

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)21-1921-04

先天性静止性夜盲模式大鼠基础生理值的测定

安晶 郭群 顾永昊 李莉 闫果林 朱德生 施新猷 张作明

(第四军医大学航空航天医学系临床医学教研室 陕西 西安 710033)

Basic physiological and biochemical data in model rats of congenital stationary night blindness

AN Jing, GUO Qun, GU Yong-Hao, LI Li, YAN Guo-Lin, ZHU De-Sheng, SHI Xin-You, ZHANG Zuo-Ming

Department of Clinical Medicine, School of Aerospace Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To determine the basic physiological and biochemical data in a natural occurring mutant rats of congenital stationary night blindness (CSNB). **METHODS:** Forty CSNB rats in F11 and F12 (20 female and 20 male) and 5 SD rats, aged from 13 to 15 weeks, were examined by electroretinogram (ERG) technique to evaluate the inherited traits under anaesthesia. The blood was then collected from the abdominal vein in torrefied tubes to measure the biochemical parameters. Then heart, liver, spleen, lung, brain (cerebrum, cerebellum, brain stem), pituitary, kidney, adrenal gland and testicle were taken to weigh. **RESULTS:** There were significant differences in organ weight between two sexes in CSNB rat ($P < 0.05$), except for spleen, adrenal gland, pituitary. The coefficients of organs were significantly higher in female CSNB rats than that of the male except for kidney ($P < 0.01$). The GLU, CHO, ALB were higher, and ALT, AST, ALP, BUN, CRE, TG, TP were lower in female rats; the result of electrolyte was that K, Na and iCa were higher in the male, Cl was higher in female, but there were no significant differences between female and male in statistics ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** The basic physiological and biochemical data of CSNB rat strain are in normal range. There are significant differences in some basic physiological and biochemical data between female and male CSNB rats, but not lots between CSNB rats and control SD rats. CSNB rat will become a new mutant model rat for researches on inherited retinal disease.

【Keywords】 night blindness/congenital; rat; electroretinogram; physiology; biochemistry

【摘要】目的 对本实验室首先发现并培育的自发性先天性静止性夜盲(CSNB)大鼠的主要脏器及血液、生化指标进行检测。方法 随机选取出生13~15 wk的第11、12代CSNB大鼠通过视网膜电图鉴定后,抽取静脉血进行血清生化相关指标的检测,并对其重要脏器进行准确称量。结果:CSNB大鼠脏器质量在雌雄之间除脾脏、肾上腺、脑垂体外,其余均存在显著差异($P < 0.05$);脏器系数大脑、小脑、脑干雌雄间存在非常显著差异($P < 0.01$)。生化指标葡萄糖、总胆固醇和白蛋白在雌性大于雄性,丙氨酸转氨酶、天门冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、甘油三酯和总蛋白在雌性小于雄性;血电解质 K^+ 、 Na^+ 、离子钙(iCa)在雄性大于雌性,雌性的 Cl^- 值高,但无差异。结论:CSNB大鼠基本生理学和生物化学参数均在正常范围内,其中一些参数在CSNB大鼠性别之间存在差异,但是与正常对照SD大鼠之间只有个别参数有差异。CSNB大鼠为遗传性视网膜疾病的研究提供了一种新的突变模式动物品系。

【关键词】夜盲/先天性 大鼠 视网膜电图 生理学 生物化学
【中图分类号】R774 **【文献标识码】**A

0 引言

遗传性视网膜疾病是致盲的重要原因,目前缺乏有效的治疗手段。模式动物是研究基因和蛋白功能的重要支撑条件,也是研究疾病防治和药物开发的重要手段。目前,日本京都大学正在进行一项生物资源保存计划,与眼科相关的有6种。美国Jackson实验室是目前世界上最大的突变小鼠库,该实验室先后发现16种自发性基因突变视网膜疾病模式小鼠^[1]。我们在实验中发现一种视网膜电图(ERG)异常大鼠,经遗传学和视觉电生理学鉴定,确定为一种类似人类先天性静止性夜盲(congenital stationary night blindness, CSNB)模式大鼠^[2-3],并已经近交繁育至14代。为建立一种新的、具有我国自主知识产权的视网膜疾病模式动物品系,我们对该品系的大鼠基本生理学及生物化学参数进行了测量。

1 材料和方法

1.1 材料 本实验室发现并培育至第11代及第12代出生的13~15 wk CSNB大鼠40只,雌雄各半,肉眼检查正常,屈光间质清晰,眼底未见异常。将动物

收稿日期 2006-04-27; 接受日期 2006-06-14

基金项目 国家自然科学基金(30371517)

