

·基础研究·

一种基于搭扣设计的可拆卸小鼠光学离焦性近视模型

唐湘华, 李周越, 许晟嵩, 杨晓

(中山大学中山眼科中心/眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】探索一种新的小鼠光学离焦性近视(LIM)模型的构建方法,揭示其屈光度与眼生物学参数的变化。【方法】27只21日龄C57BL/6小鼠分为3组:LIM组、平光镜(PL)组和空白对照(N)组,比例为5:1:3。以右眼为干预眼,左眼作为自身对照。于实验开始前,干预后第1、2、3和4周,复方托吡卡胺散瞳后检影检测屈光度,光学相干断层扫描在体测量眼轴。各组内,左右眼进行配对 t 检验。3组间比较,采用Welch's ANOVA,差异有统计学意义时,采用Dunnett's T3法校正 P 值进行两两比较。【结果】离焦诱导2周,LIM组内干预眼屈光度比对侧眼向近视漂移约 (-2.55 ± 1.54) D($t=6.430, P<0.0001$),伴眼轴较对侧增长约 (0.051 ± 0.024) mm($t=7.837, P<0.0001$);组间比较,LIM组屈光度较PL组或N组近视漂移的均值分别为 -2.30 D($P=0.014$), -2.55 D($P<0.0001$),LIM组眼轴较PL组或N组增长的均值分别为 0.048 mm($P<0.0001$)、 0.047 mm($P<0.0001$)。随干预时间延长,近视漂移程度增加。【结论】本研究构建了一种基于搭扣设计的可拆卸式小鼠LIM模型并进行验证,通过2周诱导,屈光度显著向近视漂移,眼轴显著增长。该LIM模型搭建简易,可为近视研究的动物实验的模型构建提供参考。

关键词:动物;疾病模型;小鼠;近视;表型

中图分类号:R77

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)01-0026-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0105

A Detachable Lens-Induced Myopia Model in Mice Based on Clasp Design

TANG Xiang-hua, LI Zhou-yue, XU Sheng-song, YANG Xiao

(Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Correspondence to: YANG Xiao; E-mail: yangx_zoc@163.com

Abstract:【Objective】To explore a new model for lens-induced myopia (LIM) in mice and describe the changes of diopter and ocular biological parameters.【Methods】Twenty-seven 21-day-old C57BL/6 mice were divided into three groups (ratio, 5:1:3): LIM group, plano lens (PL) group and normal control (N) group. The right eyes were intervened while the left eyes were left as control. The refraction was detected with retinoscopy after the pupils were dilated with compound topical amide and ocular axial length was measured by optical coherence tomography (OCT) in vivo at baseline and 1, 2, 3, and 4 weeks after the intervention. Paired t test was performed between left and right eyes within each group. Welch's ANOVA was used for comparison among the three groups. When the difference was statistically significant, the Dunnett's T3 was used to correct P value for pairwise comparison.【Results】After 2 weeks of defocus induction, the refraction of the intervened eye in LIM group shifted to myopia about (-2.55 ± 1.54) D($t=6.430, P<0.0001$), and the ocular axial length (AL) increased about (0.051 ± 0.024) mm($t=7.837, P<0.0001$). The difference of interocular change in refraction in LIM group compared with PL group and N group was -2.30 D($P=0.014$) and -2.55 D($P<0.0001$), respectively. The difference of interocular change in AL in LIM group was 0.048 mm($P<0.0001$) and 0.047 mm($P<0.0001$) compared with that in PL group and N group, respectively. With the extension of intervention time, the degree of myopia drift

收稿日期:2022-09-30

基金项目:国家自然科学基金(82070994);广东省自然科学基金(2019A1515010077)

作者简介:唐湘华,硕士生,研究方向:眼科学,E-mail:919672578@qq.com;杨晓,通信作者,博士,教授,博士生导师,E-mail: yangx_zoc@163.com

increased.【Conclusion】 In this study, a clasp-based and detachable LIM model was described and validated. After 2 weeks of intervention, the refraction shifted significantly toward myopia and the AL increased significantly. The LIM model is simple to construct and can provide a reference for the model construction of animal experiments in myopia research.

Key words: animals; disease models; mice; myopia; phenotype

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(1): 26-33]

