

## 论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1350-03

### RCS大鼠病变过程中视网膜电图振荡电位的频域特性分析

谢晶,陈莹迪,阴正勤,翁传煌 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心,视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室)

**[摘要]** 目的 观察皇家外科学院大鼠(royal college of surgeons, RCS)视网膜变性过程中的暗适应视网膜电图(electroretinogram, ERG)振荡电位(oscillatory potentials, OPs)频域特性。方法 选择出生后20、30、40 d及60 d的RCS大鼠各3只,采用RETI-scan记录系统进行闪光视网膜电图(flash electroretinogram, F-ERG) OPs记录,记录电极为环形角膜电极,参考电极为不锈钢针状电极,刺激强度为0 dB,通过Matlab提取OPs成分,分析其频谱特性。结果 相对于同龄的正常大鼠,RCS大鼠OPs频域幅值明显重度降低( $P < 0.01$ ),且高频成分缺失。RCS大鼠发育过程中,随着病程进展至40 d时对应的频率向高频部分明显延迟( $P < 0.05$ ),进展至60 d时其频域幅值明显降低( $P < 0.05$ )。结论 RCS大鼠ERG的OPs频域特性与视网膜功能的变性程度存在相关性,利用这些特性可以更明显观察到视网膜变性对大鼠视网膜功能的影响。

**[关键词]** 视网膜电图;振荡电位;皇家外科学院大鼠;频域分析

**[中图分类号]** R-332; R770.43; R774.13

**[文献标志码]** A

### Frequency domain analysis of dark-adapted oscillatory potentials of electroretinogram in RCS rats

Xie Jing, Chen Yingdi, Yin Zhengqin, Weng Chuanhuang (Center of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Visual Damage and Regeneration & Restoration, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the characteristics of frequency domain of dark-adapted oscillatory potentials (OPs) of electroretinogram (ERG) in Royal College of Surgeons (RCS) rats. **Methods** Different ages (20, 30, 40 and 60 d) of RCS-rdy<sup>-</sup>-p<sup>+</sup> rats were involved, and there were three rats of each age. Dark-adapted OPs of flash ERG (F-ERG) was recorded with RETI-scan system. Gold-foil ring cornea electrode was used as the recording electrode and home-made stainless steel needle electrode was used as the reference. The intensity of light was 0 dB. OPs components were extracted by software Matlab 7.0 and the characteristics of OPs were analyzed. **Results** Compared with the normal rats with same age, the frequency-domain amplitude of RCS rats significantly reduced ( $P < 0.01$ ) and the high-frequency components of RCS rats disappeared. With the development of the disease, the frequency of the peak amplitude was delayed to high frequency at 40 d ( $P < 0.05$ ), and the amplitude of the peak reduced significantly at 60 d ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** There is a correlation between the frequency-domain characteristics of OPs and the development of the disease in RCS rats. By using these characteristics, it is possible to know the influences of the disease on the retinal function of RCS rats.

**[Key words]** electroretinogram; oscillatory potentials; RCS rats; frequency-domain analysis

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2013CB967002). Corresponding author: Yin Zhengqin, Tel: 86-23-68754401, E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

皇家外科学院大鼠(royal college of surgeons, RCS)是一种用以研究视网膜变性疾病的经典模

型<sup>[1-2]</sup>。自1933年Granit提出了视网膜电图(electroretinogram, ERG)的三导程学说以来<sup>[3]</sup>, ERG的临床研究和应用日益广泛,一般认为ERG的不同成分来源于视网膜内不同的神经元贡献<sup>[4]</sup>。在视网膜色素变性患者及RCS鼠中均有其ERG一些特性的报道,主要集中在ERG的a波、b波上。振荡电位(oscillatory

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划,2013CB967002)

**[通信作者]** 阴正勤,电话:(023)68754401, E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1712.018.html> (2013-04-10)

potentials, OPs)是一组重叠在 ERG b 波上升支上具有较高频率、较低幅值的节律性小波<sup>[5]</sup>,一般认为起源于内层视网膜,可能来自于无长突细胞或抑制性反馈回路,且 OP1、OP2 和后面的成分来自不同的神经元<sup>[6]</sup>。近年来,随着信号分析技术的发展,对 OPs 的研究已经从时域分析进展到频域等分析方法<sup>[7-9]</sup>,本研究主要集中在 RCS 大鼠病变过程其 OPs 的频域特性及其与变性的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

Rcs-rdy<sup>-p</sup> + 大鼠出生后 20、30、40 d 及 60 d 各 3 只 6 眼(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),雌雄不限。外眼和检眼镜检查屈光间质清晰,眼底检查未见明显异常。动物予以 12 h/12 h 明-暗交替光照,不限食水,室温 18 ~ 23 °C 条件下饲养。

