

兔视网膜脱离后出现神经感觉层细胞凋亡

王志玉, 李玉娟, 史爱云

作者单位:(355000)中国福建省福安市,宁德市闽东医院眼科
作者简介:王志玉,毕业于新乡医学院,硕士,目前负责承担省级科研项目2项,研究方向:玻璃体视网膜疾病。
通讯作者:王志玉. wangzhiyuxy@126.com
收稿日期:2009-12-10 修回日期:2010-02-04

Experimental research on sensory layer cell apoptosis of detached retina

Zhi-Yu Wang, Yu-Juan Li, Ai-Yun Shi

Department of Ophthalmology, Ningde Mindong Hospital, Fuan 355000, Fujian Province, China

Correspondence to: Zhi-Yu Wang. Department of Ophthalmology, Ningde Mindong Hospital, Fuan 355000, Fujian Province, China. wangzhiyuxy@126.com

Received:2009-12-10 Accepted:2010-02-04

Abstract

• **AIM:** To observe the phenomenon of sensory layer apoptosis in detached retina, and further to study the apoptosis mechanisms providing the rationale for clinical treatment.

• **METHODS:** Completely random design was applied. Forty healthy pigment rabbits without oculopathy were divided into 8 groups, 1 hour, 3 hours, 1 day, 3, 7, 14, 28 days after retinal detachment(RD) and normal control, 5 rabbits in each group. Right eye of each rabbit was treated with infusing sodium hyaluronate under retinal neuro-epithelium layer. The eyeballs were enucleated at different times after RD. The morphologic changes of the retina were observed by electron microscopes. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique was used to assess apoptosis.

• **RESULTS:** There was cell apoptosis in sensory layer after detachment of retina, but almost not observed in retinas from control, 14 days and 28 days eyes. They were abundant at 1 hour, 3 hours, 3 days, 7 days after RD, peaked at 3 days, and dropped precipitously at 7 days after detachment. Every multiple comparison among the groups of 1 hour, 3 hours, 1 day, 3 days and 7 days after RD showed significant difference in comparing of apoptotic cells ($P < 0.01$). An obvious change of cell number was found comparing each of 1 hour, 3 hours; 3 days and 7 days with each of normal control, 1 hour, 1 day and 28 days ($P < 0.01$). But there was no significant difference of multiple comparison among control group, 1

hour, 14 days and 28 days group after RD.

• **CONCLUSION:** Apoptosis is an important mechanism of sensory layer cell degeneration after RD.

• **KEYWORDS:** retinal detachment; sensory layer; apoptosis; retina

Wang ZY, Li YJ, Shi AY. Experimental research on sensory layer cell apoptosis of detached retina. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):456-458

摘要

目的:研究实验性视网膜脱离(retinal detachment, RD)及脱离复位后神经感觉层细胞凋亡情况,探讨RD后视功能损害的机制为临床治疗提供理论基础。

方法:健康成年无眼部疾病青紫兰兔40只,采用计算机随机数字表法分为RD后1, 3h;1, 3, 7, 14, 28d组及正常对照组,共8组,每组5只,选取右眼为致伤眼,视网膜下注射透明质酸钠建立RD模型;分别于建立模型后按时获取兔眼标本,以TUNEL法观察视网膜神经感觉层细胞的凋亡情况。

结果:视网膜脱离复位后存在着神经感觉层细胞凋亡现象,正常对照组、14d和28d组几乎不见凋亡细胞,脱离后1, 3h;3, 7d组在视网膜各细胞层均出现较多的、具有凋亡形态学与生化改变特征的凋亡细胞,其中在3d组视网膜感觉层细胞凋亡细胞数量达到高峰。视网膜神经感觉层凋亡细胞数目在1, 3h;3, 7d组之间两两比较均有显著性差异($P < 0.01$);1, 3h;3, 7d组与正常对照组、1h;1, 28d组之间两两比较均有显著性差异($P < 0.01$);正常对照组、1h;14, 28d组之间两两比较无显著性差异。

