

·技术研究·

基底部注射透明质酸酶诱导兔眼基底部玻璃体脱离

熊义斌, 朱晓波, 郭梦翔, 徐哲, 林少芬, 唐仕波*
(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】观察比较不同方法注射透明质酸酶(HA)诱导兔眼基底部玻璃体脱离。【方法】取新西兰白兔 105 只, 随机分 6 组, 其中 A、B、C 每组 30 只, D、E、F 每组 5 只。A、B、C 各组一眼基底部玻璃体注射 HA 0.05 mL, 浓度分别为 250、500、1 000 U/mL, 另一眼相同部位注射等量平衡盐液体; D、E、F 各组常规玻璃体腔注射 HA 0.05 mL, 浓度分别为 250、500、1 000 U/mL, 另一眼相同部位注射等量平衡盐液体。于注射后 6 h、1 d、3 d、7 d、14 d 分别行裂隙灯、UBM 检查, 随机分批处死兔, 取眼球标本行 HE 染色及基底部扫描电镜、透射电镜检查, 观察基底部残余玻璃体。【结果】病理观察 A 组实验眼在 3、7、14 d 的脱离率分别为 20%、20%、40%; B 组为 20%、40%、80%; C 组为 40%、60%、80%; UBM 显示 A 组实验眼在各时间点脱离率为 0; B 组在 14 d 的脱离率为 33.3%; C 组在第 7 天和 14 天的脱离率为 33.3% 和 66.7%, D、E、F 组观察 2 周, 未见基底部玻璃体脱离。各组均未发生眼内炎性反应和视网膜毒性反应。【结论】局部注射透明质酸酶可成功诱导基底部玻璃体脱离。

关键词: 玻璃体脱离; 玻璃体基底部; 透明质酸酶

中图分类号: R77 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)02-0215-04

Basal Vitreous Detachment Induced by Vitreous Base Injection of Hyaluronidase in Rabbits

XIONG Yi-bing, ZHU Xiao-bo, GUO Meng-xiang, XU Zhe, LIN Shao-fen, TANG Shi-bo*

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

Abstract: 【Objective】 To investigate and compare basal vitreous detachment induced by hyaluronidase (HA) in different administration routes in rabbits. 【Method】 A total of 105 New Zealand white rabbits were randomly assigned to 6 groups: group A, B, and C with 30 rabbits in each group, and group D, E, and F with 5 rabbits in each group. The rabbits in group A, B, and C were given HA 0.05 mL at the concentration level of 250, 500 IU/mL, and 1 000 IU/mL by vitreous base injection in one eye, respectively; and the same amount of equilibrium liquid was given to the other eye by the same route. Rabbits in group D, E, and F were given HA 0.05 mL at the concentration level of 250, 500, and 1 000 IU/mL by vitreous cavity injection in one eye, respectively; and the same amount of equilibrium liquid to the other eye by the same route. Slit lamp examination and ultrasound biomicroscopy (UBM) were carried out at 6 h, 1 d, 3 d, 7 d, and 14 d after the injections. After that, the rabbits were executed. Residual vitreous base was detected. The eye ball samples were obtained and observed under scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) after HE (Haematoxylin & Eosin) staining. 【Result】 In group A, the detachment rates at 3, 7, and 14 d were 20%, 20%, and 40% by pathologic examination, respectively; in group B, the detachment rates were 20%, 40%, and 80%, respectively; and groups C 40%, 60%, and 80%, respectively. UBM examination revealed that the detachment rates at all time points in group A were 0; the detachment rate was 33.3% at 14 day in group B, and for group C, the detachment rates were 33.3% and 66.7% at 7 d and 14 d, respectively. For group D, E, and F, no detachment was detected within 2-week observation. No intraocular inflammation or retinal toxicity was seen in all the eyes of all groups. 【Conclusion】 Vitreous base HA injection significantly induced basal vitreous detachment.

