

猪眼基底玻璃体视网膜界面的超微结构观察

熊义斌

作者单位:(528500)中国广东省佛山市高明区人民医院眼科
作者简介:熊义斌,男,眼科博士,副主任医师,研究方向:玻璃体视网膜疾病。

通讯作者:熊义斌. billwoods88@yahoo.com.cn

收稿日期:2012-09-17 修回日期:2013-03-29

Ultrastructure of basal vitreo - retina interface in enucleated pig eyes

Yi-Bin Xiong

Department of Ophthalmology, People's Hospital of Gaoming District, Foshan 528500, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yi-Bin Xiong. Department of Ophthalmology, People's Hospital of Gaoming District, Foshan 528500, Guangdong Province, China. billwoods88@yahoo.com.cn

Received:2012-09-17 Accepted:2013-03-29

Abstract

• **AIM:** To investigate the ultrastructure of the basal vitreo-retina interface in enucleated pig eyes after vitreous injection of enzymes.

• **METHODS:** Totally 130 eyes were obtained from freshly slaughter pigs and divided into 5 groups. Each group was sub-divided into the 15 minutes group and the 30 minutes group, with 13 eyes in each group. The control group were performed middle vitreous injection of 0.1mL PBS, 200U/mL and 800U/mL hyaluronidase (HA) were injected in groups A and B, 10U/mL and 50U/mL chondroitinase (CA) in groups C and D. After incubation for 15 minutes and 30 minutes, the eye balls were fixed with 4% glutaraldehyde and retina fixative solution. Pathological examination, eosin-hematoxylin staining, scan electron microscopy were taken to evaluate the remaining vitreous on vitreous base, transmission electron microscopy to evaluate retina toxicity.

• **RESULTS:** Both of gross appearance and hematoxylin + eosine slice all revealed basal vitreous partially liquefied and degradation. Remarkably decrease was found in basal vitreous than the control group both in the HA 800U/mL group and the CA 50U/mL group when using electron microscopy scanning. Transmission electron microscopy in group B, C and D revealed the remaining vitreous were less than the control group.

• **CONCLUSION:** Both CA and HA can cause basal vitreoretinal detachment in enucleated pig eyes. But the HA may cause less damage to the retina.

• **KEYWORDS:** basal vitreous; ultrastructure; hyaluronidase; chondroitinase A

Citation: Xiong YB. Ultrastructure of basal vitreo-retina interface in enucleated pig eyes. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(4):667-670

摘要

目的:观察离体猪眼玻璃体腔内注射酶后基底玻璃体视网膜界面的超微结构。

方法:取新鲜尸体猪眼 130 眼,随机均分 A,B,C,D 及对照组共 5 组,每组再分为 2 小组,每小组各 13 只。其中 A 和 B 组为透明质酸酶(hyaluronidase, HA)组,分别于玻璃体腔内注射终浓度为 200,800U/mL 的 HA 0.1mL;C 和 D 组为软骨素酶(chondroitinase, CA)组,分别于玻璃体腔内注射终浓度为 10,50U/mL 的 CA 0.1mL;对照组玻璃体内注射磷酸缓冲盐(PBS)0.1mL。各组的眼球分别在 37℃ 下水浴 15min 和 30min 后取出,经 4% 戊二醛和自配视网膜固定液固定,行石蜡切片苏木素-伊红染色检查、基底扫描电镜检查及透射电镜检查,观察基底玻璃体视网膜情况。

结果:病理检查显示,大体标本和切片均见基底玻璃体有部分液化、降解;扫描电镜显示,CA 50U/mL 组和 HA 800U/mL 组均可见基底玻璃体与对照组相比有显著减少;透射电镜显示,实验组(B,C,D 组)各组玻璃体视网膜界面残余纤维较对照组明显减少。

结论:体外使用 HA 和 CA 均可诱导猪眼基底玻璃体脱离,但 CA 可能引起的眼内副作用更大。

关键词:玻璃体基底;超微结构;透明质酸酶;软骨素酶
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.04.06

