

http://www.journals.zju.edu.cn/med

透明质酸酶联合 C_2F_6 诱导兔眼玻璃体后脱离的实验研究

沈丽萍, 王剑勇, 黄智敏

(浙江大学医学院 附属第一医院浙益眼科中心, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的: 研究透明质酸酶联合 C_2F_6 玻璃体腔注药诱导兔眼玻璃体后脱离(PVD)的效果及安全性。方法: 15只兔(30只眼)随机分A、B、C 3组, 每组5只, 每兔一眼为实验眼, 另一眼为对照眼。A、B两组实验眼玻璃体腔注射30IU透明质酸酶, C组实验眼玻璃体腔注入0.1 ml BSS溶液, 注射后第7 d A组和C组加注 C_2F_6 0.5 ml, 对照眼均注射0.1 ml BSS溶液。注射前后10 d 每天行临床裂隙灯、前置镜、检眼镜及B超和暗适应视网膜电图(ERG)检查, 以后除每天常规临床检查外, 每周复查B超及ERG, 共观察8周。处死后眼球标本送光镜和扫描、透射电镜检查。结果: A组5只实验眼完全性玻璃体后脱离, B组3只实验眼不完全性玻璃体后脱离, C组实验眼和3组对照眼均无玻璃体后脱离发生。A、B、C组实验眼注药前后及与对照眼相比较, 视网膜电图a、b波振幅和潜伏期均无显著改变($P>0.05$)。光镜、电镜检查未发现视网膜组织有毒性改变。结论: 动物实验中临床观察结合B超、扫描电镜有助于准确判断玻璃体后脱离与否。透明质酸酶联合 C_2F_6 玻璃体腔注药可诱导兔眼完全性玻璃体后脱离的发生, 但无眼内毒性。

[关键词] 透明质酶; 玻璃体脱离; 疾病模型, 动物; 透明质酸酶; 玻璃体后脱离; C_2F_6

[中图分类号] R 776.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2004)04-0335-05

Experimental induction of posterior vitreous detachment in rabbits with hyaluronidase and perfluoroethane (C_2F_6)

SHEN Li-ping, WANG Jian-yong, HUANG Zi-min (Zheyi Eye Center, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the experimental induction of posterior vitreous detachment (PVD) by intra-vitrous injection of hyaluronidase and perfluoroethane (C_2F_6). **Methods:** Fifteen rabbits (30 eyes) were divided into 3 experimental groups, the contralateral eyes in same animals served as the controls. Eyes in group A and B were received two vitreous injections of 15 IU of hyaluronidase at an interval of 5 d. The eyes in group C and all control eyes were injected with balanced salt solution (BSS). Seven days after injection, the experimental eyes in group A and C were received 0.5 ml of C_2F_6 injection. The ocular and retinal signs were examined for 8 following weeks and then killed for histological examination. **Results:** Five eyes in group A (100.0%) showed complete separation of the vitreous cortex from the retina (PVD), three eyes in group B (60.0%) showed partial PVD, and no PVD was detected in group C and all control eyes. On electroretinogram no significant difference was found in amplitude and latency of a- (or b-) wave in both experimental and control eyes, between before and after experiments. No evidence of ocular or retinal toxicity was revealed by light or scanning electronic microscopy in all eyes. **Conclusions:** Vitreous injection of hyaluronidase combined with perfluoroethane, as a safety method, can induce posterior vitreous detachment without mechanical vitrectomy.

[Key words] Hyaluronoglucosaminidase; Vitreous detachment; Disease models, animal; Posterior vitreous detachment; Hyaluronidase; C_2F_6

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2004, 33(4): 335-339.]