Key words: vitreoretinal detachment; basal vitreous; hyaluronidase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2): 215-218, 223]

收稿日期: 2008-09-24

基金项目: “十五”国家科技攻关计划(2004BA702B)

作者简介: 熊义斌, 博士, 讲师, E-mail: billwoods88@yahoo.com.cn; * 通讯作者: 唐仕波, E-mail: Tangsb@mail.sysu.edu.cn

基底部玻璃体的残余被认为是导致术后前段增殖性玻璃体视网膜病变(anterior proliferative vitreoretinopathy, aPVR)形成和玻璃体手术失败的主要原因^[1,2]。为了更彻底地清除基底部玻璃体,临床上采用了很多手术技巧:高斜面镜、巩膜外顶压及晶状体切除术等^[3]。国内曾有人报道对人工晶体眼行彻底的玻璃体切除术可以提高视网膜脱离手术成功率^[4]。但由于基底部玻璃体解剖位置和生理的特殊性,强行切除可能会损伤正常眼内组织。近年来新开展的酶协助下玻璃体切除术可造成玻璃体后脱离(posterior vitreous detachment, PVD)^[5],提示我们是否可以用“酶切”的方法造成基底部玻璃体脱离。理论上,可以利用玻璃体纤维束状走行,“帐篷形”层状由后向前分布的特点^[6],采取基底部玻璃体注射透明质酸酶(hyaluronidase, HA)的方法,使其在局部发挥效能。基于此,我们进行了一系列研究,报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物

健康新西兰白兔 105 只,体质量 1.8 ~ 2.5 kg,由中山大学北校区动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

透明质酸酶(HA)购自美国 Sigma 公司。便携式超声生物显微镜(UBM)由天津索维公司提供(SW-3200 型)。视网膜电图(ERG)使用日本进口 Nuero pack II 电生理仪。眼压测量使用压陷式眼压计。

1.3 方法

将透明质酸酶(HA)溶于平衡盐溶液,终浓度为 250、500、1 000 U/mL。将 105 只白兔随机分为 6 组:A、B、C 每组 30 只,基部分别注射上述三种浓度的 HA 0.05 mL;D、E、F 每组 5 只,玻璃体腔中央注射三种相应浓度的 HA 0.05 mL。每只兔取右眼为实验眼,左眼为对照眼,注入等量平衡盐液。术前 3 d 双眼常规滴 0.3%妥布霉素眼药水,注药前 15 min 用 2%美多丽眼药水散瞳。直视下穿刺巩膜,其中,A、B、C 三组进针部位在角膜缘后 3 mm,进针深度 3 ~ 4 mm 至玻璃体基底部;D、E、F 三组注射部位为角膜缘后 4 mm,进针深度 7 ~ 10 mm,至玻璃体腔中央。术后定期观察眼前后段改变。各组在术后 6 h、1 d、3 d、7 d、14 d 行超声生

物显微镜检查(UBM),最后,A、B、C 三组每组随机各取 6 只处死,其中 1 只双眼行基底部扫描电镜、透射电镜检查,另 5 只行 HE 染色检查。D、E、F 三组每组随机各取 1 只,只行电镜观察。

1.4 统计学处理

采用卡方检验和蒙特卡罗(Monte Carlo)法分析各组在时间-剂量上相关性(取 $\alpha = 0.05$)。

2 结果

2.1 临床观察

术后裂隙灯观察两周内,实验眼中 A 组 1 只, B 组和 C 组各 2 只注药后第 2 天出现前房持续性闪辉。注药后第 3 天, D 组 3 只对照眼, A 组 2 只、 B 组 1 只、 C 组 2 只实验眼出现晶状体后囊渐进性混浊。C 组于注药后第 2 天有 2 只实验眼出现后极部视网膜血管模糊,散在点状出血及局限性水肿, F 组 1 只实验眼出现类似改变。以上改变于 1 周左右后消失。

2.2 大体解剖观察

4%戊二醛固定 16 h 后解剖眼球,肉眼及解剖显微镜下见实验眼 A、B、C 三组玻璃体不同程度液化,基底部玻璃体缺失;D、E、F 三组中央玻璃体液化,基底部玻璃体无变化;对照眼各组均未见玻璃体液化脱离。