引用:熊义斌.猪眼基底玻璃体视网膜界面的超微结构观察.国际眼科杂志 2013;13(4):667-670

0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是孔源性视网膜脱离手术失败的最主要因素^[1,2]。根据 PVR 发生部位可以分为前段 PVR(anterior proliferative vitreoretinopathy, aPVR)和后段 PVR,其中 aPVR 于 1980 年代由 Charles 和 Schepens 首先观察到,其后越来越多的眼科学家益发认识到 aPVR 在临床中的重要作用^[3]。基底玻璃体在 aPVR 的形成和发展中起着重要作用:一方面为增殖膜提供支架,另一方面在增殖膜收缩时起着传导力量的作用。基底玻璃体的牵引也是复发视网膜脱离的最主要的机制。通过牵拉可以形成新的裂孔,或使旧裂孔再次打开,从而导致手术失败^[4]。

彻底清除基底玻璃体成为预防 aPVR 的关键。单纯手术清理基底玻璃体会压迫巩膜本身,会导致眼球变形,引起眼内结构改变;或引起视网膜和血管的损伤;或损伤或损失晶状体;或需要术者和助手之间良好的配合。因此,要彻底清除基底玻璃体,有必要借助其他的辅助手段。

既往已经有学者单用透明质酸酶 (hyaluronidase, HA)或软骨素酶(chondroitinase, CA),或结合其他手段来诱导玻璃体后脱离 (posterior vitreous detachment, PVD)^[5,6],也有学者曾观察过该酶对基底部玻璃体的作用,发现在致PVD的剂量-时间模式下并不能诱发基底部玻璃体脱离^[7]。因此对于该酶是否可引起基底部玻璃体脱离意见不一。我们曾对该酶在兔眼基底部玻璃体的化学作用做了相关研究^[8],但该酶对猪眼基底部显微结构的改变则鲜有报道。本研究中我们选取新鲜的猪眼注射HA及CA,观察酶对于基底部玻璃体的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 取即时屠宰的新鲜猪眼130眼,置入冰壶中保存30~45min。主要药物:透明质酸酶(hyaluronidase, HA)和软骨素酶ABC(chondroitinase, CA)由美国Sigma公司生产。辅助溶剂(BSA powder)由Sigma生产。自制视网膜固定液配方:10mL 750mL/L乙醇+10mL冰醋酸+80mL 100mL/L多聚甲醛。

1.2 方法

1.2.1 猪眼分组 对照组:注射磷酸缓冲盐液(PBS),15min和30min各1组,每组13只;A组:注射200U/mL HA,15min和30min各1组,每组13只;B组:注射800U/mL HA,15min和30min各1组,每组13只;C组:注射10U/mL CA组,15min和30min各1组,每组13只;D组:注射50U/mL CA组,15min和30min各1组,每组13只。

1.2.2 药物配制及稀释 按说明书要求取BSA粉剂,溶于蒸馏水中配成pH=8.0的缓冲溶剂液。分别称取HA和CA,配成最终浓度为200,800U/mL的HA及10,50U/mL的CA溶液。

1.2.3 药物眼内注射及眼球固定 将冰壶内的新鲜猪眼取出,氯化汞及青-链霉素双抗溶液中各冲洗3遍后,置入37.5℃水浴箱复温30min,此时测得眼内温度为酶最佳效应温度37℃。以1mL注射器于12:00位沿角膜缘后4~5mm按上述分组分别注入相应的溶液各0.1mL,再按分组分别维持37.5℃水浴15min和30min后,分别于球周刺6~8个微孔以便固定进入玻璃体内,之后每组随机取3眼置入4℃的戊二醛液固定,其余眼球置于视网膜固定液中。

1.2.4 大体病理观察 将4℃戊二醛浸泡24h后的3眼猪眼,用剃须刀片小心自前向后作矢状轴切开,观察玻璃体有无液化情况并照相。

1.2.5 组织病理切片检查 将视网膜固定液固定24h后的眼球以石蜡包埋,按病理常规制作切片,苏木素-伊红(HE)染色,于光学显微镜下观察玻璃体基底部及视网膜情况。