在屈光发育过程中,过度增长的眼轴超过眼球屈光力的代偿时,即发生近视^[1]。近年来,近视的发病率逐年增长,且呈低龄化趋势,已成为世界关注的公共健康问题,不仅影响患者的视觉质量,高度近视还会增加青光眼、视网膜脱离和黄斑变性等不可逆致盲眼病的患病风险^[2]。到2050年,全世界近视患病率预计将增加到49.8%,其中高度近视占9.8%^[3]。近二十年,药物和光学干预技术的进步可帮助部分青少年延缓近视的发展速度,然而防控效果有限,并不能完全扼制住近视的进程。归根到底是因为,近视的发病机制目前尚不明确,无法对因治疗。研究近视的发病机制,近视动物模型是重要工具。目前,近视动物模型可分为先天干预和后天干预两大类。先天干预指通过基因编辑等一系列操作,改变动物的遗传物质,从而得到近视表型。而后天干预是通过异常的视觉经验诱导近视,主要包括两大类:形觉剥夺性近视(Form-deprivation myopia, FDM)模型^[4-7]、光学离焦性近视(lens-induced myopia, LIM)模型^[8-11],在猴^[5,10]、雏鸡^[6,12]、豚鼠^[7,11]、小鼠^[4,8]均有应用。尽管FDM模型由于构建相对容易从而应用更为广泛,其异常的视觉经验和临床中大部分近视病人并不一致,基于FDM模型的研究成果难以转化并指导临床诊疗。在对FDM模型和LIM模型的分子生物学检测也发现,两者的生化改变也不一致^[13]。因此,使用LIM模型进行近视机制研究更具科学性。尽管LIM模型在上述几种动物中均有报道,由于小鼠体型和眼球都很小,装置固定难度大,且难以在体测量眼生物学参数,过去用小鼠构建LIM的报道不多。LIM模型主要还是应用在猴^[10]、雏鸡^[12]、豚鼠^[11]。然而小鼠具有遗传背景清晰可控,抗体芯片齐备,造模耗时短、生长周期短,在动物实验中具有巨大优势。近年来,随着在体检测技术的进步,活体测量小鼠的屈光度和包括眼轴在内的其他眼生物学参数^[14]不再是困难,近年来,基于小鼠的LIM模型研究增多。但目前已有的小鼠LIM模型,存在无法排除形觉剥夺的混杂因素、装置固定难度大、装置材料需要特别定制^[15]等问题,难以推广使用。目前缺乏一种简单可行的可拆卸的小鼠LIM模型构建方法。因此,本文基于搭扣设计构建一种可拆卸式的小鼠LIM模型,并通过测量屈光度和眼生物学参数进一步验证该模型的有效性。该LIM模型搭建简易,可为近视研究的动物实验的模型构建提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

30只21日龄的近交系C57BL/6小鼠,野生型,SPF级,雌雄不限,体质量约10~20g,经称重、验光和外观检查排除3只,剩余27只符合实验标准,对27只小鼠进行实验。动物购自北京华阜康生物科技股份有限公司。实验经中山大学中山眼科中心动物实验伦理委员会审批通过(实验伦理批号:O2021016)。在正常的屏障区实验室条件下饲养,自由摄食,进水,室温控制在20~25℃,采用具有定时装置的日光灯照明(250~300 lux),饲养在12 h/12 h的光照黑暗环境中。

小鼠若出现以下情况需排除:①小鼠体质量太轻(小于10g);②眼球发育不全,或有结膜炎、白内障等眼部疾病;③双眼屈光参差大于3.00D。

1.2 耗材与仪器

1.2.1 主要耗材 镜片购于广州京德嘉润视觉科技有限公司(材质:PMMA,基弧半径:8.00 mm,总直径:9.00 mm, LIM组后顶焦度-25.00 D,平光镜组后顶焦度0 D)。蘑菇搭扣购自美国3M公司(型号: SJ4570超薄型, SJ3560)。

1.2.2 仪器 使用带状光检影镜(YZ24,苏州六六视觉科技股份有限公司)进行屈光度检测。使用光谱域光学相干断层扫描(Spectral-domain optical coherence tomography, SD-OCT, Leica Bioptigen)进行眼生物学参数测量。

1.3 分组与干预

1.3.1 分组 27只小鼠于21日龄分别编号,进行随机分组,分为3组:LIM组、平光镜(plano lens, PL)组和空白对照(normal control, N)组,分组比例为5:1:3。以右眼为干预眼,左眼作为自身对照。LIM组小鼠右眼戴-25.00 D的镜片,PL组小鼠右眼戴0 D的镜片,N组小鼠双眼不做干预。3组小鼠均配戴塑料颈圈以防止小鼠抓挠眼球或镜片。

1.3.2 光学离焦性近视模型的构建 小鼠LIM模型如图1所示,PL组的镜片固定方式与LIM组相同。若想构建形觉剥夺模型,将镜片换为不透明的硅胶帽即可。

① LIM装置的构建:本装置具体包括3种材料:镜片、硅胶垫片、蘑菇搭扣。用紫外固化胶将镜片边缘粘到一个圆环形硅胶垫片上(厚度1 mm,内直径7 mm,外直径10 mm)。两种蘑菇搭扣均剪成约12 mm×10 mm的矩形块状,用打孔器在中央打孔(直径8 mm)。将镜片-硅胶垫片组合

用紫外固化胶固定在较厚的蘑菇搭扣(SJ3560)的背胶面。

② 佩戴:使用1%戊巴比妥钠按50 mg/kg体质量腹腔注射麻醉小鼠。用卡波姆滴眼液(博士伦)点眼保持湿润。用5-0缝线将已经打好孔的超薄型蘑菇搭扣(SJ4570)缝合在小鼠右眼眶周。最后,将LIM装置与缝合在小鼠眶周的蘑菇搭扣对合即可。佩戴塑料颈圈,防止小鼠抓挠镜片或眼球。对侧眼以妥布霉素眼膏(中山大学中山眼科中心)涂眼防止感染,并放在保暖垫上进行恢复。

③ 护理:每天均需打开搭扣,用无尘棉签清洁镜片,除非超薄型蘑菇搭扣缝线松脱需要重新缝合,其他情况无需再次麻醉小鼠。



图1 小鼠光学离焦性近视模型

Fig. 1 Mouse Lens-induced myopia model

1.4 指标检测

主要指标为屈光度,次要指标为眼轴。于实验开始前,以及干预后第1、2、3和4周进行在体检测,具体方法如下。

1.4.1 屈光度检测 以0.5%复方托吡卡胺滴眼液点眼1次进行散瞳,2 min后检查瞳孔,瞳孔大小大于3 mm且对光反射消失则认为散瞳完全。由经过一定训练的两个验光师(未知动物组别)进行检影验光,取二者的平均值,若二者的差异大于2.00 D,则重新测量。