结论:RD复位后,神经感觉层细胞发生凋亡。

关键词:视网膜脱离;神经感觉层;细胞凋亡;视网膜

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.017

王志玉,李玉娟,史爱云.兔视网膜脱离后出现神经感觉层细胞凋亡.国际眼科杂志2010;10(3):456-458

0 引言

视网膜脱离(retinal detachment, RD)是临床常见的致盲性眼病。随着基础研究的深入和临床手术器械及技术的发展,RD术后解剖复位率得到较大提高,但视功能恢复仍不理想。近年来研究发现RD后出现光感受器损伤、视网膜内外层变性坏死,常伴有不同程度的细胞凋亡,同时视功能的损害与P53, bcl-2等基因有不同程度的相关性^[1,2]。我们建立RD动物模型,在RD组织进行电镜和TUNEL染色观察,旨在探讨RD的发病机制,为临床治疗探寻新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康无眼部疾病青紫兰兔 40 只, 福建医科大学动物中心提供, 体质量 2 ~ 3kg, 雄雌兼用, 外眼及眼底检查正常, 计算机随机数字表法进行分组, 分为 RD 后 1, 3h; 1, 3, 7, 14, 28d 组及正常对照组, 共 8 组, 每组 5 只。

1.2 方法 按以往报道的方法建立 RD 模型^[3,4]。选取右眼为实验眼, 以 5g/L 托吡卡胺(日本参天制药株式会社)散瞳, 采用 30g/L 戊巴比妥钠 1mL/kg 兔耳缘静脉麻醉。在角膜缘处进行前房穿刺降低眼压, 颞下方角巩缘后 2.0mm 处, 20G 巩膜穿刺刀刺穿巩膜。于角膜表面置前置镜, 显微镜下, 伸入 27G 前房注射针(美国 Beaver 公司), 在视盘颞侧 3PD 处视网膜上造孔(裂孔约 1/2PD), 然后向视网膜下缓慢推注 1g/L 透明质酸钠 0.2mL(上海建华精细生物制品有限公司), 可见整个后极部视网膜呈境界清楚的灰白色隆起, 范围约 10PD, 直到赤道前。所有造模由同一操作者序贯完成。术后观察均有 RD。裂孔闭合较快, 3d 后已只隐约可见, 7d 后全部 RD 模型裂孔已不可见; RD 能维持 9 ~ 12 (平均 10.2)d, 14d 后所有眼视网膜在眼底镜下观察及 B 超检查均已复位。实验兔均在同一条件、不同时间点进行眼部伤情观察, 眼底检查是在用散瞳剂充分散瞳后用直接检眼镜对包括周边部在内的眼底结构进行细致的检查。眼部检查由同一名高年资眼科医师完成。严格按照德国 Roche Molecular Biochemicals 公司 TUNEL 染色检测方法操作。以细胞核染色呈棕黄色为阳性标志, 同时符合凋亡细胞形态(核固缩或核质碎裂贴边, 出现核周空泡)才能判定为凋亡染色阳性细胞。细胞计数采用在高倍镜下($\times 400$)使用 0.5 网形目镜尺(5mm \times 5mm, 各分为 10 等分, 上海第三光学仪器厂)分别计数 2.5mm² 视网膜面积里的凋亡阳性细胞数。双目检验镜下($\times 400$ 倍)对神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)、内核层(inner nuclear layer, INL)和外核层(outer nuclear layer, ONL)的阳性细胞计数。各个包埋块取两张切片, 每张切片于对称部位(距视盘 1.33mm 处左右两侧)各取一个视野进行观测, 4 个测量值相加取平均值作为每眼的最终观察值。透射电镜标本制备: 常规经由兔耳缘静脉空气栓塞处死动物, 摘取兔眼球后, 在垫有冰液的平皿上, 沿赤道部剖开眼球, 迅速去除角膜、晶状体及玻璃体, 置体积分数 2.5g/L 的戊二醛磷酸缓冲液中 4℃ 下固定 3 ~ 4h, 将眼杯后极部视盘颞侧组织切成 1mm \times 3mm 的条块, 放入 pH7.2 的磷酸缓冲液中 4℃ 以下浸洗后, 10g/L 锇酸固定 40min, 巴比妥缓冲液浸洗, 梯度乙醇、丙酮脱水, 无水乙醇与环氧树脂浸透、包埋, 半薄切片定位。定位后将标本修成块状, 超薄切片机将标本切成 40 ~ 60 μ m 厚的薄片, 铜网捞片, 醋酸铀和枸橼酸铅双重染色, 电子显微镜观察并拍照。电子显微镜由专业技术人员操作。