### 1.2 方法

采用 RETI-scan 系统视觉电生理检测仪(德国罗兰公司)记录闪光视网膜电图(flash electroretinogram, F-ERG)。刺激器为 Ganzfeld 全视野刺激器,记录电极为金箔环状角膜电极(德国罗兰公司),参考电极和接地电极为不锈钢自制针状电极,电极阻抗均 < 5 kΩ。大鼠双眼同时记录。记录前大鼠暗适应 12 h, 0.004 mL/kg 速眠新注射液(长春农牧大学兽医研究所)行肌内注射麻醉。复方托吡卡胺滴眼液点眼常规散瞳(日本参天制药公司),于暗红光下安放电极,记录电极分别置于双眼角膜,羧甲基纤维素钠滴眼液(美国爱利根公司)保持角膜湿润,参考电极分别刺入双侧颊部皮下,接地电极置于尾部。再次暗适应 10 min 后,行 ERG 记录。采用 0 dB(即 3 cd · s · m<sup>-2</sup>)刺激光强度进行刺激,刺激频率为 0.06 Hz,带宽为 0.2 ~ 300.0 Hz,每次刺激间隔 3 min。

### 1.3 数据处理方法

所有 ERG 数据导出后,使用 Matlab 7.4 提取 OPs 成分,再对其行傅里叶变换得出频谱;使用 Excel 及 SPSS 10.0 行后续数据处理,采用独立样本 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 与正常大鼠的比较

本实验室前期已经探讨了正常 LE(Long Evans)大鼠视网

膜电图振荡电位的频域特性<sup>[10]</sup>,发现相对于同鼠龄的 LE 鼠时 RCS 鼠幅频图的幅值明显降低( $P < 0.0001$ )。如图 1 所示,LE 鼠幅频图有 2 个峰值,分别在 95 Hz 和 120 Hz 左右,而 RCS 鼠仅有 1 个峰值在 100 ~ 110 Hz 之间。

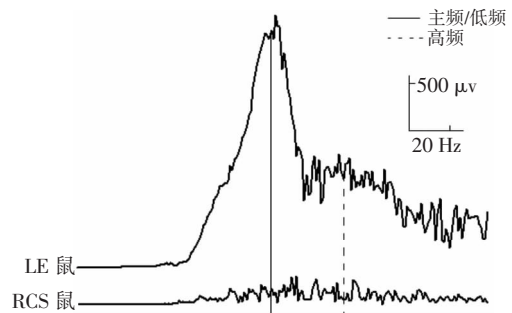


图1 光强为 0 dB 时 LE 鼠与 RCS 鼠(30 d) OPs 幅频变化

### 2.2 RCS 鼠自身发育过程中的 OPs 频域特性

当刺激光强为 0 dB 时,记录到不同鼠龄的 ERG 波形如图 2A 所示。从图中可以明显观察到 ERG 时域的特性,30 d 时波形比较明显,幅值较高,但 40 d 时已开始下降至 60 d 时波形成分已不明显。使用带通滤波器(100 ~ 500 Hz)提取 ERG 中的 OPs 成分,如图 2B 所示。通过傅里叶变换即可得出其对应的幅频图,如图 2C 所示。幅频图的常用特征指标主要是最大幅值以及其对应的频率。由于频谱中谐波成分较多,为了获得更准确的最大值,选取 80 ~ 120 Hz 内的等间隔(5 Hz)内的最大值,最后取其平均值作为该 OPs 幅频图的最大幅值  $\overline{A_{max}}$ 。如表 1 所示,随着年龄的增长(病变程度的加深)  $\overline{A_{max}}$  在 30 d 时最大,至 60 d 时已降至最初水平。不同组间比较发现 2 组有显著差异( $P < 0.05$ ),分别是 20 d 和 30 d 之间、30 d 和 60 d 之间。最大值  $\overline{A_{max}}$  (未取平均,即 100 ~ 120 Hz 内的最大值)对应的频率  $f_{max}$  结果如表 2 所示,随着病变程度的加深,  $f_{max}$  不断增加即频谱后移,但仅有 2 组间统计学差异较明显( $P < 0.05$ , 表 2),分别是 30 d 和 40 d 之间、30 d 和 60 d 之间。

表1 RCS 鼠病变过程  $\overline{A_{max}}$  的改变 ( $n = 6$ )

鼠龄(d)	$\overline{A_{max}}$	配对比较	P 值
20	52.2 ± 23.4	20 vs 30	0.023
30	120.2 ± 57.5	30 vs 40	0.092
40	73.2 ± 22.8	40 vs 60	0.115
60	53.3 ± 16.5	30 vs 60	0.021



A: ERG 波形; B: OPs 波形; C: OPs 幅频

图2 光强为 0 dB 时不同 RCS 鼠龄对应的波形变化 (从下到上依次为出生后 20、30、40 d 和 60 d; 红色方框内为变化明显波形部分)

表 2 RCS 鼠病变过程中  $f_{max}$  的改变 ( $n=6$ )

鼠龄(d)	$f_{max}$	配对比较	P 值
20	106.5 ± 7.5	20 vs 30	0.348
30	102.5 ± 6.7	30 vs 40	0.049
40	107.2 ± 6.3	40 vs 60	0.341
60	111.5 ± 8.5	30 vs 60	0.046