1.4.2 眼生物学参数测量 麻醉使用1%戊巴比妥钠按50 mg/kg体质量腹腔注射,麻醉成功后采用SD-OCT测量眼轴长度等眼生物学参数。先对右眼进行三次全眼扫描(1 000×5×2的线性B扫描),然后对左眼进行相同的检测^[14],测量完成后,使用恒温电热毯对小鼠进行保温,待其苏醒后放回鼠笼。手动测量SD-OCT图片上的眼生物学参数,各指标均取3次的平均值。各指标定义如下:眼轴长度(axial length, AL):角膜中央前顶点到RPE的垂直距离;角膜厚度(corneal thickness, CT):角膜中央前顶点到后顶点的距离;前房深度(anterior chamber depth, ACD):角膜中央后顶点到晶状体前顶点的距离;晶状体厚度(lens thickness, LT):晶状体前顶点到后顶点的距离;玻璃体腔深度(vitreous chamber depth, VCD):晶状体后顶点到视网膜神经上皮层前表面的垂直距离;视网膜厚度(retinal thickness, RT):视盘附近

(0.5 mm以内)视网膜神经上皮层前表面到视网膜色素上皮层(retinal pigment epithelium, RPE)的垂直距离。

1.5 统计学分析

统计学分析用Graphpad Prism 8.0进行。主要指标包括:各组各眼的屈光度和眼生物学参数的绝对值,各组两眼间屈光度的差值(右眼-左眼)较基线的变化值(简称屈光度的变化值),各组两眼间眼生物学参数的差值(右眼-左眼)较基线的变化值(简称眼生物学参数的变化值)。定量资料用Q-Q图进行正态性检验,若服从正态分布,用平均数±标准差进行统计描述。经残差图的检验方差齐性。各组内,左右眼进行配对*t*检验。对于时间序列,通过球形检验后,进行混合效应分析,以 $P < 0.05$ 为因子有统计学意义,若发现时间和分组存在交互效应,选取时间点进行组间比较。3组间比较,当数据服从正态分布但不满足方差齐性时,使用Welch's ANOVA进行组间比较;当Welch's ANOVA有统计学差异时,采用Dunnett's T3检验进行两两比较,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 屈光度和眼生物学参数的绝对值

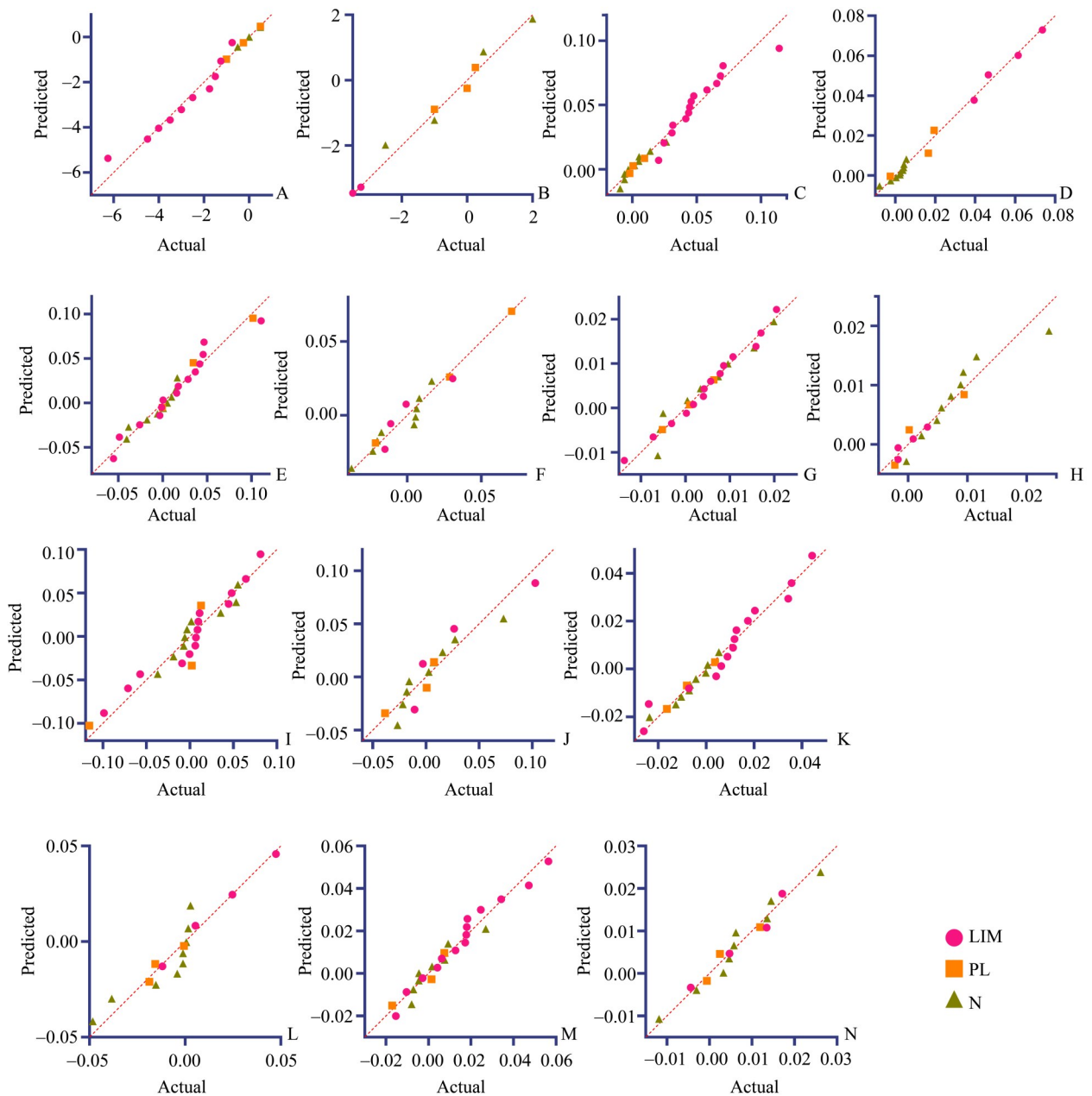
经Q-Q图检验,各组双眼的屈光度和眼生物学参数的绝对值服从正态分布(图2),均值和标准差总结如表1所示,包括3个时间点:基线、干预第2周、干预第4周。基线时各组均为远视,随时间变化,各组双眼屈光度均下降,眼轴均增长。