2.3 病理切片观察

低倍及高倍镜下发现 A、B、C 三组实验眼注药侧在不同时间点基底部玻璃体均可出现不同程度缺失,其缺失的程度在 A 组较轻, B 组、 C 组在 14 d 左右最明显(图 1A, 1B); A、B、C 三组实验眼对照侧和其对照眼以及 D、E、F 三组双眼玻璃体即使两周后仍牢固黏附于基底部(图 1C)。各组基底部脱离情况见表 1。A 组实验眼在 3 d、7 d、14 d 的脱离率分别为 20%、20%、40%; B 组为 20%、40%、80%; C 组为 40%、60%、80%。采用 Fisher 精确检验,双侧 $P = 1.0$,未发现脱离与时间和浓度相关性。采用蒙特卡罗(Monte Carlo)法分析其出现阴性结果的相关性,双侧 $P = 0.992$,未发现脱离与时间和浓度相关性。

2.4 UBM 观察

B 组实验眼有 2 只 14 d 后可观察到注药侧出现界限清楚节段性玻璃体界面反射声像(图 2); C 组在第 7 d 和 14 d 各有 2 只和 4 只眼出现同样改

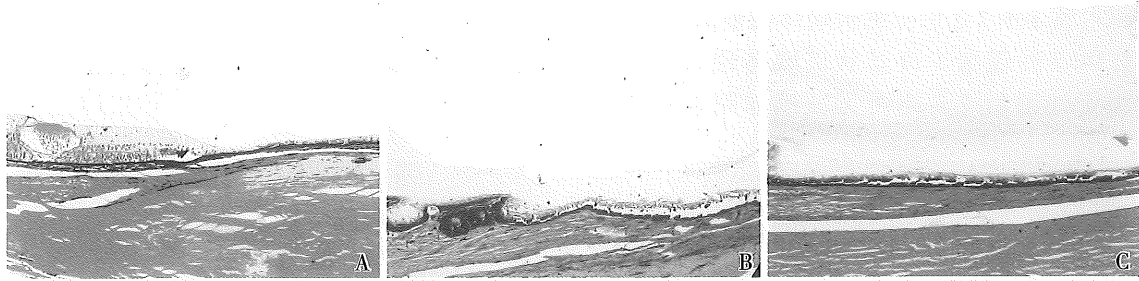


图 1 基底部玻璃体视网膜组织的 HE 染色

Fig.1 HE staining of basal vitreo-retina interface

A: Complete basal vitreo-retina detachment were found in group B 14 days after an intravitreal injection of hyaluronidase 25 U, the base vitreo-retina interface were smooth, $\times 20$; B: Partial basal vitreo-retina detachment were found in group C 14 days after an intravitreal injection of hyaluronidase 50 U, $\times 40$; C: Basal vitreous were firmly stick to the vitreo-retina interface in the control eyes 14 days later, $\times 40$

表 1 病理切片比较各组发生基底部视网膜脱离的情况

Table 1 Comparison of basal vitreo-retina detachment by pathology in all groups

Groups	n	A		B		C	
		Test	Control	Test	Control	Test	Control
6 h	5	0	0	0	0	0	0
1 d	5	0	0	0	0	0	0
3 d	5	1	0	1	0	2	0
7 d	5	1	0	2	0	3	0
14 d	5	2	0	4	0	4	0

变。A 组实验眼在各时间点脱离率为 0; B 组在 14 d 的脱离率为 33.3%; C 组在第 7 d 和 14 d 的脱离率为 33.3% 和 66.7%。采用 Fisher 精确检验, 双侧 $P = 1.0$, 单侧 $P = 0.536$, 未发现脱离与时间和浓度相关性。

2.5 电镜观察

2.5.1 透射电镜 透射电镜下基底部玻璃体视网膜界面见: A 组实验眼注药侧 14 d 后仍可见多量纤维附着, B 组 7 d 后玻璃体纤维减少较多, 14 d