现代玻璃体视网膜手术旨在松解视网膜上的玻璃体牵引, 但手术中将玻璃体皮质完全从视网膜上分离是困难的, 尤其对年轻患者, 因两者的牢固黏附, 使机械性的玻璃体切割极易引

收稿日期: 2003-09-15 修回日期: 2004-04-20

基金项目: 浙江省教育厅科研基金(20020794)资助项目

作者简介: 沈丽萍(1962—), 女, 眼科副主任医师, 研究方向为玻璃体视网膜疾病; E-mail: yugw@mail.hz.zj.cn

起生源性的视网膜裂孔、视网膜脱离、出血及神经纤维的损伤等并发症。近来有通过药物诱导完全性玻璃体后脱离的报道,从而防止玻璃体牵引所引发的相关疾病,为玻璃体手术的顺利进行,提高疾病的治愈率创造了条件,但实验结果各不相同^[1~3]。本实验采用透明质酸酶联合 C_2F_6 玻璃体腔注药诱导兔眼玻璃体后脱离,观察其效果及安全性,并比较了几种在动物实验中常用的观察玻璃体后脱离的方法的优缺点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及方法 选用健康成年灰色家兔 15 只(30 只眼),雌雄兼用,体重约 3.0~3.5 kg,由浙江大学医学院动物实验中心提供并标准饲养。实验前动物进行常规检查确定实验兔眼前后节结构均正常。15 只兔随机分为 A、B、C 3 组,每组 5 只,每兔右眼为实验眼,左眼为对照眼。A、B 两组实验眼玻璃体腔注射 30IU 透明质酸酶(上海生化制品厂产品),分 2 次注射,每次 15IU(溶于 0.1 ml 的 BSS 溶液),两次之间间隔 5 d,C 组实验眼玻璃体腔注入 0.1 ml BSS 溶液。实验第 7 d 实验 A 组和 C 组加注 C_2F_6 0.5 ml;对照眼均注射 0.1 ml BSS 溶液。本组动物实验前 1%丁卡因滴眼共 2 次,前房穿刺放出少许房水降低眼压后,在距角巩膜缘 2~3 mm 处进针,在直接检眼镜观察下将药物(气体)注射到玻璃体腔中央部,拔针后用棉签按压 1 min 以防药液或气体漏出,然后,用裂隙灯、78DVOLK 非球面前置镜和眼底镜观察有无相关并发症。

1.2 临床观察及实验室检查 注射后前 10 d 每天行临床裂隙灯、前置镜、检眼镜及 B 超和暗适应视网膜电图(ERG)检查,以后除每天常规临床检查外,每周复查 B 超及 ERG,共观察 8 周。B 超检查:如在视网膜前玻璃体内发现中等回声的膜状物,运动活跃,与视盘无关,则认为有玻璃体后脱离,反之,则为阴性结果。ERG 检测由专人操作,主要记录兔清醒状态双眼的全视野暗适应 ERG 最大反应。记录前将兔置于绝对暗室内暗适应 1 h,用 0.5%托品酰胺充分散瞳,0.5%丁卡因表面麻醉,记录电极单极角膜接触镜电极,置于被测眼结膜囊内角膜

表面,参考电极和地电极为自制的不锈钢针状电极,用 75%酒精充分消毒后分别埋于双眼连线 and 双耳连线的中点皮肤下。

1.3 光镜及扫描、透射电镜检查 实验兔均在 8 周后经耳缘静脉注气处死。迅速小心摘除眼球,清除眼球外筋膜组织。在眼球摘除过程中小心操作,避免因眼球直接受压而影响实验结果。眼球标本经固定,脱水,石蜡包埋切片,染色封片等步骤后,光学显微镜下观察结果。在摘除眼球中取部分后极部、赤道部组织,经戊二醛、锇酸固定,漂洗,梯度脱水,乙酸异戊酯置换,二氧化碳临界点干燥,离子溅射喷涂等步骤后用扫描电镜(CAMBRIDGE STEREOSCAN 260)观察结果;经戊二醛、锇酸固定,漂洗,梯度脱水,包埋切片,染色后用透射电镜(TECNA10)观察结果。如玻璃体后脱离存在,电镜下表现为视网膜内界膜光滑,无纤维状物附着;无玻璃体后脱离则内界膜表面可见有网状分布的纤维状物覆盖,另透射电镜还观察视网膜各层微细结构的变化情况。

