DOI:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2017.433

标准化家猫外伤性视神经损伤动物模型的建立

李俊义[1],李秀梅[2],万京明[1],毕京玉[1],刘娟[1],徐华林[1],姜彦[3],李娜[3]
(1.山东省莱芜市人民医院耳鼻咽喉科, 山东 莱芜 271100; 2.山东省单县中医院, 山东 单县 274300; 3.青岛大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 山东 青岛 266003)

摘要:目的 利用统一标准的视神经夹在相同钳夹时间下对家猫视神经进行损伤实验,观察视神经部分损伤后家猫的闪光视觉诱发电位的变化,建立标准化的外伤性视神经损伤家猫动物模型。**方法** 共有 10 只健康的成年家猫,每只家猫的右眼为实验眼(视神经损伤),左眼为对照眼(正常)。家猫的右眼损伤眼均以统一标准的视神经夹钳夹视神经 30 s,制成家猫视神经部分损伤模型。在实验眼损伤后 1 h、3 d、1 周、2 周、4 周时分别进行实验眼和对照眼的闪光视觉诱发电位检查,记录主波 P100 的波峰潜时和波幅,并进行统计学分析。**结果** 所有家猫正常对照眼的闪光视觉诱发电位的波形稳定,随时间延长均无明显变化。损伤前实验组与对照组主波 P100 的波峰潜时、波幅两组比较差异无统计学意义($F=1.48$, $P=0.19$; $F=1.63$, $P=0.15$);实验组中损伤后 1 h 分别与损伤后 3 d、1 周、2 周、4 周各组间波峰潜时及波幅比较差异均具有统计学意义($F=7.38$, $P=0.008\,7$; $F=4.38$, $P=0.027$);损伤后 3 d 与损伤后 1 周、2 周、4 周各组间波峰潜时及波幅比较差异均具有统计学意义($F=6.49$, $P=0.019$; $F=3.97$, $P=0.036$);损伤后 1 周与损伤后 2 周、4 周各组间波峰潜时及波幅比较差异均具有统计学意义($F=6.02$, $P=0.011$; $F=3.37$, $P=0.041$)。损伤后 2 周内 P100 波峰潜时逐渐延长,波幅逐渐降低,2 周以后趋于稳定,损伤后 2 周与损伤后 4 周两组间比较差异无统计学意义($F=2.24$, $P=0.11$; $F=2.01$, $P=0.12$)。**结论** 应用统一标准的的视神经夹可以成功建立标准化的外伤性视神经损伤家猫动物模型。闪光视觉诱发电位检查是确定标准化家猫外伤性视神经损伤动物模型建立成功与否的客观评价指标,成功的视神经损伤家猫动物模型表现为闪光视觉诱发电位主波 P100 的波峰潜时延长及波幅降低。

关键词:视神经损伤;钳夹;模型;闪光视觉诱发电位
中图分类号:R774.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-3770(2018)04-0043-05

引用格式:李俊义,李秀梅,万京明,等.标准化家猫外伤性视神经损伤动物模型的建立[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2018,32(4):43-47. LI Junyi, LI Xiumei, WAN Jingming, et al. Establishment of a standardized model of traumatic optic neuropathy in cats[J]. J Otolaryngol Ophthalmol Shandong Univ, 2018,32(4):43-47.

Establishment of a standardized model of traumatic optic neuropathy in cats

LI Junyi[1], LI Xiumei[2], WAN Jingming[1], BI Jingyu[1], LIU Juan[1], XU Hualin[1], JIANG Yan[3], LI Na[3]
1. Department of Otorhinolaryngology, People's Hospital of Laiwu City, Laiwu 271100, Shandong, China; 2. Shanxian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanxian 274300, Shandong, China; 3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong, China