统计学分析: 对数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理, 首先进行方差齐性检验, 符合正态分布采用方差分析中均数的两两比较进行分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电镜观察 正常组兔眼内界膜(inner limiting membrane, ILM)为一电子密度均匀、染色一致的结构; 神

经纤维层(nerve fiber layer, NFL)微管及线粒体清晰可见; 视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)核较大, 核仁、线粒体、内质网及核蛋白体清晰可见, 线粒体呈圆形或长梭形, 可见大量游离核糖体及微管; 内核层中双极细胞呈圆形或椭圆形, 胞质内可见线粒体等细胞器; 外核层排列紧密, 染色质分布均匀; 外节盘膜密集呈板层状排列, 整齐有序, 与视网膜色素上皮层(retinal pigment epithelium, RPE)顶端微绒毛相嵌排列。RD 后 1h 组 NFL 线粒体肿胀, 嵴变短甚至消失, 微管减少或消失; GC 计数减少, 核浓缩, 电子密度加深且不均匀, 线粒体、内质网肿胀, 线粒体嵴消失; ONL 细胞核浓缩, 核膜电子密度加深且不均匀, 感光细胞外节盘膜排列紊乱并有局限性断裂、脱离。RD 后 3h 组 RGC 和 INL 细胞线粒体仍肿胀, 嵴模糊不清, 核染色质浓缩, 体积缩小, 密度增加, 核膜厚薄不均。RD 后 1d 组 RGC 和 INL 细胞核体积缩小, 可见凋亡小体, 表明存在凋亡现象。RD 后 3d 组 RGC 和 INL 细胞核体积缩小, 核碎裂, 凋亡小体多见, 外核层亦可见到凋亡小体的存在。RD 后 7d 组 RGC 和 INL 细胞核体积基本正常, 局部仍可见胞核浓缩、核膜电子密度不均匀。RD 后 14d 和 28d 组 RGC 和 INL, ONL 结构正常, 核仁清晰可见、细胞器丰富, 线粒体结构清楚, 染色质分布均匀。

2.2 TUNEL 结果 正常组凋亡细胞 0.60 ± 0.843 ; RD 后 1h 组 0.70 ± 0.82 ; 3h 组 9.00 ± 1.33 ; 1d 组 15.60 ± 1.43 ; 3d 组 26.10 ± 1.79 ; 7d 组 2.90 ± 1.79 ; 14d 组 0.80 ± 0.92 ; 28d 组 0.71 ± 0.83 。正常对照组视网膜神经感觉层各细胞层(GCL, INL 及 ONL)几乎不可见 TUNEL 阳性细胞; RD 后 1, 3h; 3d 组在视网膜神经感觉层各细胞层均可见 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞, 呈均匀淡染的棕黄色; 其中 3h 组 TUNEL 阳性细胞散在分布, 以 INL 居多; 1, 3d 组视网膜神经感觉层 TUNEL 阳性细胞数目明显增多, 并以 GCL 及 INL 为最多, 3d 时达到高峰; 7d 组 TUNEL 阳性细胞数目明显减少, 有的片子上甚至几乎不可见。正常对照组、14d 和 28d 组无 TUNEL 阳性细胞。视网膜脱离后 1, 3h; 3, 7d 组之间两两比较均有显著性差异($P < 0.01$), 1, 3h; 3d 组及 7d 组与正常对照组、1h; 1, 28d 组之间两两比较均有显著性差异($P < 0.01$); 正常对照组、1h; 14, 28d 组之间两两比较, 无显著性差异。

3 讨论

细胞凋亡通常表现为核固缩呈新月形, 细胞体积小, 细胞膜皱缩, 无核膜破裂, 细胞质浓缩, 细胞核和细胞质被结构完整的细胞膜包绕分割成许多凋亡小体, 不发生炎症反应, 是单一细胞发生死亡的行为; 凋亡小体的多种细胞器如内质网、溶酶体、线粒体结构多保持完整; 其重要的生化特征是 DNA 片断化。常用检测细胞凋亡的方法有形态学辨认、DNA 琼脂糖电泳、DNA 片断切口末端标记法及流式细胞仪等。本实验模型制作方法相对简单, 可在 RD 时及 RD 复位后这一连续病理过程中进行观察, 运用光镜、透射电镜和原位缺口标记法(TUNEL)检测细胞凋亡, 具有相当的准确性。

