

# GM 6001 干预外伤性增生性玻璃体视网膜病变的病理形态学研究

谢茂松, 吴雅冰, 徐国兴

基金项目: 中国卫生部科研基金资助项目 (No. WKJ2005-2-013); 中国福建省自然科学基金项目 (No. C0510015); 中国福建医科大学教授发展基金课题 (No. 2006-js6033)

作者单位: (350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院 福建省眼科研究所

作者简介: 谢茂松, 医师, 眼科学博士, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 徐国兴, 教授, 博士生导师. zjfmuxg@pub5. fz. fj. cn

收稿日期: 2008-11-05 修回日期: 2009-01-08

## Study on pathomorphology of traumatic proliferative vitreoretinopathy after GM 6001 intervention

Mao-Song Xie, Ya-Bing Wu, Guo-Xing Xu

**Foundation items:** Science Research Foundation of Ministry of Health, China (No. WKJ2005-2-013); Natural Science Research Foundation of Fujian, China (No. C0510015); Professor Development Fund of Fujian Medical University (No. 2006-js6033)

Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Guo-Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. zjfmuxg@pub5. fz. fj. cn

Received: 2008-11-05 Accepted: 2009-01-08

### Abstract

• **AIM:** To investigate the pathomorphology differences between the tPVR intervened with GM 6001 and without GM 6001.

• **METHODS:** Totally 180 SD rats were divided randomly into three groups: the control group, the tPVR group, the tPVR treated with GM 6001 group. The ultramicrostructure of the retina was revealed by the transmission electron microscope.

• **RESULTS:** The transmission electron microscope showed that the retinal photoreceptor cells, the retinal pigment epithelium and the retina inner and outer barriers were damaged in the tPVR group. In the tPVR treated with GM 6001 group, the membranous discs of the outer segment of the retinal photoreceptor cells were still clear. There were plenty of chondriosome, pinocytosis bullules and smooth endoplasmic reticulum in the cytoplasm. The cell junction was regular. The plasma membrane infoldings of the basilar part of the retinal pigment epithelium in the tPVR treated with GM 6001 group were more than that in the tPVR group.

• **CONCLUSION:** GM 6001 may protect the ultramicrostructure of the retina and play an important role in intervening course of tPVR.

• **KEYWORDS:** GM 6001; traumatic proliferative vitreoretinopathy; pathomorphology

Xie MS, Wu YB, Xu GX. Study on pathomorphology of traumatic proliferative vitreoretinopathy after GM 6001 intervention. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(1):44-46

### 摘要

**目的:** 研究 GM 6001 干预外伤性增生性玻璃体视网膜病变的病理形态学改变。

**方法:** 将 SD 大鼠 180 只随机分为对照组、tPVR 组和外伤后应用 GM 6001 组, 应用透射电镜观察视网膜结构变化。

**结果:** 透射电镜示 tPVR 组大鼠视网膜光感受器细胞和 RPE、视网膜内外屏障受损, 而外伤后应用 GM 6001 组视网膜光感受器细胞外节膜盘结构尚清晰, RPE 基底部质膜内褶较 tPVR 组多, 胞质中含大量线粒体、吞饮小泡和滑面内质网, 细胞连接规则。