Abstract: Objective To establish a standardized model of traumatic optic neuropathy in cats by using a standard clip and to simultaneously observe the changes in flash visual-evoked potential. **Methods** Ten adult healthy cats were enrolled in the study. The right eye was identified as the experimental eye; and the left eye, as the control eye. The optic nerves of the right eyes were clamped for 30 seconds to establish traumatic optic nerve injury models. The flash visual-evoked potential in was recorded in all experimental and control eyes at 1 hour, 3 days, 1 week, 2 weeks, and 4 weeks after injury. The peak latency and amplitude of the main wave P100 were recorded, and a statistical analysis was performed. **Results** The flash visual evoked potential peak latency and amplitudes of the main wave P100 were no significant differences before operation, but there were significant differences after traumatic optic neuropathy between the two groups ($P<0.05$). The flash visual evoked potential peak latency and amplitudes of the main wave P100 were no significant differences before operation($F=1.48$, $P=0.19$; $F=1.63$, $P=0.15$). In the experimental group, there were statistically significant differences between the 1 hour after injury and 3 days, 1 week, 2 weeks, and 4 weeks after the injury ($F=7.38$, $P=0.008\,7$; $F=4.38$, $P=0.027$). There were statistically significant differences between 3 days after the injury and 1 week, 2 weeks and 4 weeks after the injury($F=6.49$, $P=0.019$; $F=3.97$, $P=0.036$). There were statistically significant differences between 1 week after the injury and 2 weeks and 4 weeks after the injury($F=6.02$, $P=0.011$; $F=3.37$, $P=0.041$).The peak latency of P100 was gradually extended, and the amplitude gradually decreased in the 2 weeks after the injury. After 2 weeks, it tended to

收稿日期:2017-10-10; **修回日期:**2018-02-01
第一作者:李俊义。E-mail:lijyent@163.com

be stable. There was no statistically significant difference between the two groups after 2 weeks and 4 weeks after the injury (F=2.24, P=0.11; F=2.01, P=0.12). **Conclusion** The standardized cat model of traumatic optic neuropathy was successfully established by using the same clamp. The flash visual-evoked potential examination is the objective evaluation tool. The flash visual-evoked potential peak latency of the main wave P100 was significantly prolonged with a decreased amplitude, in the standardized cat model of traumatic optic neuropathy.

Key words: Optic nerve injury; Clamp; Model; Flash visual evoked potential

外伤性视神经病(traumatic optic neuropathy, TON)是一种潜在的、严重的致盲性疾病,临床研究中由于难以直接获得人类损伤后的眼球和视神经,建立临床容易操作、可以量化、稳定性强、可重复性的视神经损伤动物模型是进行实验研究的基础和前提,也是外伤性视神经病进一步深入研究所面临的重要课题之一。建立标准化的视神经损伤动物模型并进行实验研究,对于研究外伤性视神经病并寻求有效的治疗方法具有重要意义。视觉诱发电位是目前公认的检验视神经功能的一种客观而敏感的电生理指标[1-4]。本研究采用夹持力为 40 g 的视神经夹在相同钳夹时间下对正常家猫视神经进行钳夹损伤,建立一种稳定的家猫视神经损伤模型,使用闪光视觉诱发电位检测技术,观察损伤对视神经造成的影响,研究模型在损伤后不同时期 F-VEP 的变化规律,以确立外伤性视神经损伤家猫模型的成功建立,为进一步研究视神经损伤后的修复机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 共有 10 只健康 12 个月龄的家猫,体质量 1.5~2.0 kg,均为雌性,由青岛大学附属医院实验动物中心提供。实验前采用 10%水合氯醛(15 mg/kg)和 5%氯胺酮(30 mg/kg)腹腔注射麻醉动物,外眼及眼底检查均无病变者纳入实验。动物在笼中饲养,自由摄食饮水,饲料为家猫颗粒料,24 ℃环境,相对湿度 55%~70%,12 h 明暗周期。适应性喂养 1 周后分为实验组和对照组。实验组包括所有家猫的右眼(实验眼,即视神经损伤眼),对照组包括所有家猫的左眼(正常眼),其中有眼部疾患和异常的瞳孔对光反射的动物被淘汰。