离焦诱导2周时,LIM组内干预眼与对侧眼之间,屈光度(图3D)和眼轴(图3F)的绝对值的差异均已具有统计学意义,干预眼屈光度较对侧眼(-2.47 ± 1.22) D($t=7.850$, $P < 0.0001$),眼轴较对侧眼长(0.054 ± 0.029) mm($t=6.933$, $P < 0.0001$);PL组内,干预眼与对侧眼之间屈光度差异无统计学意义($t=1.000$, $P=0.4226$),干预眼眼轴较对侧眼长(0.038 ± 0.007) mm($t=9.106$, $P=0.0118$)。

2.2 两眼间屈光度差异的变化

经Q-Q图检验,各组两眼间屈光度差异的变化值服从正态分布。组内比较,LIM组内,离焦诱导2周,两眼间屈光度差异变化的均值为(-2.55 ± 1.54) D($t=6.430$, $P < 0.0001$;表2,图3B)。

混合效应分析结果显示,时间和分组因素具有交互效应($P < 0.0001$),时间效应和分组因素均具有统计学意义(二者 P 值均 < 0.0001),随干预时间延长,干预组近视漂移程度增加。从干预第1周起,各时间点进行组间比较,3组间差异具有统计学意义(Welch's ANOVA,第1周, $F=4.715$, $P=0.0483$;第2周, $F=16.55$, $P=0.0048$;第3周 $F=10.23$, $P=0.0125$;第4周, $F=53.63$, $P=0.0007$),进一步两两比较,LIM组的屈光度变化值与PL组或N组相比,除了诱导1周



A(2 week), B(4 week), refraction. C(2 week), D(4 week), axial length. E(2 week), F(4 week), anterior chamber depth. G(2 week), H(4 week), lens thickness. I(2 week), J(4 week), vitreous chamber depth. K(2 week), L(4 week), retinal thickness. M(2 week), N(4 week), corneal thickness.

图2 两眼间屈光度差值和眼生物学参数差值的Q-Q图

Fig. 2 Q-Q Plots of interocular differences in refraction and ocular dimensions

的LIM组和N组相比没有差异,其他组间差异均具有统计学意义,即LIM组较PL组或N组更趋向近视(图3B,表2)。例如,第2周时,LIM组较PL组近视漂移的均值为-2.30 D ($P=0.014$),LIM组较N组近视漂移的均值为-2.55 D ($P<0.0001$;图3E,表2)。

2.3 两眼间眼生物学参数差异的变化

经Q-Q图检验,各组两眼间眼生物下的变化值服从正

态分布。两眼间眼生物学参数变化值的具体数值如表2所示。

2.3.1 眼轴 各组两眼间眼轴差异的变化值如图3C所示。组内比较,LIM组内,离焦诱导2周,两眼间眼轴差异变化的均值为(0.051±0.024) mm($t=7.837, P<0.0001$;表2,图3C)。

混合效应分析结果显示,时间和分组因素具有交互效应($P<0.0001$),时间效应和分组因素均具有统计学意义(二者 P 值均 <0.0001)。从干预第1周起,各时间点进行组间比

表1 光学离焦性近视小鼠(LIM)、平光镜小鼠(PL)和正常对照小鼠(N)的屈光度和眼生物学参数总结
Table 1 Summary of refraction and ocular dimensions in LIM mice, PL mice and Normal mice

($\bar{x}\pm s$)