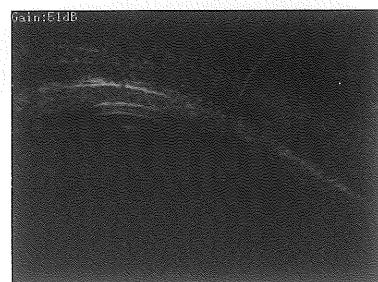


图 2 UBM 显示基底部局限性玻璃体视网膜脱离
Fig.2 UBM shows partially vitreo-retina detachment in group B after injection of hyaluronidase 25 U 14 days later (Gain 50 dB).

后则明显减少; C 组于 7 d 后见明显减少(图 3A), 14 d 后与 7 d 后相比无明显改变。A、B、C 三组实验眼对照侧和其对照眼以及 D、E、F 组基底部玻璃体视网膜界面大量纤维残留(图 3B)。

2.5.2 扫描电镜 电镜下见正常兔眼基底部玻璃体紧密粘附于玻璃体视网膜界面, A 组实验眼注药侧、A、B、C 三组实验眼对照侧和其对照眼以及 D、E、F 三组(图 4A) 均显示类似结果; B 组实验

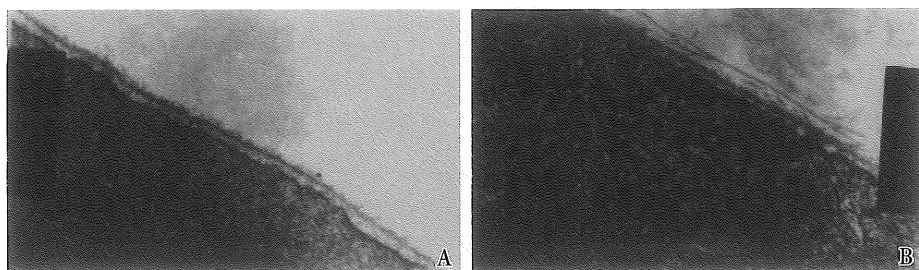


图 3 透射电镜下所见基底部玻璃体视网膜交界面

Fig.3 Transmission electron microscopy (TEM) image of basal vitreo-retina interface

A: Transmission electron microscopy (TEM) image of basal vitreo-retina interface 7 days after vitreous injection of hyaluronidase 50 U in group C, almost little vitreous fibers remained; B: Dense vitreous fibers can be seen after vitreous injection of hyaluronidase 50 U in group F 14 days later; Bar 100 μm .

眼注药侧术后 3 d、7 d 后可见玻璃体明显减少(图 4B, 4C), 14 d 后仅余少许丝状玻璃体残余(图 4D); C 组于注射后 7 d 亦可见玻璃体明显减少