1.2 方法

1.2.1 家猫视神经损伤模型的建立 猫的麻醉采用腹腔注射 10%水合氯醛(15 mg/kg 体质量)和 5%氯胺酮(30 mg/kg 体质量)。选用经内眦结膜切口路径,分离筋膜,暴露视神经。找到视神经后,在眼眶内部眼球后 2~3 mm 处,用夹持力为 40 g 的视神经夹钳夹 30 s 的方法造成视神经损伤。由于眼动脉的分支视网膜中央动脉位于此处,操作时一定要注意血管的保护。术后分层缝合伤口。术后将阿莫西林以 1 g 阿莫西林配 5 kg 猫饲料比例拌入猫饲料喂饲实验家猫,连用 3~5 d 避免感染。

1.2.2 F-VEP 记录方法及刺激参数 应用美国 Nico1et 公司生产的多功能电生理诊断仪作为描记系统。采用全视野刺激器闪光刺激,闪光亮度为 5 cd(s/m^{-2}),白光刺激,记录瞬态反应所需单次闪光间隔时间为 1 s,记录时间 250 ms,叠加 100 次。电极为银针电极直接刺入对应位置皮下,作用电极在枕骨隆凸上 3 mm,参考电极在双眼连线中点上方的前额部,接地电极置于同侧耳郭,所有电极的阻抗均小于 5 kΩ。检查一眼时,用自制遮光眼罩完全遮盖对侧眼。观测指标选用 F-VEP P100 波的空间频率阈值。每只眼记录稳定 P100 波 3 次的峰潜时及波幅,取 3 次平均值作为实验值。记录全部家猫损伤前的 F-VEP, 建立家猫 F-VEP P100 波峰潜时和波幅的正常测量值范围。分别记录损伤后 1 h、3 d、1 周、2 周、4 周时家猫双眼 F-VEP P100 波峰潜时和波幅。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件,实验测试指标的数据资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验组和对照组不同时间点 P100 波峰潜时和波幅采用配对设计的重复测量资料的方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

对照组中所有家猫左眼的 F-VEP P100 的波形相对稳定。实验组中所有家猫右眼的 F-VEP P100 的峰潜时较对照组明显延长,波幅明显降低。P100 波峰潜时在损伤前实验组与对照组比较差异无统计学意义(F=1.48, P=0.19)。P100 波幅在损伤前实验组与对照组比较差异无统计学意义(F=1.63, P=0.15)。实验组中损伤后 1 h 与损伤后 3 d、1 周、2 周、4 周各组间波峰潜时及波幅比较差异均具有统计学意义(F=7.38, P=0.008 7; F=4.38, P=0.027);损伤后 3 d 与损伤后 1 周、2 周、4 周各组间波峰潜时及波幅比较差异均具有统计学意义(F=6.49, P=0.019; F=3.97, P=0.036);损伤后 1 周与损伤后 2 周、4 周各组间波峰潜时及波幅比较差异均具有统计学意义(F=6.02, P=0.011; F=3.37, P=0.041)。损伤后 2 周内 P100 波峰潜时逐渐延

长,波幅逐渐降低,2 周以后趋于稳定,损伤后 2 周与损伤后 4 周两组间比较差异无统计学意义(F=2.24, P=0.11; F=2.01, P=0.12)。具体数据见表 1。

表 1 损伤前后实验组与对照组 P100 波峰潜时和波幅变化比较($\bar{x}\pm s$, n=10)

Tab.1 Comparison of P100 wave latency and amplitude between experimental group and control group before and after injury($\bar{x}\pm s$, n=10)

时间	实验组		对照组	
	波峰潜时(ms)	波幅(μV)	波峰潜时(ms)	波幅(μV)
损伤前	42.25±3.90	12.12±2.05	41.85±4.10	11.95±2.10
损伤后 1 h	57.85±3.55	7.15±1.34	42.05±3.55	11.75±1.90
损伤后 3 d	66.25±3.40	6.55±1.15	42.95±4.05	12.15±2.20
损伤后 1 周	78.75±3.40	5.35±1.01	43.00±3.70	12.28±1.80
损伤后 2 周	88.85±3.60	4.15±0.95	40.85±3.85	11.95±1.80
损伤后 4 周	89.05±3.70	4.11±0.90	41.05±3.30	11.90±2.15

