早产儿出生后视网膜的发育规律有别于正常新生儿,其各层细胞和视网膜功能都存在异常<sup>[23-25]</sup>。Maldonado 等<sup>[26]</sup>观察到早产儿出生时黄斑中心凹较足月儿增厚,视网膜内层持续存在,光感受器层较薄,也有研究证实 58% 的早产儿存在黄斑囊样水肿,对中心凹的发育产生影响<sup>[27]</sup>。研究认为,早产儿至少在出生后 6 个月内视觉发育滞后,在生后不同时期的视觉诱发电位都较相同年龄足月儿低,ERG Rod-b、Max-a 和 Max-b 波潜伏值延长,而振幅降低<sup>[23,28-29]</sup>。本研究中显示,早产幼鼠在生后早期神经视网膜发育较迟缓,视网膜功能存在异常,更适合研究与早产相关的视网膜发育异常相关疾病。

综上所述,早产幼鼠出生后早期神经视网膜分化迟缓,视网膜光感受器及神经突触发育程度较低。LPS 对视网膜功能有一定影响,且主要影响光感受器细胞。

志谢 感谢德国洪堡基金会为本研究提供仪器设备和研究资金(Y. S. W;V8151/02085)

## 参考文献

- [1] Birnholz JC. Ultrasonic fetal ophthalmology[J]. Early Hum Dev, 1985, 12(2): 199-209.
- [2] Leaf A, Gosbell A, McKenzie L, et al. Long chain polyunsaturated fatty acids and visual function in preterm infants[J]. Early Hum Dev, 1996, 45(1-2): 35-53.
- [3] Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, et al. Increased dietary intake of  $\omega$ -3- polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis[J]. Nat Med, 2007, 13(7): 868-873. DOI: 10. 1038/nm1591.
- [4] Repka MX. Ophthalmological problems of the preterm infant[J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002, 8(4): 249-257.
- [5] Ozdemir M, Koylu S. Ocular growth and morbidity in preterm children without retinopathy of prematurity[J]. Jpn J Ophthalmol, 2009, 53(6): 623-628. DOI: 10. 1007/s10384-009-0744-x.
- [6] Modrzejewska M, Grzesiak W, Karczewicz D, et al. Refractive status and ocular axial length in preterm infants without retinopathy of pre maturity with regard to birth weight and gestational age[J]. J Perinat Med,