**结论:** GM 6001 可保护视网膜组织结构, 在干预 tPVR 的发生发展中起重要作用。

**关键词:** GM 6001; 外伤性增生性玻璃体视网膜病变; 病理形态学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.01.014

谢茂松, 吴雅冰, 徐国兴. GM 6001 干预外伤性增生性玻璃体视网膜病变的病理形态学研究. 国际眼科杂志 2009;9(1):44-46

### 0 引言

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 定义为视网膜表面发生无血管的纤维细胞性膜的增殖, 是引起视网膜再脱离的主要原因。外伤性增生性玻璃体视网膜病变 (traumatic proliferative vitreoretinopathy, tPVR) 是发生在眼球穿通伤后因创伤修复的过度瘢痕化所引起的牵引性视网膜脱离。其发病率高, 病程发展快, 且缺乏有效的预防措施, 临床疗效欠佳。因此, 如何在外伤后及早干预 tPVR 的发生一直是研究的热点和难点。目前, 在国内外各种研究中, 对 tPVR 病程中视网膜超微结构改变报道甚少。无论从何种发病机制来说, 视网膜的变化在 tPVR 的发生发展中都起着不可忽略的重要作用。本研究通过建立实验性 tPVR 的 SD 大鼠模型, 应用透射电镜观察大鼠视网膜组织超微结构的病理形态学变化, 探讨 GM 6001 干预 tPVR 病程机制。

### 1 材料和方法

**1.1 材料 实验动物与分组:** 雄性清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体质量  $250 \pm 25$ g。实验分组: 将 SD 大鼠 180 只, 按随机数字法分为对照组 (N)、tPVR 组 (M) 和外伤后应用 GM 6001 组 (T), 每组 60 只。各组再随机分为 6 个亚组: 1, 3, 7, 14, 21 和 28d, 每亚组 10 只 (10 眼)。

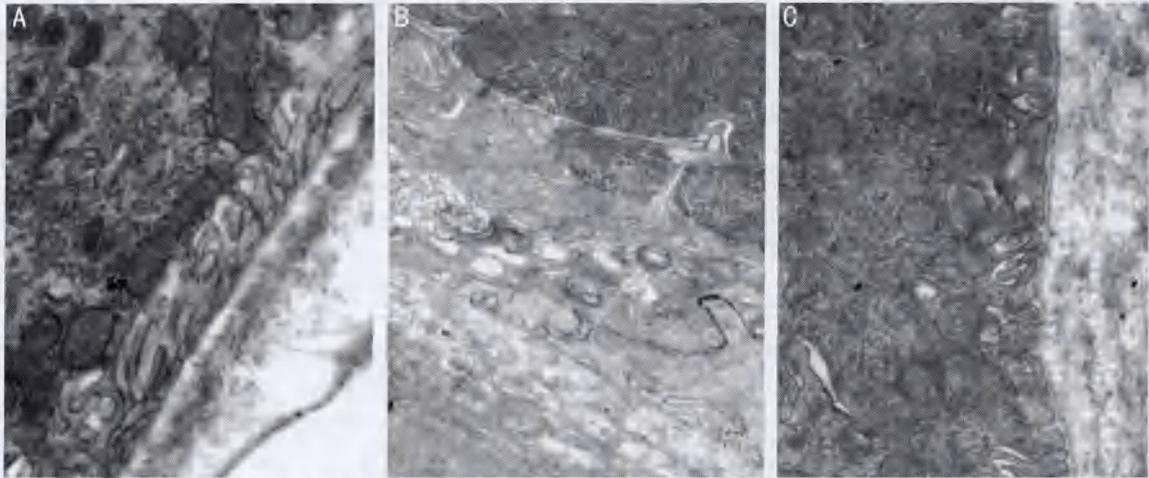


图1 透射电镜结果(TEM×12500) A:tPVR组视杆细胞外节膜盘结构消失,代之以许多黑色粗大颗粒;B:可见圆形式伸圆色素颗粒,视网膜血管内皮细胞膜完整、连续、异染色质分布均匀;C:外伤后应用GM 6001组,视网膜光感受器细胞外节膜盘结构尚清晰,排列欠整齐,与RPE顶部微绒毛连接疏松;RPE基底部质膜内褶较tPVR组多,胞质中含大量线粒体、吞饮小泡和滑面内质网,部分线粒体嵴脱失。细胞连接清晰、规则