通讯作者 张作明。Tel (029) 84774817 Email zhangzm@fmmu.edu.cn

作者简介 安晶,硕士生(导师张作明)。Tel (029) 84774819 Ext. 13

Email anjingrc@163.com

置于屏障动物实验室内饲养,予以 12 h 明暗交替光照,不限食水,室温 22℃~26℃。正常同龄对照 SD 大鼠 10 只,雌雄各半(第四军医大学实验动物中心提供),在本实验室条件饲养 1 wk 后进行实验。RETI-port 系统(Roland Consult, 德国)及银-氯化银角膜电极(自制);电子分析天平(1/10000, 上海分析仪器厂);全自动生化分析仪(autolab-18, 意大利);自动电解质分析仪(DX-685, 上海讯达医用电子仪器厂);常规手术器械,速眠新 II(军事医学科学院军事兽医研究所,批号 D05013)等。

1.2 方法

1.2.1 视觉电生理学检测 按文献 [4] 的方法,采用 RETI-port 系统进行视杆细胞反应(rod-ERG)、最大混合反应(Max-ERG)、振荡电位(OPs)、明适应视网膜电图(Phot-ERG)和闪烁光视网膜电图(Flicker-ERG)记录。大鼠在实验前 12 h 予以暗适应后先进行暗适应视网膜电图记录,再进行 10 min 明适应后记录 Phot-ERG 和 20 Hz Flicker-ERG。观察 Max-ERG 的 a、b 波,OPs 的 O₂ 波和 20 Hz Flicker-ERG 的 P₁ 波潜伏期和幅值的变化。

1.2.2 血液标本采集及检测 将 CSNB 大鼠禁食禁水 12 h,采用乙醚麻醉后开腹,于腹腔静脉抽取静脉血 3 mL,将血液注入干燥管内,3000 r/min 离心 10 min,取血清用全自动生化分析仪测定血清天门冬氨酸转氨酶(GOT)、丙氨酸转氨酶(GPT)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、葡萄糖(GLU)、总胆固醇

(CHO)、甘油三酯(TG)等指标。经自动电解质分析仪测定 K⁺、Na⁺、Cl⁻ 及离子钙(iCa)。

1.2.3 脏器质量检查 将以上动物在取血后放血处死,并立即剖取脑、心、肺、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸等脏器,用电子天平称其质量。在心脏的大血管出入处剪断血管,在左右肺门处剪断支气管,在肾门处剪断血管,脑组织以大脑脚为界分开大脑、脑干,延髓终止于锥体交叉。除去上述器官周围的脂肪、筋膜,用滤纸吸尽脏器表面的血液和水分后用分析天平称质量,将左右肺、左右肾、左右睾丸合并称其质量。

1.2.4 数据测量 应用 RETI-port 系统进行波形幅值和潜伏期的测量。

统计学处理:所有数据均采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行 independent-samples *t* 检验,分析组间及两两差异。

2 结果

2.1 视觉电生理学检测 CSNB 大鼠 rod-ERG 和 Max-ERG 的 b 波均未引出明显波形,Max-ERG 的 a 波幅值较 SD 大鼠低,潜伏期较 SD 大鼠延长($P < 0.05$);CSNB 大鼠的 OPs 波畸形,子波不明确,仅在正常大鼠 O₂ 波的位置上有一明确的阳性波,而正常大鼠一般可引出 5 个子波。对 SD 大鼠的 O₂ 波与 CSNB 大鼠 OPs 波最高阳性波进行比较,后者波幅值较对照组显著降低($P < 0.05$);Phot-ERG 波幅降低,潜伏期延长;20 Hz Flicker-ERG 的 P₁ 波幅值较对照组有非常显著性降低($P < 0.01$, 表 1, 图 1)。

表 1 SD 大鼠和先天性静止性夜盲(CSNB)大鼠视网膜电图中部分参数的比较

($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	a 波	b 波	O ₂ 波	b ₁ 波	P ₁ 波
SD 大鼠					
潜伏期 (ms)	12.20 ± 1.17	59.20 ± 11.18	18.00 ± 2.90	52.20 ± 4.62	50.60 ± 2.73
幅值 (μV)	273.20 ± 88.71	582.00 ± 147.28	43.96 ± 15.48	64.88 ± 26.75	18.66 ± 2.87
CSNB 大鼠					
潜伏期 (ms)	15.40 ± 1.62 ^a	ND	21.40 ± 1.30	95.00 ± 15.70 ^b	100.2 ± 0.75 ^b
幅值 (μV)	100.62 ± 26.84 ^a	ND	18.82 ± 5.51 ^a	16.04 ± 3.81 ^b	4.54 ± 2.37 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SD 大鼠。a 波 b 波 最大混合反应;O₂ 波 振幅电位;b₁ 波 明适应视网膜电图;P₁ 波 闪烁光视网膜电图;ND 未引出。