1.2.6 扫描电镜检查 采用上述经4℃戊二醛浸泡24h后切开的眼球,于12:00位锯齿缘前后3mm处取带巩膜瓣的玻璃体视网膜标本,pH=7.2磷酸缓冲液清洗60min;经300,500,700,800,900,1000mL/L乙醇梯度脱水,其中1000mL/L乙醇进行2~3次,每级浓度脱水时间为30min;醋酸异戊脂浸泡60min脱水后采取二氧化碳临界点干燥法干燥(干燥器 Philip. BAL-TEC, CPD030);离子镀膜法喷金后行扫描电镜观察(离子溅射仪为BAL-TEC SCD005型)。

表1 各组切片发生基底部玻璃体脱离的情况

分组	阳性眼球个数	阳性眼球所占比例
对照组 15min 组	0	0/10
对照组 30min 组	0	0/10
A 组 15min 组	0	0/10
A 组 30min 组	1	1/10
B 组 15min 组	1	1/10
B 组 30min 组	3	3/10
C 组 15min 组	1	1/10
C 组 30min 组	1	1/10
D 组 15min 组	3	3/10
D 组 30min 组	5	5/10

1.2.7 透射电镜观察 采用上述经4℃戊二醛浸泡24h后切开的眼球,取扫描电镜附近带巩膜瓣的玻璃体视网膜标本,再以250mL/L戊二醛固定20min,将标本置于4℃高锰酸钾溶液中1h,0.1mol/L磷酸缓冲液冲洗3次,每次15min,常规脱水、包埋后行透射电镜观察。

统计学分析:所有结果使用SPSS 13.0软件包分析,采用Fisher精确检验和蒙特卡罗(Monte Carlo)法,分析各组眼球发生玻璃体脱离在时效、量效上的相关性,取 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 大体病理观察结果 剖开眼球后,见玻璃体腔内玻璃体有不同程度的液化,其中B组HA 800U/mL较A组HA 200U/mL组液化明显,D组CA 50U/mL较C组CA 10U/mL液化明显;同一种药物相同浓度下30min作用组较15min组液化明显。玻璃体液化呈现出量效关系和时效关系。

2.2 HE染色结果 发现玻璃体呈现不同程度液化,周边基底部及后极部可见玻璃体脱离或部分脱离,部分玻璃体皮质粘连于血管弓、视乳头等处,未脱离玻璃体表现为致密黏稠状或树根状(图1A,B,C),已发生脱离的区域则较少玻璃体皮质残留(图1D)。各组发生基底部玻璃体脱离的情况见表1,实验眼中A组15min和30min时脱离率分别为0和10%;B组中15min和30min时分别为10%和30%;C组中15min和30min时各为10%;D组中15min和30min时则各有30%和50%。采用Fisher精确检验,未发现脱离与时间和浓度相关性(双侧 $P=1.0$,单侧 $P=0.536$)。采用蒙特卡罗法分析其出现阴性结果的相关性,未发现脱离与时间和浓度相关性(双侧 $P=0.990$)。

2.3 扫描电镜观察结果

2.3.1 对照组猪眼基底部扫描电镜结果 扫描电镜下见对照组猪眼(图2A)基底部玻璃体浓密,呈“棉絮”状或板层状;玻璃体与内界膜附着紧密,基底部附着面广,邻近玻璃体中央部纤维呈束状分布。

2.3.2 A组透明质酸酶200U/mL 15min和30min扫描电镜结果 扫描电镜下见玻璃体与对照组无明显差异:玻璃体残余量多,基底部及周边部玻璃体均可见剩余,尤其以基底部为明显。残余玻璃体呈现结节团块状或“树根”状。15min作用组和30min作用组无明显差异(图2B)。