Group	Eye	Time/ week	n	Refraction/D	AL/mm	ACD/mm	LT/mm	VCD/mm	RT/mm	CT/mm
LIM	Right (LIM)	0	15	5.20±1.49	3.091±0.048	0.293±0.036	1.821±0.034	0.733±0.030	0.169±0.017	0.075±0.009
	Left (Fellow)			5.12±1.21	3.090±0.058	0.296±0.039	1.819±0.035	0.725±0.028	0.176±0.008	0.074±0.008
	Right (LIM)	2	14 ¹⁾	1.17±1.25	3.212±0.065	0.338±0.041	1.930±0.040	0.678±0.027	0.177±0.013	0.090±0.015
	Left (Fellow)			3.63±0.95	3.158±0.072	0.324±0.049	1.921±0.046	0.665±0.036	0.173±0.010	0.073±0.008
	Right (LIM)	4	4	-1.63±0.25	3.335±0.022	0.381±0.025	2.033±0.010	0.668±0.030	0.167±0.023	0.085±0.008
	Left (Fellow)			1.94±0.24	3.279±0.031	0.376±0.016	2.038±0.012	0.622±0.017	0.169±0.012	0.074±0.007
PL	Right (PL)	0	3	3.58±0.14	3.125±0.005	0.335±0.009	1.823±0.013	0.713±0.033	0.174±0.011	0.080±0.007
	Left (Fellow)			3.58±0.38	3.089±0.013	0.341±0.012	1.808±0.006	0.695±0.018	0.173±0.007	0.073±0.004
	Right (PL)	2	3	2.92±0.38	3.249±0.007	0.368±0.002	1.969±0.009	0.665±0.024	0.165±0.017	0.083±0.004
	Left (Fellow)			3.17±0.14	3.211±0.011	0.328±0.046	1.954±0.003	0.680±0.055	0.171±0.020	0.078±0.005
	Right (PL)	4	3	1.67±0.52	3.320±0.003	0.391±0.023	2.037±0.014	0.636±0.034	0.169±0.006	0.087±0.003
	Left (Fellow)			1.92±0.14	3.274±0.005	0.371±0.035	2.019±0.007	0.629±0.023	0.180±0.012	0.076±0.001
N	Right	0	9	5.19±1.31	3.101±0.028	0.330±0.015	1.811±0.036	0.692±0.028	0.185±0.014	0.084±0.014
	Left			5.14±1.28	3.116±0.024	0.332±0.025	1.822±0.031	0.690±0.023	0.184±0.014	0.088±0.012
	Right	2	9 ²⁾	5.75±0.46	3.229±0.038	0.351±0.035	1.950±0.022	0.663±0.045	0.181±0.010	0.084±0.009
	Left			5.69±0.53	3.241±0.024	0.359±0.024	1.957±0.023	0.653±0.024	0.187±0.009	0.085±0.008
	Right	4	9	3.50±0.90	3.304±0.047	0.376±0.023	2.029±0.032	0.634±0.016	0.174±0.015	0.091±0.009
	Left			3.50±0.43	3.318±0.044	0.384±0.023	2.032±0.028	0.627±0.019	0.185±0.015	0.089±0.009

LIM, lens-induced myopia; PL, plano lens; N, normal control, AL, axial length; ACD, anterior chamber depth; LT, lens thickness; VCD, vitreous chamber depth; RT, retinal thickness; CT, corneal thickness. 1) $n=15$ for Refraction. 2) $n=8$ for Refraction.

较均具有统计学意义(Welch's ANOVA,第1周, $F=14.56$, $P=0.0025$;第2周, $F=22.25$, $P=0.0001$;第3周 $F=29.00$, $P=0.002$;第4周, $F=20.60$, $P=0.0122$),进一步两两比较,LIM组的眼轴变化值与PL组或N组相比,组间差异均具有统计学意义,LIM组眼轴增长值较PL组或N组更大(图3C,表2)。例如,第2周时,LIM组较PL组眼轴增长的均值为 0.048 mm ($P<0.0001$),LIM组较N组眼轴增长的均值为 0.047 mm ($P<0.0001$)(图3G,表2)。

2.3.2 其余眼生物学参数 组内比较,LIM组内2周时两眼间角膜厚度差异相对基线变厚,均值为 $(0.016\pm 0.020)\text{ mm}$ ($t=3.029$, $P=0.0097$),N组内2周时右眼视网膜厚度相对变薄 $(0.007\pm 0.009)\text{ mm}$ ($t=2.308$, $P=0.0499$),4周右眼晶状体厚度相对变厚 $(0.008\pm 0.007)\text{ mm}$ ($t=3.534$, $P=0.0077$),其余参数均无明显变化。组间比较,组间差异无统计学意义(表2)。