1.4 统计学处理 视网膜电图数据均采用方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 检眼镜、前置镜等临床检查 在裂隙灯和检眼镜下检查发现实验眼、对照眼注射 3 d 内玻璃体有细点状混浊。A 组 5 眼在 2 周左右玻璃体腔有细颗粒状混浊,在 5~6 周时有较明显的玻璃体混浊,7 周后均有玻璃体后脱离表现(图 1);B 组 3 眼有较明显的玻璃体混浊;C 组和对照眼未见有明显变化。所有术眼均未发现前房出血,玻璃体出血,视网膜裂孔,视网膜脱离,眼内感染等并发症,一例发现有轻微的晶体损伤,但不影响实验观察结果。

2.2 B 型超声检查和 ERG 检测 A 组 5 眼在 5~6 周发现有较明显的玻璃体混浊,>6 周后均在视网膜前玻璃体内发现中等回声的膜状物,运动活跃,与视盘无关(图 2);B 组 3 眼发现有较明显的玻璃体混浊;C 组和对照眼未见有明显变化。A、B、C 组实验眼注药前后及与对照眼相比较,暗适应闪光 ERG a、b 波振幅和潜伏期均无显著差异($P>0.05$,表 1、2)。

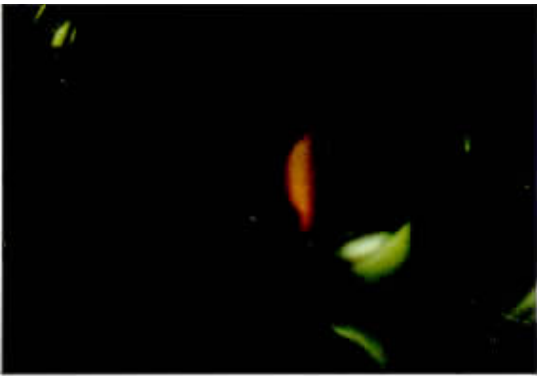


图 1 玻璃体后脱离临床表现(前置镜、三面镜下所见)

Fig. 1 Clinical manifestation of PVD in slitlamp biomicroscopy and three-mirror contact lens or prepositus lens

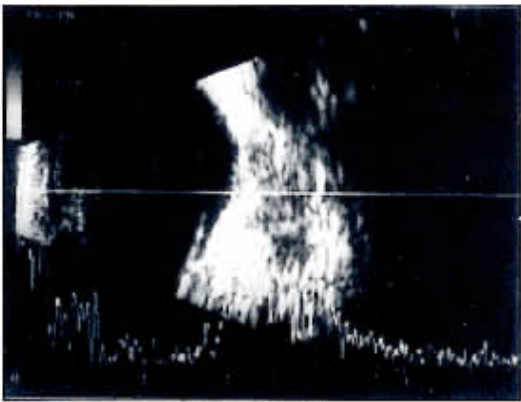


图 2 玻璃体后脱离 B 超声检查所见

Fig. 2 B-type ultrasonograph of PVD

表 1 各组视网膜电图 a、b 波振幅改变

Table 1 The amplitude change of ERG a,b wave($\bar{x}\pm s,\mu V$)