3 讨 论

为了更加深入地了解视神经损伤发生的机制,探索有效的治疗方法和手段,在科研实验工作中建立趋于标准化的动物模型是实验的关键部分之一[5]。动物实验是生命科学研究中的非常重要手段,没有标准化的动物模型,实验的结果结论就容易发生偏差。理想的视神经损伤模型应具备以下特点:模拟的损伤与人类 TON 近似或者接近于临床受伤状态;动物成模率高而致死率低;操作容易重复;损伤程度容易量化。视神经损伤的动物模型主要包括视神经撞击伤、横断伤、牵拉伤、夹持伤等。撞击伤模型的优点是外伤性视神经损伤特点与临床比较吻合,缺点是由于人和动物在解剖结构上差异较大,很难模拟 TON,并且造模复杂,动物致死率高。横断伤模型优点是操作简便,致伤量统一,缺点是该模型造成了神经轴突完全离断,影响了视网膜血供,导致了后续研究的局限性。牵拉伤模型优点是保持了视神经外膜的完整性,便于后续治疗研究观察,缺点是缺乏量化及统一致伤标准,影响研究的可信性。夹持伤模型损伤夹力可以统一并量化,成模率高,是目前实验研究中应用较广泛的方法。根据视神经损伤的方法部位,视神经损伤动物模型大体分为两类:间接性视神经损伤动物模型和直接性视神经损伤动物模型。但由于它们各自的局限性,目前还不能完全成为满意的视神经损伤模型。间接性视神经损伤模型很难完全模拟人类临床上的间接性视神经损伤,成功率比较低,稳定性不强而且很难对损伤部位及程度进行精确量化。直接性视神经损伤模型可在直视下观察并精确视神经损伤部位,一次性的夹闭力稳定的神经损伤夹,损伤的夹力便于量化,其视神经损伤模型与临床上视神经损伤接近[6],是当前研究视神经损伤实验中首选的动物模型之一。本实验中采用夹持力为 40 g 的视神经夹在相同钳夹时间下对正常家猫视神经进行钳夹损伤建立视神经损伤模型就是采用了直接性视神经损伤造模的方法。其优点是建立动物模型设计简单,容易操作,夹伤部位在视交叉前的视神经的眶内段,保持了视神经外膜的完整性,造成的视神经损伤模型比较准确[7]。

临床研究中由于难以直接获得人类损伤后的眼球和视神经,因此在实验动物选择方面,选择和人类眼球及视神经解剖结构相似的动物模型进行试验研究是进一步深入研究人类外伤性视神经病的基础。目前多常选用大鼠、小鼠及兔类动物作为实验动物模型,但有学者观察到这些实验动物不具有视神经管结构,与人类视神经解剖存在明显差异,这些差异的存在对研究人类视神经损伤的相关治疗途径或方式会造成一定的误差。家猫、猴子、猩猩与人类的眼球位置大致相似,两眼球都基本处于同一平面,但猴子、猩猩的研究涉及成本较高及相关法律问题,不适于批量研究。有学者对家猫鼻腔、鼻窦及视神经的毗邻结构进行解剖,观察到家猫有类似于人类的解剖特征[1],二者具有大致相同的双眼视觉机制。家猫具有的以上优点是本课题选择其作为视神经损伤动物实验模型的重要原因。

在实验中,动物由于没有相应主观感觉的沟通表达能力,实验动物的视功能无法应用视力表、同视机等主观检查手段进行检测,如何评价实验动物视神经损伤前后或治疗前后的视功能也是动物实验研究的重要研究内容之一。视觉诱发电位已成为当前在实验动物活体上进行客观定性视功能检测的重要辅助检查手段。视觉诱发电位的波形变化,反映的是视网膜神经节细胞到视皮质中枢的视觉障碍程度或信息传递程度,是对视觉神经传导通路过程中时间和空间处理特性的具体反应。当前视觉诱发电位检查已被广泛用于基础实验研究、临床诊疗评判以