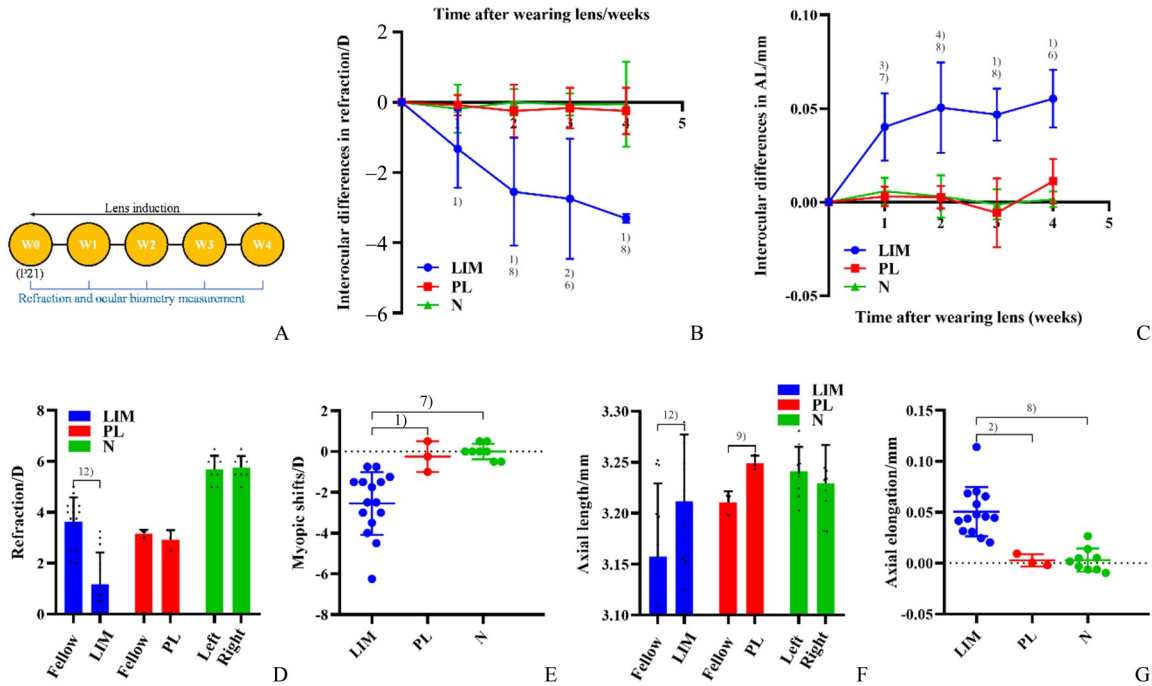
3 讨论

3.1 主要发现

本文描述了一种新的小鼠光学离焦性近视模型的建立方法,仅需诱导2周,与平光镜组和空白对照相比,屈光度显著向近视漂移,眼轴显著增长。建立LIM模型简所需的材料均可以直接购买,搭建简单,诱导装置可拆卸。

近视的主要体征为屈光度下降和眼轴增长。由于小鼠没有调节^[1],屈光度不受睫状肌的影响,因此理论上不存在睫状肌麻痹不充分的问题,因此屈光度的结果较为客观。实验结果表明,通过2周的负镜片诱导,无论是和自身对照,还是和平光镜组或空白组对照,干预眼的屈光度均出现下降,验证小鼠近视模型的成功。

眼轴的实验结果也和屈光度一致。通过2周的离焦诱导,LIM组内干预眼眼轴较对侧增长约 0.051 mm ;组间比较,LIM组眼轴较PL组或N组分别增长 0.048 mm 、 0.047



A: Experimental procedures and data collection flow diagram. B: Refractive development growth curves of lens-induced myopia (LIM) mice, plano lens (PL) mice and normal control (N) mice. Refraction indicated the change of difference between the right and left eyes from baseline. From the second week of intervention, the averaged refractions of the LIM group were significantly more myopic than those of the PL or N groups. The sample sizes of LIM, PL and N group were 10, 3, 4 in the first week, 15, 3, 8 in the second week, 10, 3, 4 in the third week, 4, 3, 9 in the fourth week, respectively. C: Ocular axial length (AL) development growth curves of LIM mice, PL mice and normal mice. AL indicated the change of difference between the right and left eyes from baseline. After at least one week of intervention, the averaged AL of the LIM group were significantly longer than those of the PL or N groups. The sample sizes of LIM, PL and N group were 9, 3, 4 in the first week, 14, 3, 9 in the second week, 9, 3, 4 in the third week, 4, 3, 9 in the fourth week, respectively. D: Bar charts summarizing refractions of lens induced eyes and fellow eyes in LIM mice ($n=15$) and PL mice ($n=3$), and both eyes in normal mice ($n=8$) after 2-week intervention. In LIM group, lens induced eyes were more myopic than the fellow eyes. E: Grouped data show that the change of interocular differences in refraction from baseline in LIM mice ($n=15$) were significantly more myopic shifts as compared to those in PL mice ($n=3$) and normal mice ($n=8$). F: Bar charts summarizing AL of lens induced eyes and fellow eyes in LIM mice ($n=14$) and PL mice ($n=3$), and both eyes in normal mice ($n=9$) after 2-week intervention. In LIM group, lens induced eyes had longer AL than the fellow eyes. G: Axial elongation in LIM mice ($n=14$) was significantly larger than that in PL mice ($n=3$) and normal mice ($n=9$). 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$, 4) $P < 0.0001$, Dunnett's T3-adjusted multiple comparison, LIM vs. PL. 5) $P < 0.05$, 6) $P < 0.01$, 7) $P < 0.001$, 8) $P < 0.0001$, Dunnett's T3-adjusted multiple comparison, LIM vs. normal control. 9) $P < 0.05$, 10) $P < 0.01$, 11) $P < 0.001$, 12) $P < 0.0001$, paired t -test, Left vs. Right eyes.