Group	n	A wave amplitude				B wave amplitude			
		Pre-op	Post-op			Pre-op	Post-op		
			7 d	10 d	8 w		7 d	10 d	8 w
A	5	-32.47±10.45	-36.60±17.64	-41.66±16.82	-41.94±17.33	205.16±28.73	200.65±9.68	215.66±25.24	216.12±24.81
B	5	-44.62±26.70	-38.32±16.48	-43.38±12.03	-39.64±13.66	236.64±53.07	200.78±32.97	219.90±38.51	215.14±46.08
C	5	-44.36±28.13	-41.78±21.62	-38.98±8.36	-44.68±16.20	220.10±42.45	201.02±40.81	199.82±42.92	204.20±26.81
Control	15	-38.01±8.19	-35.95±6.03	-40.13±8.42	-38.09±9.04	196.74±30.65	205.95±29.59	206.33±28.69	201.88±28.67

Analysis of variance, $P>0.05$

表 2 各组视网膜电图 a、b 波潜伏期改变

Table 2 The implicit time change of ERG a,b wave($\bar{s}\pm s,mS$)

Group	n	A wave implicit time				B wave implicit time			
		Pre-op	Post-op			Pre-op	Post-op		
			7 d	10 d	8 w		7 d	10 d	8 w
A	5	13.20±0.84	13.80±0.84	13.40±1.14	13.60±0.89	36.40±2.19	37.80±0.84	36.30±1.48	37.40±1.34
B	5	13.40±0.55	14.20±1.64	14.00±1.00	13.60±1.14	35.80±1.48	36.30±0.84	35.68±1.84	36.00±1.22
C	5	13.60±1.34	14.60±1.14	14.20±1.48	14.80±0.45	35.80±1.10	36.42±0.91	36.60±1.30	36.00±1.00
Control	15	13.53±0.83	14.40±1.12	13.60±0.91	13.60±1.06	36.20±1.93	36.31±1.10	35.73±0.80	36.13±1.17

Analysis of variance, $P>0.05$

2.3 大体观察 A、B 组实验眼(10 眼)均较 C 组、对照眼有明显的玻璃体液化表现。

2.4 光镜及电镜观察 扫描电镜观察:A 组 5 眼视网膜表面光滑,无纤维状物附着,部分可见有碎屑样物质及视网膜皱褶存在(图 3);B 组 3 眼可见部分较光滑的视网膜,但仍有稀疏的纤维状物残留(图 4),另 2 眼纤维状物残留较多;

C 组及对照眼可见有散在团块状紧缩的纤维状物残留,在大血管处更有致密的纤维状物(图 5)。光镜和透射电镜检查:A 组视网膜内界膜光滑,无纤维附着,两者因标本取材及制作过程的限制尚难以与 B 组、C 组区别判断玻璃体后脱离与否,但 3 组视网膜各层微细结构均未见明显异常。



图 3 A 组完全性玻璃体后脱离眼扫描电镜所见 视网膜表面光滑, 无纤维状物附着, 部分可见有碎屑样物质及视网膜皱褶存在 (SEM×3600)

Fig. 3 Scanning electron micrograph of completely PVD in group A: a smooth retinal surface, which is consistent with bare internal limiting membrane (SEM×3600)



图 4 B 组 3 眼部分性玻璃体后脱离扫描电镜所见 部分视网膜表面较光滑, 但仍有稀疏的纤维状物残留 (SEM×3600)

Fig. 4 Scanning electron micrograph of partial PVD in group B(3 eyes): the retinal surface appeared to be covered with rarefied collagen fibers (SEM×3600)



图 5 C 组及对对照眼无玻璃体后脱离扫描电镜所见 散在团块状纤维状物残留, 大血管附近有更致密的纤维状物 (SEM×3600)

Fig. 5 Scanning electron micrograph of no PVD in group C and the control eyes: a continuous network of dense collagen fibers covering the retina, especially near the great vessels (SEM×3600)