## 1.2 方法

**1.2.1 SD大鼠动物模型** (1)实验对照组动物模型制备:SD大鼠左眼为实验眼,右眼为自身对照眼。常规麻醉,散瞳,消毒铺巾,暴露左眼,在显微镜观察下,用微量注射器从颞上方睫状体扁平部即距角膜缘后1mm处向玻璃体腔内、视盘前方注入生理盐水20 $\mu$ L。外伤后12h向玻璃体腔内、视盘前方注射生理盐水20 $\mu$ L。第14d重复注射一次。(2)tPVR组(M)动物模型制备:手术方法同前,注入PRP血浆(自体富含血小板血浆;SD大鼠鼠尾采血1mL,与1/10体积的抗凝剂混合,低速(1000r/min)离心10min,吸取上层液即为PRP)20 $\mu$ L。外伤后12h向玻璃体腔内、视盘前方注射生理盐水20 $\mu$ L。第14d重复注射一次。(3)外伤后应用GM 6001组(T)动物模型制备:手术方法同前,注入PRP血浆20 $\mu$ L。外伤后12h向玻璃体腔内、视盘前方注射20 $\mu$ L(100 $\mu$ mol/L)GM 6001。第14d重复注射一次。

**1.2.2 确立tPVR模型** 外伤后1wk内每日观察眼底,此后每周检查2次,选择性眼底照相。以玻璃体腔内出现增殖膜、视网膜脱离为tPVR模型成功标准。

**1.2.3 取材** 大鼠饲养到期后,静脉注射戊巴比妥钠(60mg/kg),30g/L戊二醛行心脏灌注,迅速摘除眼球,在垫有冰块的平皿上迅速切除眼前节,分离视网膜,以视神经为中心,取颞上及颞下视网膜组织,切成1.5mm×3.0mm长方形小片,迅速固定于预冷的电镜液,4 $^{\circ}$ C保存;送福建医科大学电镜室常规制片,用透射电子显微镜观察视网膜的超微结构;每个标本观察2张切片。

**1.2.4 电镜制片与观察** 取材后经30g/L戊二醛-15g/L多聚甲醛前固定数天(4 $^{\circ}$ C),10g/L锇酸-15g/L亚铁氰化钾后固定1.5h,PBS漂洗;700mL/L乙醇饱和醋酸铀染液块染乙醇-丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋剂包埋。超薄切片80nm,醋酸铀、柠檬酸铅各染色5min;在日立Hu-12A型透射电镜下观察、摄影。

## 2 结果

透射电镜示对照组视网膜光感受器细胞外节膜盘完整,排列整齐;RPE顶部大量较粗短的微绒毛包绕在外节膜盘周围;RPE基底部质膜内褶发达,胞质中含大量线粒体、吞饮小泡和滑面内质网。可见圆形或卵圆形色素颗

粒;视网膜血管内皮细胞核膜完整连续,异染色质分布均匀;细胞连接清晰、规则(图1A)。tPVR组视杆细胞外节膜盘结构消失,代之以许多黑色粗大颗粒;RPE微绒毛与膜盘层脱离,RPE基底部质膜内褶明显减少,胞质中线粒体嵴脱失、部分线粒体呈空泡状,胞质中可见较多滑面内质网,未见吞饮小泡,细胞连接结构模糊不清;视网膜血管内皮细胞核异型明显,核膜不连续,异染色质边集,呈点线状不连续(图1B)。外伤后应用GM 6001组,视网膜光感受器细胞外节膜盘结构尚清晰,排列欠整齐,与RPE顶部微绒毛连接疏松;RPE基底部质膜内褶较tPVR组多,胞质中含大量线粒体、吞饮小泡和滑面内质网,部分线粒体嵴脱失。细胞连接清晰、规则(图1C)。