2.3.3 B组透明质酸酶800U/mL 15min和30min扫描电镜结果 扫描电镜下见残余玻璃体与对照组相比有明显

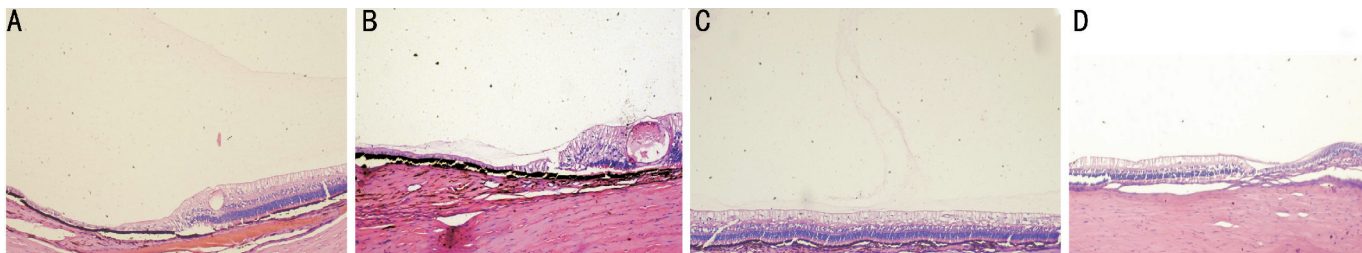


图1 基底部玻璃体视网膜组织切片(HE×200) A:对照组及A组可见基底部玻璃体纤维致密附着于睫状体;B:B组可见基底部玻璃体部分脱离;C:C组可见基底部玻璃体部分脱离,残余玻璃体纤维呈“树根”样;D:D组基底部玻璃体视网膜界面光滑,未见玻璃体纤维残留。

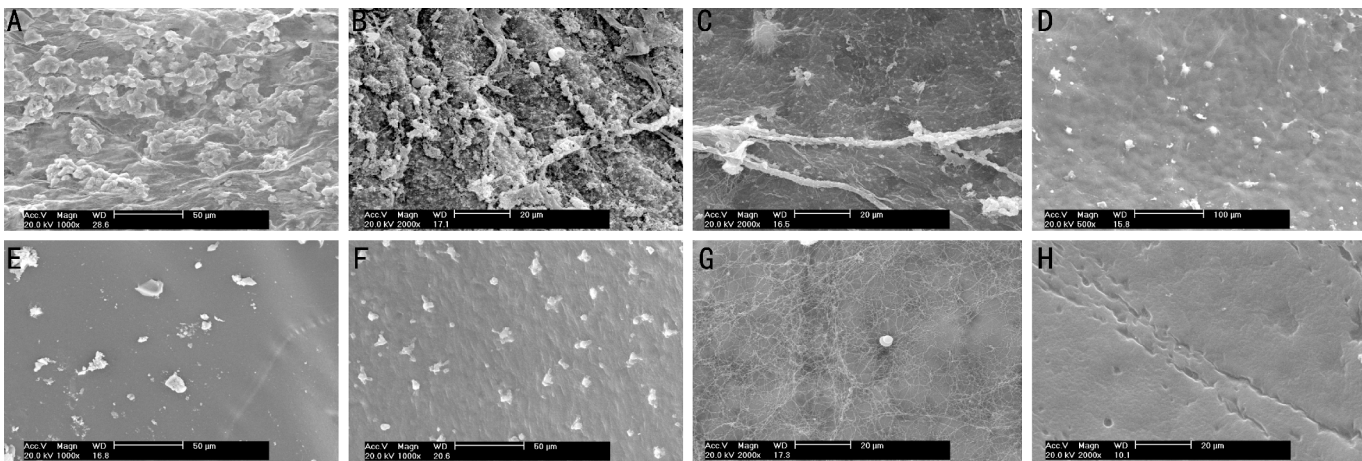


图2 扫描电镜下所见基底部玻璃体视网膜界面 A:对照组及PBS注射组可见玻璃体纤维呈棉花状牢固黏附于玻璃体视网膜界面;B:A组可见较少的玻璃体纤维存在;C/D:B组可见较少的玻璃体纤维黏附于玻璃体视网膜界面,残留的纤维呈树根样,与病理切片结果一致;E/F:C组残余玻璃体较前明显减少,显示基底部玻璃体视网膜脱离;G/H:D组残余玻璃体纤维进一步减少,残余玻璃体纤维呈“渔网”样;Bar=20μm。