及司法伪盲鉴定等方面[8-11],是一种客观的、公认的视觉功能评价技术。视觉诱发电位检查能通过记录波形峰潜时、波幅的改变,为视神经损伤的早期诊断提供真实客观指标[12-13],检测中将波峰潜时、波幅两个指标结合起来评估视功能仍然是必要的[14],这也是本课题检测记录 F-VEP 主波 Pl00 峰潜时和波幅变化的客观依据。F-VEP 主要用于评价视网膜至视皮层的神经冲动传导是否存在障碍,很少受心理因素的干扰,稳定性好。F-VEP 观察主要指标主波 Pl00 峰潜时的长短取决于视神经髓鞘的功能状态及完整性,波幅的高低主要与轴索的功能状态密切相关。神经冲动在正常视神经纤维中是以跳跃方式进行传导的,视神经损伤后其髓鞘变性脱落不完整,神经传导在脱髓鞘区变为以局部电流的连续方式进行。连续传导方式的神经冲动传导速度明显慢于跳跃传导方式的传导速度,出现波峰潜时延迟。视神经损伤后纤维受压水肿,轴索运载营养因子的功能和传达视觉信息的机能均随之下降,出现波幅降低。本实验中观察到对照组中所有家猫左眼的 F-VEP P100 的波形相对稳定。实验组中所有家猫右眼的 F-VEP P100 波的峰潜时较对照组明显延长,波幅明显降低。波峰潜时、波幅在损伤前实验组和对照组比较差异无统计学意义。损伤后 1 h、损伤后 3 d、损伤后 1 周、损伤后 2 周、损伤后 4 周实验组与伤前比较,以及与对照组相比均具有统计学意义。观察视神经损伤后的 F-VEP 主波 Pl00 峰潜时和波幅变化过程,可以发现主波 Pl00 的变化趋势亦随时间而变化,损伤后 2 周内随着时间的延长 P100 波峰潜时逐渐延长,波幅逐渐降低,2 周以后趋于稳定,损伤后 2 周与损伤后 4 周两组间比较差异无统计学意义 。以上实验数据说明应用统一标准的视神经夹建立标准化的外伤性视神经损伤家猫动物模型的方法是可行的。此数据同时提示本实验方法造成的视神经损伤在损伤 2 周后病情基本趋于稳定。

本实验中采用经内眦结膜切口路径暴露视神经,在眶内部眼球后 2~3 mm 处,用夹持力为 40 g 的视神经夹钳夹 30 s 的方法造成视神经损伤,同时采用 F-VEP 检查作为模型成功与否的判断标准,观察了伤后 1 h~4 周的实验组与对照组 F-VEP P100 波峰潜时和波幅的变化,进一步保证了实验动物损伤部位、程度的有效性和一致性。本研究通过对损伤前后家猫 F-VEP 的检测,观察到使用 40 g 的视神经夹钳夹视神经造成视神经损伤后 F-VEP 主波 P100 波峰潜时较损伤前延长、波幅较损伤前降低,这与临床上视神经外伤后电生理的变化特征相符[15-16]。采用相同钳夹时长并相同钳夹力量的视神经夹夹伤视神经建立外伤性视神经损伤动物模型,这样对视神经损伤程度基本可以达到精确定量,且对实验动物的创伤小,造模成功率高,得到的视神经损伤模型基本达到了损伤统一量化的标准化的损伤模型。说明该方法能够成功建立外伤性视神经损伤的动物模型,可以用于家猫外伤性视神经损伤模型的制作。该方法优点为能控制视神经损伤部位的基本一致,损伤力量的大小统一,损伤视神经的同时保持了神经的完整性,致伤设备简单,操作简便,重复性好,对操作者的依赖程度较小,容易在实验研究中获得稳定性强、可量化损伤程度的动物模型。

参考文献:

[1] 姜彦,李娜,张念凯,等.家猫外伤性视神经病的电生理及形态学观察[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,42(7):520-525.
JIANG Yan, LI Na, ZHANG Niankai, et al. Observation of neural electrophysiology and morphology in traumatic optic neuropathy in cat model[J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surgery, 2007, 42(7):520-525.

[2] 丁见,杨华,张念凯.猫视神经损伤减压手术模型的建立[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2009,23(3):75-77.
DING Jian, YANG Hua, ZHANG Niankai. Model establishment of optic nerve decompression surgery in cats[J]. J Otolaryngol Ophthalmol Shandong University, 2009, 23(3):75-77.