2.2 脏器质量及系数 CSNB 品系大鼠雄性与雌性相比,除脾、肾上腺和脑垂体的质量无明显差异($P > 0.05$)外,其余各脏器质量均为雄性显著大于雌性($P < 0.01$, 表 2)。但是除肾脏质量系数(脏器系数 = 体质量/脏器质量 × 100%)外,其余各脏器质量系数雌性与雄性相比较均有显著性差异,且雌性明显大于雄性(表 2)。各脏器大体观察色泽正常,未见出

血、淤血、渗出、包块等异常改变。

2.3 CSNB 大鼠血液、生化指标 血清 GLU, CHO, ALB 雌性高于雄性,而 ALT, AST, ALP, BUN, CER, TG, TP 值雌性低于雄性(表 3)。对照组 SD 大鼠与 CSNB 大鼠生化值比较,血清 ALP, TG 有差异性($P < 0.05$), CRE 有显著差异($P < 0.01$)。血清电解质检测两组间及性别间均无差异(表 4)。

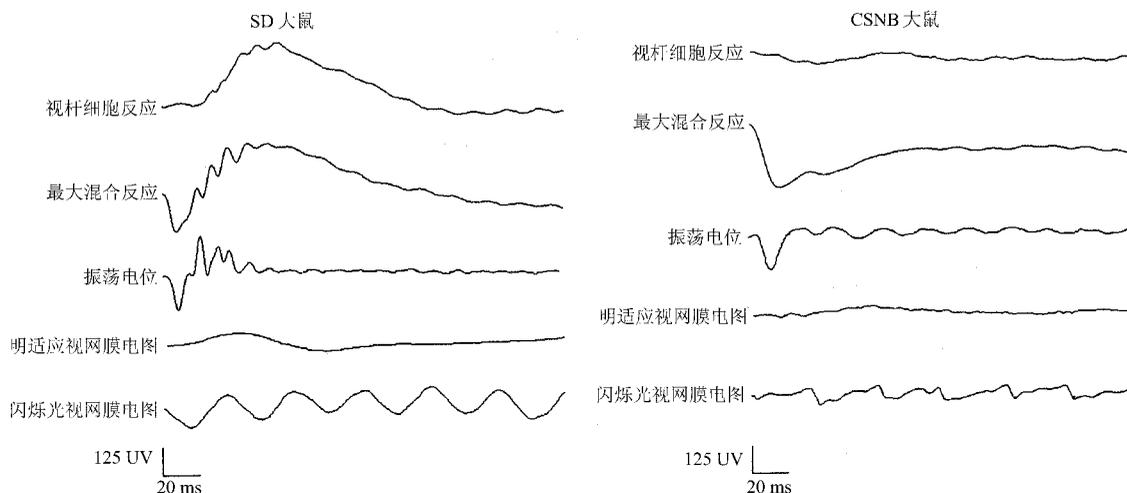


图1 SD大鼠与先天性静止性夜盲(CSNB)大鼠 ERG 各种反应波形

表2 先天性静止性夜盲(CSNB)大鼠重要脏器的质量和脏器质量系数均值

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

项目	质量(g)			质量系数(%)		
	平均(n=27)	雄性(n=14)	雌性(n=13)	平均(n=27)	雄性(n=14)	雌性(n=13)
体质量	281.870 ± 58.740	335.250 ± 27.480	227.350 ± 26.150 ^b			
心	1.073 ± 0.186	1.234 ± 0.104	0.897 ± 0.062 ^b	0.3840 ± 0.0290	0.3730 ± 0.0220	0.3970 ± 0.0310 ^a
肺	1.403 ± 0.203	1.558 ± 0.173	1.244 ± 0.087 ^b	0.5090 ± 0.0730	0.4710 ± 0.0710	0.5500 ± 0.0500 ^b
肝	8.633 ± 1.711	9.863 ± 1.595	7.422 ± 0.898 ^b	3.0950 ± 0.3660	2.9330 ± 0.3920	3.2700 ± 0.2450 ^a
脾	0.448 ± 0.096	0.492 ± 0.102	0.405 ± 0.078	0.1620 ± 0.0320	0.1470 ± 0.0270	0.1780 ± 0.0290 ^b
肾	1.909 ± 0.401	2.291 ± 0.162	1.521 ± 0.124 ^b	0.6790 ± 0.0490	0.6850 ± 0.0530	0.6730 ± 0.0470
肾上腺	0.052 ± 0.011	0.053 ± 0.008	0.051 ± 0.015	0.0192 ± 0.0050	0.0161 ± 0.0030	0.0224 ± 0.0056 ^a
大脑	1.274 ± 0.068	1.332 ± 0.039	1.215 ± 0.039 ^b	0.4680 ± 0.0820	0.4020 ± 0.0330	0.5400 ± 0.0510 ^b
小脑	0.252 ± 0.023	0.265 ± 0.014	0.238 ± 0.025 ^b	0.0920 ± 0.0150	0.0800 ± 0.0080	0.1050 ± 0.0090 ^b
脑干	0.221 ± 0.022	0.235 ± 0.015	0.207 ± 0.021 ^b	0.0806 ± 0.0136	0.0705 ± 0.0058	0.0916 ± 0.0105 ^b
脑垂体	0.020 ± 0.006	0.021 ± 0.007	0.020 ± 0.004	0.0076 ± 0.0027	0.0064 ± 0.0025	0.0088 ± 0.0024 ^a
睾丸		2.757 ± 0.114			0.8330 ± 0.0590	