3 讨 论

3.1 透明质酸酶联合 C_2F_6 诱导兔眼玻璃体后脱离的可能机制 玻璃体后皮质与视网膜内界膜构成了玻璃体视网膜交界面, 玻璃体后脱离的存在与否以及玻璃体后脱离的类型, 与许多玻璃体视网膜疾病有紧密的联系。有人认为, 早期注射透明质酸酶对缓解明显的玻璃体牵引可能有一定作用, 特别对临床上年轻的有黄斑裂孔的患者^[4]。其次, 玻璃体中通过药物作用人为地形成玻璃体后脱离对于彻底清除玻璃体后皮质十分重要, 是否能形成完全性玻璃体后脱离也影响着某些眼底疾病的预后^[5]。尽管不断有新的器械或方法的应用, 但手术中机械性诱导玻璃体后脱离仍需要一定的技巧和大量的时间, 并极易造成医源性损伤, 故近年对非手术性玻璃体后脱离, 即通过酶诱导的玻璃体后脱离的实验研究也成为探索玻璃体视网膜疾病新治疗方法的热点之一。本研究一方面在兔玻璃体腔内分 2 次小剂量注入透明质酸酶以充分降解透明质酸, 避免其毒性作用, 使玻璃体从原有的胶样状态转化成液化状态, 支架塌陷, 另一方面加注 C_2F_6 气体通过机械作用促成玻璃体后脱离的形成。从实验结果看, 两者的联合作用可诱导玻璃体后脱离的产生, 并且无毒副作用发生。

透明质酸酶能断开 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, 使透明质酸解聚和水解成双糖化合物, 并离解细胞间质屏障, 使原有的胶样玻璃体液化。在此过程中胶原细纤维聚合并丧失其化学稳定性, 使玻璃体支架塌陷, 从而削弱玻璃体后皮质与内界膜间的黏附和对视网膜的支撑顶压作用, 以达到玻璃体后脱离的目的。透明质酸在中央玻璃体中浓度较高, 透明质酸酶的作用首先从中央玻璃体开始, 接近视网膜的玻璃体皮质失去中央区玻璃体的结构支持后将对机械作用更加敏感; C_2F_6 气体的注入, 可置换出玻璃体的水分, 压缩玻璃体, 随着气体的吸收和收缩, 从而形成广泛的玻璃体凝缩, 两者的联合作用从而对玻璃体后脱离的产生起到较肯定的效果。从本研究结果来看, A 组实验眼 2 周左右玻璃体腔有细颗粒状混浊, 5~6 周有较明显的玻璃体混浊, 到 7 周左右发现有玻璃体后脱离形成, 其作用是一个渐进的形成过程。这说明玻璃体的液化与玻璃体皮质的分离也即玻璃体后脱离的形成需要一定的时间, 眼球运动及气体的作用, 最终减弱了玻璃体皮质与视网膜的粘连, 从而导致了 PVD 的发生。因此, 本研究认为透明质酸酶液化了玻璃体, 为玻璃体从视网膜上的分离提供了一个基础, 而玻璃体后脱离则是在气体

及眼球运动等机械作用下形成的。

酶诱导的玻璃体后脱离的研究大多数还处于动物实验或离体观察阶段,缺少有关该方法的大量的临床随机分组对比研究,而且兔视网膜内界膜与玻璃体后皮质间粘连同人眼有不完全相同之处。但由于透明质酸酶取用方便,费用经济,操作简单,故其安全有效的玻璃体液化作用可作为玻璃体手术治疗的辅助手段;其产生的玻璃体后脱离效应还有待于今后临床中进一步研究,对玻璃体视网膜疾病的治疗提供新的途径具有重要的意义。

3.2 动物实验中玻璃体后脱离的观察方法比较 由于玻璃体后皮质与视网膜内界膜的连接紧密,因此对玻璃体后脱离的判断始终是困惑研究者的一个问题。本研究发现临床常规检查(裂隙灯、眼底镜、前置镜等)能直观发现玻璃体的大体变化,如玻璃体混浊和后脱离,可作为判断玻璃体后脱离的初步方法。