[3] 赵玲,冯秀艳.视觉诱发电位在外伤性视神经病治疗中的临床应用[J].中华眼外伤职业眼病杂志,2012,34(1):51-53.
ZHAO Ling, FENG Xiuyan. VEP clinical application in the treatment of traumatic optic neuropathy[J]. Chin J Ocular Trauma Occupational Eye Dis, 2012, 34(1):51-53.

[4] 周鑫.眼外伤后视力的视觉诱发电位评估[J].国际眼科杂志,2013,13(10):2068-2070.
ZHOU Xin. Evaluation of visual evoked potentials in post-trauma eyes[J]. Inter Eye Sci, 2013, 13(10):2068-2070.

[5] Tao W, Dvoriantchikova G, Tse BC, et al. A novel mouse model of traumatic optic neuropathy using external ultrasound energy to achieve focal, indirect optic nerve injury[J]. Sci Reports, 2017, 7(1):11779.

[6] 曹霞,姜晓璇,唐永赢,等.大鼠视神经钳夹伤模型的建立及磁共振成像运用初探[J].眼科新进展,2014,34(3):205-208.
CAO Xia, JIANG Xiaoxuan, TANG Yongying, et al. Establishment and pre-application of magnetic resonance im-

aging in rat optic nerve clamping injury model[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(3):205-208.

[7] 陈二涛,刘勇,冯东福,等.大鼠视神经部分损伤模型的建立[J].中华实验外科杂志,2008,25(11):1514-1516.
CHEN Ertao, LIU Yong, FENG Dongfu, et al. Development of experimental partial optic nerve injury model in rats[J]. Chin J Exp Surg, 2008, 25(11):1514-1516.

[8] 李林林,温晏,宫华青.图形视觉诱发电位在猫双眼视觉研究中的作用[J].国际眼科杂志,2013,13(5):865-868.
LI Linlin, WEN Yan, GONG Huaqing. The study of P-VEP on binocular vision in cats[J]. Inter Eye Sci, 2013, 13(5):865-868.

[9] 韩晓霞,许文辉,羊正祥,等.视神经损伤经颅视神经管减压与视觉诱发电位的临床研究[J].临床神经外科杂志,2014,11(6):459-461.
HAN Xiaoxia, XU Wenhui, YANG Zhengxiang, et al. Clinical study on transcranial optic canal decompression and visual evoked potential for optic nerve injury[J]. J Clin Neurosurg, 2014, 11(6):459-461.

[10] 贾云峰,胡国良,李建.颅脑损伤伴视神经损伤 86 例临床分析[J].临床神经外科杂志,2013,10(2):90-91.
JIA Yunfeng, HU Guoliang, LI Jian. Clinical analysis of 86 patients with head trauma and traumatic optic neuropathy[J]. J Clin Neurosurg, 2013, 10(2):90-91.

[11] 魏洪润,张哲成,田丽,等.视觉诱发电位对糖尿病视网膜病变的早期诊断价值[J].山东医药,2014,54(13):45-46.

[12] Luo Yi-ting. Diagnostic value of VEP applied in patients with optic nerve contusion[J].Mod Diagn Treat, 2013, 24(5):963-964.

[13] 赵秋岭.视觉诱发电位对外伤性视神经损伤诊断的应用价值[J].中国伤残医学,2014,22(9):206-207.

[14] You Y, K1istomar A, Thie J, et al. Axonal loss in a rat model of optic neuritisis closely correlated with visual evoked potential amplitudes using electroencephalogram-based sealing[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(7):3662-3663.

[15] Heravian J, Ehyaei A, Shoeihi V, et al. Pattern Visual Evoked potentials patients with type II diabetes mellitus [J]. Ophthamic Vis Res, 2012, 7(3):225-230.

[16] Xue F, Wu K, Wang T, et al. Morphological and functional changes of the optic nerve following traumatic optic nerve injuries in rabbits[J]. Biomed Rep, 2016, 4(2):188-192.

(编辑:孙瑶)