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 雄性 CSNB 大鼠.

表3 先天性静止性夜盲(CSNB)大鼠与 SD 大鼠血液生化测定结果比较

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

项目	CSNB 大鼠			SD 大鼠
	雄性(n=20)	雌性(n=20)	平均(n=40)	(n=10)
ALT(nkat/L)	1122 ± 440	1055 ± 438	1090 ± 434	895 ± 142
AST(nkat/L)	2893 ± 969	2660 ± 697	2784 ± 848	2539 ± 1132
ALP(nkat/L)	5234 ± 1627	4433 ± 1494	4856 ± 1596 ^a	3635 ± 713
BUN(mmol/L)	8.63 ± 2.24	7.49 ± 2.10	8.79 ± 1.50	8.23 ± 0.83
CRE(μmol/L)	89.68 ± 20.82	87.71 ± 18.61	88.75 ± 19.55 ^b	69.90 ± 8.80
GLU(mmol/L)	8.65 ± 1.58	8.96 ± 1.44	8.47 ± 1.55	8.83 ± 1.44
CHO(mmol/L)	1.41 ± 0.42	1.47 ± 0.34	1.43 ± 0.38	1.65 ± 0.38
TG(mmol/L)	1.07 ± 0.64	0.78 ± 0.22	0.93 ± 0.50 ^a	1.25 ± 0.33
TP(g/L)	66.42 ± 5.55	65.41 ± 6.41	65.94 ± 5.91	63.50 ± 3.21
ALB(g/L)	34.47 ± 3.75	35.18 ± 3.54	34.80 ± 3.62	33.90 ± 3.76

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs SD 大鼠. ALT 天门冬氨酸基转换酶;AST 丙氨酸基转换酶;ALP 碱性磷酸酶;BUN 尿素氮;CRE 肌酐;GLU 葡萄糖;CHO 总胆固醇;TG 甘油三酯;TP 总蛋白;ALB 白蛋白.

表4 先天性静止性夜盲(CSNB)大鼠与 SD 大鼠血清电解质测定结果

(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	iCa
SD 大鼠	10	4.42 ± 0.29	140.51 ± 3.42	102.15 ± 1.36	1.22 ± 0.06
CSNB 大鼠	28	4.55 ± 0.50	139.49 ± 3.80	101.63 ± 3.93	1.21 ± 0.11
雄性	14	4.67 ± 0.59	139.81 ± 2.30	101.26 ± 3.54	1.22 ± 0.10
雌性	14	4.42 ± 0.38	139.16 ± 4.94	102.00 ± 4.39	1.20 ± 0.12

3 讨论

CSNB 是一类先天性、非进展性、主要以损坏视网膜杆状细胞功能的眼科疾病,而眼底正常. 根据 ERG 特征,人类 CSNB 疾病可以分为 Schubert-Bornschein 型和 Riggs 型. 根据 ERG b 波形态前者还可再分为不完全型和完全型^[5],通常表现为负波型的传统 ERG,即一个正常的或轻度下降的 a 波和一个严重下降的或记录不到的 b 波, b 波幅值小于 a 波,即

负性波,而后一种类型常表现为 a、b 波都下降,但 b 波仍大于 a 波的暗适应 ERG 反应。负性波是 Schubert-Bornschein 型 CSNB 区别于 Riggs 型 CSNB 的显著特点。目前已经确定完全型 CSNB 是由于 NYX 基因突变所致^[6]、不完全型是由于 CACNA1F 基因突变所致^[7]。