B 型超声波检查能观察注药后眼球内玻璃体的大体变化,是判断明显的玻璃体后脱离存在与否的一种可靠方法,但需注意仔细操作,扫描时应多方位、多切面全面细致地扫查,特别是在对早期玻璃体后脱离等情况的判断时。

光镜检查可直接观察玻璃体后皮质与内界膜的关系以及视网膜各层组织细胞的变化,是一种客观的检查方法。本次实验设定了严格的对照,也在切片过程中严格按照规范进行操作,发现 A 组确存在有玻璃体后脱离的表现,但对照眼和其他两组也明显存在玻璃体后脱离的表现。这可能与玻璃体含水量高,在固定、脱水过程中有可能造成人为的假象,所以光镜检查对

玻璃体后脱离的结果仍很难作一个准确、客观的判断。

透射电镜能清楚地显示视网膜各层神经元细胞结构及玻璃体后皮质与内界膜间的微细二维图像,也可作为是一种客观评价玻璃体后脱离的手段。但从标本的取样等自身方法的限制角度来看,透射电镜检查也很难对玻璃体后脱离的判断作出一个准确、客观的评价。

扫描电镜能显示视网膜表面的三维结构,对表面形态学的观察有独到之处。有人也认为其可作为唯一的检查手段进行玻璃体后脱离的研究^[6]。本研究也确实表明该检查方法对判断玻璃体后脱离有重要意义,特别是对部分性 PVD 的判断更具有有一定的优越性。

References :

[1] VERSTRAETEN T C,CHAPMAN C,HARTZER M, et al. Pharmacologic induction of PVD in the rabbit [J]. *Arch Ophthalmol*,1993,110(4):849—854.
[2] TEZEL T H,DELPRIORE L V,KAPLAN H J. Posterior Vitreous Detachment with dispass [J]. *Retina*,1998,18(1):7—15.
[3] TANAKA M,QU H. Pharmacological vitrectomy [J]. *Semin Ophthalmol*,2000,15(1):51—61.
[4] HAROONI M,MCMILLAN T,REFOJO M. Efficacy and safety of enzymatic posterior vitreous detachment by intravitreal injection of hyaluronidase [J]. *Retina*, 1998(1),18:16—22.
[5] MARGHERIO A R,MARGHERIO R R,HARTZER M, et al. Plasmin enzyme-assisted vitrectomy in traumatic pediatric macular holes [J]. *Ophthalmology*, 1998,105(9):1617—1620.
[6] HIKICHI T,KADO M,YOSHIDA A. Intravitreal injection of hyaluronidase cannot induce posterior vitreous detachment in the rabbit [J]. *Retina*,2000,20 (2):195—198.

[责任编辑 黄晓花]

(上接第 330 页)

[6] UGORSKI M,LASKOWSKA A. Sialyl lewis a: a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells [J]. *Acta Biochem Pol*,2002,49:303—311.
[7] FUKUOKA K,NARITA N,SAIJO N. Increased expression of sialyl lewis(x) antigen is associated with distant metastasis in lung cancer patients: immunohistochemical study on bronchofiberscopic biopsy specimens [J]. *Lung Cancer*,1998,20:109—116.
[8] DING Ke-feng,WU Jin-min,ZHENG Su,et al(丁克峰,吴金民,郑树,等). Relationship of nm23-H1 expression and mutation with the metastasis and

prognosis of breast cancer [J]. *Journal of Practical Oncology*(实用肿瘤杂志),1997,12:62—65.
[9] SRINIVAS P,MADHAVAN M,AHAMED I,et al. Nm23-H1 and P53 proteins are differentially correlated to metastasis in breast cancer [J]. *Neoplasma*,2002,49:225—230.
[10] LIU F,ZHANG Y,ZHANG X Y,et al. Transfection of the nm23-H1 gene into human hepatocarcinoma cell line inhibits the expression of sialyl Lewis X, a1,3 fucosyltransferase VII,and metastatic potential [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2002,128:189—196.

[责任编辑 张荣连]