图3 光学离焦性近视小鼠(LIM)、平光镜小鼠(PL)和正常对照小鼠(N)的屈光度和眼轴长变化

Fig. 3 Refraction and AL changes of LIM mice, PL mice and normal control mice

mm。而本实验所用OCT测量误差在0.018 mm左右^[16],眼轴的增长不能完全用测量误差来解释,从眼轴的角度再次验证了小鼠近视模型建立成功。

至于其他眼生物学参数,角膜厚度、晶状体厚度、视网膜厚度的变化在0.007-0.017 mm之间,虽然出现了统计学差异,但结合上述,其测量误差为0.018 mm^[16],这些变化没有实际意义。

本次实验造模观察时间为4周,每天均检察并清洁护理镜片。通过观察,各组镜片在4周内都能保持清洁,无明显污物沉积。颈圈的佩戴也减少了小鼠抓挠镜片,通过在裂隙灯下观察没有明显的划痕。观察结果表明,小鼠干预眼被形觉剥夺的可能性较低。

3.2 与其他的小鼠光学离焦性近视模型对比

目前已有的小鼠LIM模型的建立方法大致分为3种:①胶合:直接用胶水将镜片固定在眶周^[8];②缝合:用缝线将镜片缝合在眶周^[9];③头戴式:将带有镜片的装置用牙科水泥固定在小鼠头骨^[17-18]。前两种不可拆卸,镜片清洁程度堪忧,存在形觉剥夺的风险,并且难以在诱导期间对干预眼再叠加其他药物干预,存在诸多不便。而头戴式模型具有一定的难度,装置需要特别定制,如何将装置与头骨连接牢固需要经验和技巧,固定装置需要提前24 h进行搭建^[15];诱导时间较长,大约需诱导3-4周^[15];装置较重,有阻碍小鼠正常活动的可能。

本文设计的这种新的小鼠LIM模型的建立方法,镜片

表2 光学离焦性近视小鼠(LIM)、平光镜小鼠(PL)和正常对照小鼠(N)的两眼间屈光度差值和眼生物学参数差值的变化
Table 2 Summary of change of interocular differences in refraction and ocular dimensions in LIM mice, PL mice and Normal mice

Group	Time/ week	n	Refraction/D	AL/mm	Normal mice					
					AL Refraction/ (mm/D)	ACD/mm	LT/mm	VCD/mm	RT/mm	CT/mm
LIM	2	14 ⁸⁾	-2.55±1.54 ⁴⁾	0.051±0.024 ⁴⁾	-0.020	0.015±0.04 3	0.005±0.009	0.003±0.051	0.011±0.020	0.016±0.020 ²⁾
	4	4	-3.31±0.13 ⁴⁾	0.055±0.015 ²⁾	-0.017	0.001±0.02 1	0.000±0.002	0.029±0.052	0.016±0.026	0.008±0.010
PL Control	2	3	-0.25±0.75	0.003±0.006	-0.012	0.045±0.052	0.001±0.006	-0.034±0.071	-0.007±0.010	-0.003±0.013
	4	3	-0.25±0.66	0.011±0.012	-0.044	0.026±0.046	0.002±0.006	-0.010±0.025	-0.012±0.010	0.005±0.007
Normal Control	2	9 ⁹⁾	0.00±0.38	0.003±0.011	-	-0.006±0.022	0.004±0.009	0.008±0.032	-0.007±0.009 ¹⁾	0.003±0.011
	4	9	-0.06±1.21	0.001±0.004	-0.017	-0.006±0.019	0.008±0.007 ²⁾	0.005±0.032	-0.011±0.019	0.007±0.011
2W, ANOVA, <i>P</i> ⁵⁾	-	-	0.004 8	0.000 1	-	0.220 6	0.605 0	0.669 9	0.084 0	0.155 6
2W, LIM vs PL, <i>P</i> ⁶⁾	-	-	0.014 0	<0.000 1	-	-	-	-	-	-
2W, LIM vs N, <i>P</i> ⁷⁾	-	-	<0.000 1	<0.000 1	-	-	-	-	-	-
4W, ANOVA, <i>P</i> ⁵⁾	-	-	0.000 7	0.012 2	-	0.550 2	0.085 6	0.491 6	0.220 3	0.878 9
4W, LIM vs PL, <i>P</i> ⁶⁾	-	-	0.020 6	0.013 7	-	-	-	-	-	-
4W, LIM vs N, <i>P</i> ⁷⁾	-	-	<0.000 1	0.008 2	-	-	-	-	-	-

LIM, lens-induced myopia; PL, plano lens; N, normal control; AL, axial length; ACD, anterior chamber depth; LT, lens thickness; VCD, vitreous chamber depth; RT, retinal thickness; CT, corneal thickness. Interocular differences indicated the change of difference between the right and left eyes from baseline. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$, 4) $P < 0.0001$, paired *t*-test, Right vs Left eyes. 5) Welch's ANOVA, LIM mice vs. PL mice vs. normal control mice. 6) Dunnett's T3-adjusted multiple comparison, LIM mice vs. PL mice. 7) Dunnett's T3-adjusted multiple comparison, LIM mice vs. normal control mice. 8) $n=15$ for Refraction. 9) $n=8$ for Refraction.

可以拆卸,可以每天清洁,减少形觉剥夺的风险,也可以根据实验需求,对诱导眼叠加其他干预。此外,建立本文所述搭扣式LIM模型的材料均可以直接购买,搭建较为简单,耗时短,装置总体质量较轻;本实验诱导时间相对较短,2周即可诱导出相对近视,眼轴相对增长超过50 μ m。

3.3 与其他物种光学离焦性近视模型对比

不同的实验动物各有优缺点。用于构建LIM模型的实验动物主要包括:猴^[5,10]、雏鸡^[6,12]、豚鼠^[7,11]、小鼠^[4,8]、树鼯^[1]。猴属于非人灵长类,是最接近人的哺乳动物之一,但却是国家二级保护动物,且近视诱导时间长,从伦理角度和科学角度都不是优选对象。雏鸡由于眼镜固定方便、诱导成功率高、诱导时间短的优势,一度广泛应用于LIM模型,但由于雏鸡不是哺乳动物,其眼球结构与人类差异大,目前应用逐渐减少。豚鼠作为温顺的哺乳动物,眼球尺寸相对较大,LIM模型的构建难度低,且成功率相对高,加上其基因表达谱和人类相似程度较高^[19],是目前常用的LIM模型动物,但其基因库数据不完备,对应的抗体、芯片等不齐备,制约了其应用。