- 2010,38(3):327-331. DOI:10.1515/JPM.2010.018.
- [7] Friling R, Weinberger D, Kremer I, et al. Keratometry measurements in preterm and full term newborn infants[J]. Br J Ophthalmol, 2004, 88(1):8-10. DOI:10.1136/bjo.88.1.8.
- [8] 杨湘敏, 李蓉, 王雨生, 等. 早产对大鼠视网膜血管形态发育的影响[J]. 中华眼科杂志, 2013, 49(8):729-735. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.08.012.
- Yang XM, Li R, Wang YS, et al. Effect of premature birth on retinal vascular development in the neonatal rat[J]. Chin J Ophthalmol, 2013, 49(8):729-735. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.08.012.
- [9] Celik H, Ayar A. Effects of erythromycin on pregnancy duration and birth weight in lipopolysaccharide-induced preterm labor in pregnant rats[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002, 103(1):22-25.
- [10] Potvin WS, Mulay DR, Varma DR. Inhibition of the tocolytic activity of atrial natriuretic factor by progesterone and potentiation by progesterone receptor antagonist RU486 in rats[J]. Br J Pharmacol, 1991, 104(2):379-384. DOI:10.1111/j.1476-5381.1991.tb12439.x.
- [11] Chen Y, Whitney PL, Frank L. Comparative responses of premature versus full-term newborn rats to prolonged hyperoxia[J]. Pediatr Res, 1994, 35(2):233-237. DOI:10.1203/00006450-199402000-00023.
- [12] 张作明, 顾永昊, 郭群, 等. 小鼠与大鼠视网膜电图和闪光视觉诱发电位记录标准化方案建议[J]. 眼科新进展, 2004, 24(2):81-83. DOI:10.3969/j.issn.1003-5141.2004.02.001.
- Zhang ZM, Gu YH, Guo Q, et al. Guideline for visual electrophysiological testing experiment in mice and rat[J]. Recent Adv Ophthalmol, 2004, 24(2):81-83. DOI:10.3969/j.issn.1003-5141.2004.02.001.
- [13] Marlow N, Wolke D, Bracewell MA, et al. Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth[J]. N Engl J Med, 2005, 352(1):9-19. DOI:10.1056/NEJMoa041367.
- [14] Landry JS, Menzies D. Occurrence and severity of bronchopulmonary dysplasia and respiratory distress syndrome after a preterm birth[J]. Paediatr Child Health, 2011, 16(7):399-403.
- [15] Allegaert K, Vanhole C, Casteels I, et al. Perinatal growth characteristics and associated risk of developing threshold retinopathy of prematurity[J]. J Aapos, 2003, 7(1):34-37.
- [16] Langford K, Nicolaidis K, Miell JP. Maternal and fetal insulin-like growth factors and their binding proteins in the second and third trimesters of human pregnancy[J]. Hum Reprod, 1998, 13(5):1389-1393. DOI:10.1093/humrep/13.5.1389.
- [17] 孟旭霞, 牛膺筠, 张燕. 大鼠视网膜发育的形态学变化[J]. 解剖学杂志, 2009, 32(4):551-553. DOI:10.3969/j.issn.1001-1633.2009.04.036.
- [18] Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, et al. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats[J]. Pediatric Research, 2006, 59(3):428-433. DOI:10.1203/01.pdr.0000199905.08848.55.
- [19] Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, et al. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration[J]. J Neurosci, 2005, 25(40):9275-9284.
- [20] Lanté F, Johann M, Janique G, et al. Neurodevelopmental damage after prenatal infection: Role of oxidative stress in the fetal brain[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(8):1231-1245. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.027.
- [21] Leung KW, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling[J]. Molecular Immunology, 2009, 46(7):1374-1386. DOI:10.1016/j.molimm.2008.12.001.
- [22] Balasubramaniam B, Carter DA, Mayer EJ, et al. Microglia derived IL-6 suppresses neurosphere generation from adult human retinal cell suspensions[J]. Experimental Eye Research, 2009, 89(5):757-766. DOI:10.1016/j.exer.2009.06.019.
- [23] Ecsedy M, Varsányi B, Szigeti A, et al. Cone function in children with a history of preterm birth[J]. Doc Ophthalmol, 2011, 122(3):141-148. DOI:10.1007/s10633-011-9268-z.
- [24] Zhou X, Huang X, Chen H, et al. Comparison of electroretinogram between healthy preterm and term infants[J]. Doc Ophthalmol, 2010, 121(3):205-213. DOI:10.1007/s10633-010-9248-8.
- [25] Rubin LP, Chan GM, Barrett-Reis BM, et al. Effect of carotenoid supplementation on plasma carotenoids, inflammation and visual development in preterm infants[J]. J Perinatol, 2012, 32(6):418-424. DOI:10.1038/jp.2011.87.
- [26] Maldonado RS, O'Connell RV, Sarin N, et al. Dynamics of human foveal development after premature birth[J]. Ophthalmology, 2011, 118(12):2313-2314. DOI:10.1016/j.ophtha.2011.05.028.
- [27] Verma M, Chhatwal J, Jaison S, et al. Refractive errors in preterm babies[J]. Indian Pediatr, 1994, 31(10):1183-1186.
- [28] Spierer A, Royzman Z, Kuint J. Visual acuity in premature infants[J]. Ophthalmology, 2004, 111(6):397-401. DOI:10.1159/000080943.
- [29] Birch EE, O'Connor AR. Preterm birth and visual development[J]. Semin Neonatol, 2001, 6(6):487-497.

(收稿日期:2015-11-23)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

读者·作者·编者

## 本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再版的稿件,如2个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过Email发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者须认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外,作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期2个月不修回者,视作自行撤稿。

作者投稿请勿一稿两投或多投。本刊编辑部发现一稿两投并经证实后稿件将不予审理并对作者进行告知。如果发现一稿两用,本刊将做出如下处理:(1)在本刊杂志及网站上刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明,并在中华医学会系列杂志中通报。(2)向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。(3)2年内拒绝发表其作为第一作者或通信作者的任何来稿。

(本刊编辑部)