(图 4E), 第 14 天与第 7 天相比无明显改变。D、E、F 三组注药侧 2 周后仍可见玻璃体附着在基底部(图 4F)。

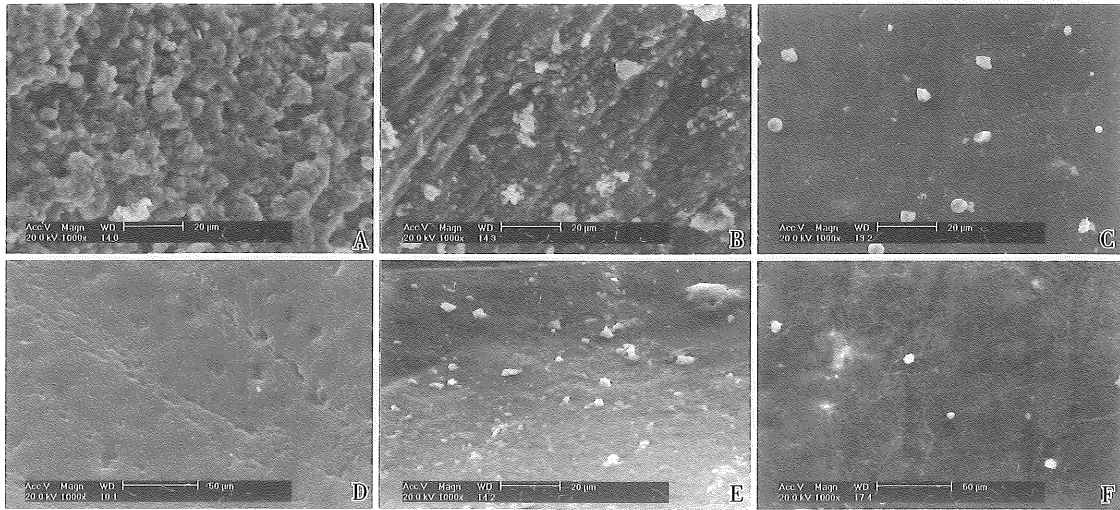


图 4 扫描电镜下所见基底部玻璃体视网膜界面

Fig.4 Scanning electron microscopy (SEM) image of basal vitreo-retina interface

A: Vitreous fibers were "cotton" like and firmly stick to the vitreo-retina interface in the saline-injected eyes; B: Fewer fibers were found 3 days after an vitreous injection of hyaluronidase in group B; C: Very fewer fibers were found in group B after 7 days; D: Almost none of the fibers were found in group B 14 days later. The vitreo-retina interface were smooth, indicating the occurrence of base vitreo-retina detachment; E: The vitreous fibers were remarkably decreased in group C post injection of 7 days; F: "Fishing net"like fibers were found in group F post injection of 14 days; Bar 20 μm

3 讨 论

目前, 关于酶是否可引起基底部玻璃体脱离这一问题报道并不多, 而有限的报告结果也不一致。Hagemann 曾报道过使用软骨素酶可致猴眼基底部玻璃体脱离^[7]; 但也有人报道使用酶并不能导致脱离^[8]。我们的研究表明, 酶是否导致基底部玻璃体脱离与注射方法关系密切。常规的方法是行玻璃体腔中央注射, 这种方法在注药后酶首先消化的是中央的玻璃体, 形成中央高周围低的浓度梯度, 至基底部玻璃体后, 其浓度可能已不足以产生 BVD。本试验首次采用基底部玻璃体注射的方法, 发现透明质酸酶 1 000 U/mL 7 d 和 500 U/mL 14 d 后都可以引起基底部玻璃体脱离。虽然统计分析表明, 并未发现脱离与浓度和时间的相关性, 这可能是由于样本量少而引起。

对于基底部玻璃体是否脱离的观察过去主要是通过扫描电镜和病理切片的方法^[9], 但这些方法需要离体切片, 其机械损伤也可能导致玻璃体

基底部脱离, 而且需要大量的实验动物; UBM 可以在活体清楚地显示玻璃体基底部改变, 一方面可以在同一动物不同时间重复多次检查, 既排除个体差异又能节省动物, 另一方面更重要的是它排除了由于切片导致的人为干扰。正常情况下, 眼前段组织中巩膜表现最强回声, 玻璃体表现为无回声。玻璃体脱离后, UBM 图像表现为无回声后又出现的强回声条带。其中的无回声区为脱离带, 强回声条带为玻璃体脱离界限。将 UBM 用于此类研究, 据我们所知在目前尚属首次。鉴于 UBM 在观察基底部玻璃体脱离的独特优势, 我们认为可以把它作为观察基底部玻璃体是否脱离的金标准。

国内王莉菲等^[10]曾经利用透明质酸酶 400 U/mL 诱导兔眼玻璃体后脱离, 分别在玻璃体腔注药后第 1、3、7 天观察, 未发现明显不良反应。本实验也对该酶的不良反应进行了观察, 结果将另文报道。对于该酶眼内应用的不良反应及药代动力学的观察尚有待进一步的实验研究。发现并使用新的更安全更有效的酶, 将其应用于基底部的酶解

(下转第 223 页 to page 223)