小鼠遗传背景清晰,基因可调控,诱导时间短,繁殖速度快,饲养管理方便。在近视模型实验中,小鼠造模时间

短,其基因组90%以上与人类有同源性,眼生理指标相较于人眼具有参考价值。并且在已有的近视模型动物中,小鼠是最小的哺乳动物,无更小的哺乳动物可替代。小鼠在近视动物模型实验中具有巨大优势。因此本研究针对小鼠LIM模型,创新性地进行了改造,该模型具有材料可及、可拆卸的特点,并且后续通过测量屈光度和眼轴对该模型进行验证。

3.4 局限与展望

本研究的主要局限在于,观察时间较短,报告了干预4周的结果。从图3B 2C的时间曲线上看,在2周时已诱导出显著的近视漂移,已可以满足进一步的机制研究;而随着时间的推移,近视漂移有增大的趋势,若想构建高度近视模型,可延长诱导时间,进一步探索。本研究结果显示干预两周时,PL组干预眼眼轴比对侧长,但在查看基线眼轴发现,干预眼基线眼轴较对侧眼长,校正基线眼轴后,干预2周后的双眼眼轴没有差异。下一步实验可增加远视离焦镜片组,通过远视离焦诱导,构建小鼠远视模型,进一步验证模型由离焦诱导而非形觉剥夺诱导。此外,由于实验设备有限,本次实验并未测量角膜曲率。

3.5 结论

本研究描述了一种基于搭扣设计的可拆卸的小鼠光学离焦性近视模型,并通过测量屈光度和眼轴验证了该模型。

通过2周的光学离焦诱导可以诱导出相对近视。该LIM模型搭建简易,可为近视研究的动物实验的模型构建提供参考。

参考文献

- [1] Troilo D, Smith EL 3rd, Nickla DL, et al. IMI - report on experimental models of emmetropization and myopia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(3):M31-M88.
- [2] Morgan IG, Ohno-Matsui K, Saw SM. Myopia[J]. *Lancet*, 2012, 379(9827):1739-1748.
- [3] Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, et al. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050 [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(5):1036-1042.
- [4] Wu H, Chen W, Zhao F, et al. Scleral hypoxia is a target for myopia control [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(30):E7091-E7100.
- [5] Raviola E, Wiesel TN. An animal model of myopia[J]. *N Engl J Med*, 1985, 312(25):1609-1615.
- [6] Wang JC, Chun RK, Zhou YY, et al. Both the central and peripheral retina contribute to myopia development in chicks[J]. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2015, 35(6):652-662.
- [7] Wildsoet CF, McFadden SA. Optic nerve section does not prevent form deprivation-induced myopia or recovery from it in the mammalian eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(13):1737.
- [8] Zhu X, Du Y, Li D, et al. Aberrant TGF- β 1 signaling activation by MAF underlies pathological lens growth in high myopia[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):2102.
- [9] Tkatchenko TV, Shen Y, Tkatchenko AV. Mouse experimental myopia has features of primate myopia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(3):1297-1303.
- [10] Tkatchenko TV, Troilo D, Benavente-Perez A, et al. Gene expression in response to optical defocus of opposite signs reveals bidirectional mechanism of visually guided eye growth [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(10):e2006021.
- [11] Jiang L, Garcia MB, Hammond D, et al. Strain-dependent differences in sensitivity to myopia-inducing stimuli in guinea pigs and role of choroid [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(4):1226-1233.
- [12] Choh V, Lew MY, Nadel MW, et al. Effects of interchanging hyperopic defocus and form deprivation stimuli in normal and optic nerve-sectioned chicks [J]. *Vision Res*, 2006, 46(6-7):1070-1079.
- [13] Zhou X, Pardue MT, Iuvone PM, et al. Dopamine signaling and myopia development: What are the key challenges [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2017, 61:60-71.
- [14] Allen RS, Bales K, Feola A, et al. In vivo structural assessments of ocular disease in rodent models using optical coherence tomography [J]. *J Vis Exp*, 2020, 2020(161):e61588.
- [15] Jiang X, Kurihara T, Ikeda SI, et al. Inducement and evaluation of a murine model of experimental myopia [J]. *J Vis Exp*, 2019, 2019(143):e58822.
- [16] Hn P, Qazi Y, Tan C, et al. Assessment of axial length measurements in mouse eyes [J]. *Optom Vis Sci*, 2012, 89(3):296-303.
- [17] Jiang X, Kurihara T, Kunimi H, et al. A highly efficient murine model of experimental myopia [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2026.
- [18] Gu Y, Xu B, Feng C, et al. A head-mounted spectacle frame for the study of mouse lens-induced myopia [J]. *J Ophthalmol*, 2016, 2016:8497278.
- [19] Zhou X, Wang W, Lu F, et al. A comparative gene expression profile of the whole eye from human, mouse, and guinea pig [J]. *Mol Vis*, 2007, 13:2214-2221.

(编辑 孙慧兰)