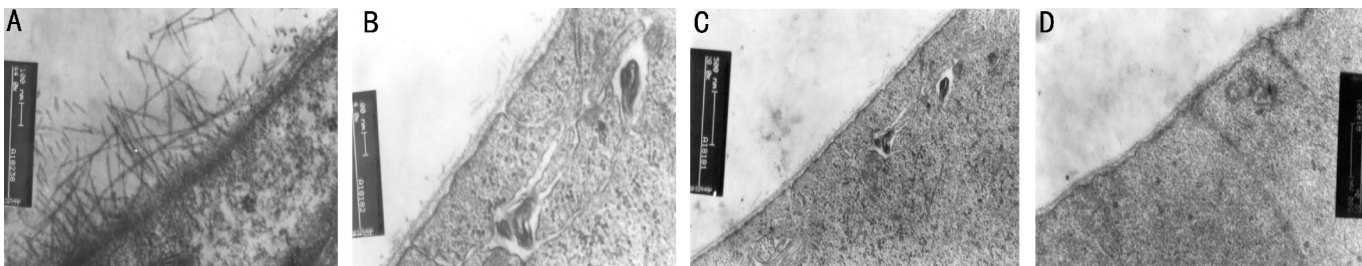


图3 透射电镜下所见基底部玻璃体视网膜交界面 A:PBS注射组可见大量玻璃体纤维附着于玻璃体视网膜界面;B/C/D:B,C,D组玻璃体纤维明显减少;Bar=100μm。

减少,其中30min作用组较前组稍明显。二者扫描区域内均可见残余玻璃体呈现结节状,或细小点状,下方可见类似“根”的纤维丝状物连接于结节团块和内界膜之间(图2C,D)。

2.3.4 C组软骨素酶10U/mL 15min和30min扫描电镜结果 扫描电镜下残余玻璃体与对照组相比可见玻璃体表现为浓密团块状及结节样结构;两个时间组差别不明显(图2E,F)。

2.3.5 D组软骨素酶50U/mL 15min和30min扫描电镜结果 扫描电镜表现类似于HA 800U/mL组。本组残余量进一步减少,剩余玻璃体的结节体积减小,残余玻璃体纤维表现为网状,或网状与结节状共存。可见部分区域呈现光滑镜面表现(图2G,H)。

2.4 透射电镜观察结果 玻璃体视网膜界面透射电镜观察显示,内界膜完整,未见明显破坏性改变。比较对照组

(图3A)及实验组(B/C/D)(图3B,C,D),可见透射电镜下实验组残余纤维明显减少。

3 讨论

研究中发现猪眼基底部玻璃体最基本的构成是两种纤维:结节状和丝状,我们认为正是因为两种玻璃体纤维的存在,从而导致随着两种纤维数量及分布比例多寡的不同,而在不同的部位玻璃体表现为更多的形态。Wang等^[9]研究也发现在人类不同年龄的人眼基底部玻璃体表现为交织的绳索状、层状、树根状等,与我们的结果一致。人眼与猪眼种属接近,均属大型哺乳动物,理论上其基底部玻璃体形态具有某种类似性,但由于人眼获取十分有限,因此我们选用猪眼这种廉价并且容易获得的动物模型来研究药物对基底部玻璃体的作用。我们采用病理切片、扫描电镜及透射电镜的方法来观察离体猪眼基底部的玻璃体纤维结构,发现在没有药物干预时对照猪眼基底部玻

璃体牢固地附着在基底膜上,表现为板层状、致密雪团状、粗大树根状、结节状(大结节和小结节)、丝网状、平滑镜面状等多种形态。这与 Gandorfer 等^[10]将纤维蛋白酶注射到猪眼玻璃体腔,发现猪眼玻璃体纤维表现为多种形态的结果类似。