我们实验室发现的 CSNB 大鼠 ERG 视杆细胞反应及标准闪光 ERG b 波未记录到明显的波形;视锥细胞反应波幅值降低,即视觉电生理学表型上与 CSNB 完全型相似。但是我们最近对 CSNB 大鼠致病基因的研究排除了 NYX 基因突变的可能性,初步确定为 CACNA1F 基因突变所致(未发表数据)。提示 CSNB 的发病机制相当复杂,受多种因素的影响。最近, Fiona 等^[8]在 CACNA1F 的 exon 7 上插入基因片段,获得有类似夜盲表现的转基因小鼠,但其电生理表型与不完全型 CSNB 患者的电生理学表型有较大的差异,且没有视传导功能。而我们发现的 CSNB 品系大鼠为自发性的模式动物,在发病机制上可能更接近于人类 CSNB 疾病,且已经进行近交繁殖到 14 代,遗传特性稳定,因此 CSNB 大鼠将有可能成为首个具有我国自主知识产权的自发性基因突变视网膜疾病模式动物近交系。

本实验 CSNB 大鼠的各脏器质量值均雄性大于雌性,而体质系数,雄性除肾脏外,各脏器质量系数较雌性小,其中心脏、肝脏、肾上腺、脑垂体有差异($P < 0.05$),肺脏显著性差异($P < 0.01$),大脑、小脑、脑干差异非常显著($P < 0.01$),可以看出雌性较雄性脑组织所占体质量的百分比明显大。据有关文献报道,正常 SD 大鼠也存在雌性的脑组织、肺脏质量系数高于雄性^[9]。CSNB 大鼠的 ALP、BUN、TG、TP 在雌性小于雄性,但均较文献报道正常 SD 大鼠雌性值高^[10];血清电解质 K^+ 、 Na^+ 、 iCa 雌性低于雄性,但无差异。虽然以上各生化指标、电解质参数在绝对值上存在差异,但 CSNB 大鼠雌雄间并无统计学意义。CSNB 大鼠与日本京都大学医学研究所动物实验室测得的 SD 大鼠血清生化值相比较,CSNB 大鼠 TP 值偏低,ALT、AST、TG、CRE 明显高于 SD 大鼠值,其余指标相似^[11]。血清电解质参数与对照组相比无统计

学意义。CSNB 品系大鼠与相关文献报道 SD 大鼠在视电、脏器系数、血清生化等各项指标存在差别,不能排除品系、年龄、个体、营养、地理、理化、人为等多种因素的影响。对 CSNB 这种正在开发的实验动物资源,研究其血清生化参数、体质系数,用于保证 CSNB 品系稳定性,减少变异性,提供良好的视网膜遗传病动物模型有重要意义,对深入研究 CSNB 疾病的发病原因、病变过程及基因治疗提供了广阔的前景。

【参考文献】

- [1] Chang B, Hawes NL, Hurd RE, et al. Retinal degeneration mutants in the mouse[J]. *Vision Res*, 2002, 42(4): 517-525.
- [2] Zhang Z, Gu Y, Li L, et al. A potential spontaneous rat model of X-linked congenital stationary night blindness[J]. *Doc Ophthalmol*, 2003, 107(1): 53-57.
- [3] 张作明, 顾永昊, 李莉, 等. 类似先天性静止性夜盲症视觉电生理异常大鼠 1 例[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(1): 5-7.
- [4] 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.
- [5] Miyake Y, Yagasaki K, Horiguchi M, et al. Congenital stationary-night blindness with negative electroretinogram. A new classification[J]. *Arch Ophthalmol*, 1986, 104(7): 1013-1020.
- [6] Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, et al. Mutations in NYX, encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness[J]. *Nat Genet*, 2000, 26(3): 319-323.
- [7] Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, et al. Loss of function mutations in a calcium-channel α -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness[J]. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 264-267.
- [8] Fiona M, Noelle CO, John PV, et al. Mutation of the calcium channel gene *Cacnalf* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina[J]. *Human Mol Gene*, 2005, 14(20): 3035-3046.
- [9] 陈华, 李春海, 贺苏兰, 等. 性别因素对大鼠部分血液学、血液生化指标和脏器系数的影响[J]. 实验动物科学和管理, 1996, 13(1): 21-23.
- [10] 王茵, 楼正清, 来伟旗, 等. SD 大鼠血液生化指标正常参考值范围的探讨[J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14(2): 112-113.
- [11] <http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp>.