我们采用视网膜下直接注射透明质酸钠的方法建立 RD 模型, 比较符合人眼 RD 的发病过程^[5,6]。透明质酸钠吸收后视网膜可以自行复位, 这样可以连续观察、研究 RD

发生时和复位后的视网膜的病理过程。我们观察到 RD 后 3h 视网膜外核层即出现大量阳性细胞,一直持续到 7d 时,其中在 3d 视视网膜神经细胞感觉层凋亡细胞数量达到高峰,与以往研究结果一致^[7-10]。我们发现,内核层 7d 时存在大量阳性细胞,14d 视网膜复位早期仍可见到少量阳性细胞,说明 RD 对光感受器细胞影响较大,这与文献报道的 RD 中的凋亡表现类似^[11]。凋亡细胞在 RD 视网膜的持续存在,并且逐渐由外核层向内核层发展,提示凋亡在 RD 的发病机制中发挥了非常重要的作用。以往研究表明^[7,12],RD 复位后视网膜细胞发生凋亡不仅导致光感受器细胞丧失,而且以双极细胞为主的内核层和神经节细胞发生的凋亡将导致视信息在二级和三级传导通路上发生传导障碍,影响视网膜功能的恢复。本实验对复位的视网膜进行研究,发现复位的视网膜细胞亦有凋亡发生,凋亡细胞主要分布在内外核层和神经节细胞层,随着视网膜复位以及复位时间的延长,凋亡细胞数逐渐减少,表明复位后的视网膜细胞发生凋亡可能同样影响了视网膜功能的恢复。有研究发现^[11],快速视网膜复位(1h 和 1d)能减少 RD 所致细胞凋亡。结合 RD 组织病理学的观察结果可以得出:为减少对视网膜的永久损害,RD 治疗时机的选择非常重要,为了阻止视网膜损伤进一步发展,RD 后应尽早使其复位,手术干预措施最好在 RD 7d 内实施,达到抑制细胞凋亡、挽救视网膜神经细胞,从而促进视网膜功能恢复。

参考文献

1 Takita H, Yoneya S, Gehlbach PL, *et al.* Retinal neuroprotection against ischemic injury mediated by intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4497-4504

2 Céline C, Cecconi F, Desseni P, *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death. *Cell Sci* 2002;115(24):4727-4734

3 Linberg KA, Sakai T, Lewis GP, *et al.* Experimental retinal detachment in the cone-dominant ground squirrel retina: morphology and basic immunocytochemistry. *Vis Neurosci* 2002;19(5):603-619

4 Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T. Relocalization of apoptosis-1 inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment *in vivo*. *Am J Pathol* 2001;158(4):1271-1278

5 Zacks DN, Zheng QD, Han Y, *et al.* FAS-mediated apoptosis and its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(12):4563-4569

6 Hisatomi T, Sakamoto T, Goto Y, *et al.* Critical role of photoreceptor apoptosis in functional damage after retinal detachment. *Curr Eye Res* 2002;24(3):161-172

7 Guerin CJ, Lewis GP, Fisher SK, *et al.* Cone photoreceptor recovery after experimental detachment and reattachment: an immunocytochemical, morphological and electrophysiological study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(1):416-425

8 Yang L, Bula D, Arroyo JG, *et al.* Preventing retinal detachment associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):648-654

9 王志玉,付群,史爱云. 视网膜挫伤后神经感觉层细胞凋亡的实验研究. *眼科新进展* 2008;8(8):590-594

10 王志玉,史爱云. 视网膜挫伤兔模型的病理学观察. *国际眼科杂志* 2009;9(8):1469-1471

11 Lewis GP, Charteris DG, Sethi CS, *et al.* The ability of rapid retinal reattachment to stop or reverse the cellular and molecular events initiated by detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(7):2412-2420

12 孙晓东,张哲,许迅,等. 实验性视网膜脱离时神经生长因子对视网膜的保护作用. *中华眼科杂志* 2003;39(5):303-307