生化研究表明,正常的玻璃体与视网膜间界面的黏附作用由玻璃体皮质与视网膜内界膜间大分子的相互作用来产生。这些大分子包括层黏连蛋白、纤维连接蛋白、硫酸软骨素及其它细胞外基质的组成成分,它们作为一种分子胶来维持玻璃体与内界膜间的黏附。酶辅助下的玻璃体切除术早有人提出,目前应用的酶很多,但仅限于实验阶段,已有报道发现 HA 和 CA 可导致玻璃体后脱离,其作用的机制可能是与 HA 和 CA 可以水解硫酸软骨素和透明质酸等大分子键有关,如 2-乙酰-2-脱氧-D-葡萄糖和 D-葡萄糖醛酸之间的 β -1,4 糖苷键等,而这些分子结构是构成玻璃体皮质与视网膜内界面连接的主要结构,但对于以上两种酶是否能够诱导基底部玻璃体脱离尚存在争论。

本实验中我们以离体猪眼为研究对象,观察比较了两组药物不同剂量和时间下经玻璃体腔注射后对基底部玻璃体的影响,发现在较高浓度下二者均有一定的效果,尤其是 CA。这与 Hageman 等^[11]曾报道恒河猴身上所取的结果较一致。本实验通过对离体猪眼玻璃体腔中央注射 CA 和 HA,发现 CA 在 10U/mL 和 50U/mL, HA 在 800U/mL 经 15min 和 30min 均可不同程度地引起局部基底部玻璃体脱离,与以往结果相比,本实验之所以可以引起基底部玻璃体降解,还有一个原因是我们采取的剂量较以前相比明显加大。实验结果证实对离体猪眼上述二酶是有效的,这为进一步体内研究提供了可靠依据。考虑到种属的差异性,HA 和 CA 能否诱导人眼基底部玻璃体的降解,其对人眼视网膜会造成什么样的影响,目前尚属未知。

由于制作一个电镜标本的费用相对较高,我们对于电镜结果的观察采取的是随机抽样的方法,同时选取一个钟点部位的取样标本,而未能作全面的基底部玻璃体视网膜界面的分析,所得的结论还需要进一步的验证。理想的取样,最好能行所有眼内注药眼球的常规电镜检查,同时对于每一个眼球能够做到全周各钟点的基底部玻璃体视网膜界面的观察,这样才能比较详实客观地评价酶对于基底部玻璃体的作用。

参考文献

- 1 Elnor SG, Elnor VM, Díaz-Rohena R, et al. Anterior proliferative vitreoretinopathy. Clinicopathologic, light microscopic, and ultrastructural findings. *Ophthalmology* 1988;95(10):1349-1357
- 2 Aaberg TM. Management of anterior and posterior proliferative vitreoretinopathy. XLV Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 1988;106(5):519-532
- 3 Schepens CL. Letters to the editor. *Ophthalmology* 1987;94:201
- 4 Foster RE, Meyers SM. Recurrent retinal detachment more than 1 year after reattachment. *Ophthalmology* 2002;109(10):1821-1827
- 5 Tanaka M. Safety of *in vivo* pharmacologic vitreolysis with recombinant mivoplasmin in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:656
- 6 Harooni M. Efficacy and safety of enzymatic posterior vitreous detachment by intravitreal injection of hyaluronidase. *Retina* 1998;18:16-22
- 7 Hikichi T, Kado M, Yoshida A. Intravitreal injection of hyaluronidase cannot induce posterior vitreous detachment in the rabbit. *Retina* 2000;20(2):195-198
- 8 熊义斌,朱晓波. 基底部注射透明质酸酶诱导兔眼基底部玻璃体脱离. *中山大学学报(医学科学版)* 2009;30(2):215-218
- 9 Wang J, McLeod D, Henson DB, et al. Age-dependent changes in the basal retinovitreal adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):1793-1800
- 10 Gandorfer A, Putz E, Welge-Lüssen U. Ultrastructure of the vitreoretinoretinal interface following plasmin assisted vitrectomy. *Br J Ophthalmol* 2001;85:6-10
- 11 Hageman GS, Russell SR. Chondroitinase-mediated disinsertion of the primate vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(4):1260