### 3 讨论

ERG 的 OPs 在基础研究及临床诊断中具有重要的应用价值<sup>[11]</sup>,但目前中对 OPs 的分析主要集中在时域,测量不同波形的幅值与峰时。有些疾病如糖尿病视网膜病变、视网膜色素变性,不论是在人还是在动物模型中,尤其是在病变的晚期均检测不到明显的 ERG 波形,频域分析的重要性就凸显出来。

本实验结果显示了视网膜色素变性疾病的动物模型 RCS 大鼠的 OPs 频域特性,相对于正常大鼠,其频域最大幅值明显降低,这是因为时域上幅值降低很明显。而频域的成分缺失(即缺少高频部分),成为 RCS 在频域另一个显著特征,Lei 等<sup>[12]</sup>报道视锥、视杆驱动的 OPs 的最大峰值对应频率分别为 70~90、100~120 Hz,说明 RCS 鼠的暗适应 ERG 的 OPs 缺少视锥成分。可能原因:一是 RCS 鼠频域的幅值均重度降低,视锥成分显得不明显,所以观察不到该成分;二是 OPs 的起源于视网膜内层,是多种通路的共同作用结果,即便在暗适应条件下,视杆细胞仍会引起视锥通路的反应<sup>[13]</sup>。RCS 鼠的缺失成分可能是由于视网膜病变缺少了该条通路的反应。

本研究还讨论了 RCS 鼠发育过程中其频域特性,随着鼠龄的增长,病变的程度加深,ERG 波形可以明显观察到不同成分幅值的变化,和 Pinilla 等<sup>[14]</sup>报道一致。在 40 d 时,虽然时域还有波形,但 OPs 的频谱图已经出现明显改变,且与 60 d 时比较,两者未出现明显差异,说明视网膜内层神经元在 40 d 已出现重度损伤。通过频域分析首次通过 ERG 检测到 RCS 病变过程中视网膜内层神经元的病变情况并给出较敏感的检测指标最大值对应的频率。

本研究分析了 RCS 鼠暗适应 ERG OPs 的频谱特性,并观察了病变过程对 OPs 频谱特性的影响,但是本研究选取大鼠的样本量偏少、年龄较为分散且没有对 OPs 进行较深入的分析,这也是后续工作的重点。由于 OPs 的起源仍不清楚,造成对 OPs 分析过程中许多不确定因素,所以研究正常大鼠 OPs 的起源就成为

关键问题。通过对大鼠 ERG 的 OPs 频域特性的分析,有助于对 OPs 的进一步理解,并为其临床应用提供了依据。

### 参考文献:

- [1] Bourne M C, Campbell D A, Tansley K. Hereditary degeneration of the rat retina [J]. Br J Ophthalmol, 1938, 22(10): 613-623.
- [2] Chen M, Wang K, Lin B. Development and degeneration of cone bipolar cells are independent of cone photoreceptors in a mouse model of retinitis pigmentosa [J]. PLoS One, 2012, 8(7): e44036.
- [3] 李海生,潘家普.视觉电生理的原理与实践[M].上海:上海科学普及出版社,2002:111-112.
- [4] Peachey N S, Ridder W H 3rd, Seeliger M W. Electrophysiologic assessment of the mouse visual system[J]. Doc Ophthalmol, 2007, 115(3): 125.
- [5] Zhou W, Rangaswamy N, Ktonas P, et al. Oscillatory potentials of the slow-sequence multifocal ERG in primates extracted using the Matching Pursuit method [J]. Vision Res, 2007, 47(15): 2021-2036.
- [6] Dong C J, Agey P, Hare W A. Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina [J]. Vision Neurosci, 2004, 21(4): 533-543.
- [7] 谢楠,郭学谦,田蓓,等.闪光视网膜电图时域、频域联合分析评价慢性高血压模型大鼠的视网膜功能[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(22):4281-4286.
- [8] Forte J, Bui B, Vingrys A. Wavelet analysis reveals dynamics of rat oscillatory potentials[J]. J Neurosci Methods, 2008, 169(1): 191-200.
- [9] Menzler J, Zeck G. Network oscillations in rod-degenerated mouse retinas [J]. J Neurosci, 2011, 31(6): 2280-2291.
- [10] 戴加满,陈莹迪,李世迎,等.正常大鼠视网膜电图振荡电位的频谱特性分析[J].中华实验眼科杂志,2012,30(10):919-921.
- [11] Marmor M F, Fulton A B, Holder G E, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update) [J]. Doc Ophthalmol, 2009, 118(1): 69-77.
- [12] Lei B, Yao G, Zhang K, et al. Study of rod- and cone-driven oscillatory potentials in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(6): 2732-2738.
- [13] Lei B. Rod-driven OFF pathway responses in the distal retina: dark-adapted flicker electroretinogram in mouse [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43856.
- [14] Pinilla I, Lund R D, Sauve Y. Contribution of rod and cone pathways to the dark-adapted electroretinogram (ERG) b-wave following retinal degeneration in RCS rats [J]. Vision Res, 2004, 44(21): 2467-2474.

(收稿:2013-03-02;修回:2013-03-26)

(编辑 王 红)