## 3 讨论

tPVR是发生在眼球贯通伤后因创伤修复的过度瘢痕化所引起的牵引性视网膜脱离。该疾病是眼外伤,尤其是眼后节贯通伤后常见的棘手的严重并发症之一。目前此类疾病尚缺乏有效的预防措施,且临床疗效欠佳。tPVR发病机制目前尚未十分明确。目前,在国内外各种研究中,对tPVR病程中视网膜超微结构改变报道甚少。无论从何种发病机制来说,视网膜的变化在tPVR的发生发展中都起着不可忽略的重要作用。有研究证实,tPVR属于眼内发生的过度损伤修复反应,是一个以时相为特征的程序化过程:包括炎症期、增生期和瘢痕期<sup>[1-3]</sup>。炎症期主要为视网膜裂孔以及血-视网膜屏障的破坏和活性介质释放,临床表现为玻璃体混浊,有蛋白条纹;增生期玻璃体内的尘状棕色颗粒表示视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)的释放,灰色细胞团则是增生的表现;细胞增生达到相当程度形成瘢痕,瘢痕增生膜的收缩会导致牵拉性视网膜脱离。各期的时相也可能存在重叠<sup>[4,5]</sup>。

我们在研究中发现,实验对照组大鼠视网膜光感受器细胞外节膜盘完整,排列整齐。RPE质膜连续,顶部大量细长的微绒毛伸入细胞间隙内,较粗短的微绒毛包绕在外节膜盘周围。基底部大量质膜内褶,其内侧胞浆中含有多量线粒体、吞饮小泡和滑面内质网。可见圆形或卵圆形色素颗粒。视网膜毛细血管由内皮细胞、周细胞和基底膜构成,内皮细胞位于管腔面,外侧有连续的基底膜和周细胞包绕。内皮细胞核内异染色质分布均匀,细胞器、细胞核

形态正常。细胞连接清晰规则。而 tPVR 组大鼠视网膜层次完全改变。视杆细胞外节膜盘层变薄,甚至在视网膜的某些节段缺失、溶解;原本清晰的膜盘板层结构消失,代之以许多黑色粗大颗粒。RPE 微绒毛与膜盘层脱离。RPE 基底部质膜内褶明显减少,胞质中线粒体嵴脱失、部分线粒体呈空泡状。胞质中可见较多滑面内质网,未见吞饮小泡。细胞连接结构模糊不清。视网膜血管内皮细胞核异型明显,核膜不连续,异染色质边集,呈点线状不连续。

透射电镜下观察人眼 tPVR 的增生膜发现,增殖膜标本以长梭形纤维细胞及大量胶原纤维为主要组成部分。一些成纤维细胞膜下可见沿细胞长轴平行排列的微丝束,细胞核大,一些细胞有明显皱褶。亦可见变性的 RPE 细胞:近梭形,表面有分支,胞浆内含大量黑色素颗粒;以及少量吞噬细胞:核大,形态不一,表面有短微绒毛,胞浆内可见次级溶酶体各种形态的退变产物、以及黑色素颗粒。少数病例可见新生血管,典型者含内皮细胞、周细胞和基底膜,有些管径较大。PVR 的组织学检查可见它的细胞成分包括 RPE、神经胶质细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、玻璃体细胞及一些炎性细胞<sup>[6]</sup>。PVR 是由细胞及这些细胞产生的胶原纤维共同组成的。其中,成纤维细胞及 RPE 是主要细胞成分,巨噬细胞和炎性因子则是重要刺激因子。PVR 的细胞间质主要由大量胶原纤维组成,这些胶原纤维是由增生膜中的细胞产生,直径 20~50nm,比正常的玻璃体胶原纤维粗一倍,间质中还有一些白蛋白<sup>[7]</sup>。

我们在研究中发现 GM 6001 实验组,视网膜光感受器细胞外节膜盘结构尚清晰,排列欠整齐,与 RPE 顶部微绒毛连接疏松。RPE 基底部质膜内褶较 tPVR 组多,胞质中含大量线粒体、吞饮小泡和滑面内质网,部分线粒体嵴脱失。细胞连接清晰、规则。GM 6001 又名 Galardon 或 Ilomastat,是一种羧氨酸修饰的二肽,其抑制力为巯基肽的 10~15 倍,是目前已知作用最强的合成的广谱基质金属蛋白酶抑制剂。已有研究表明,GM 6001 可能通过在酶蛋白水平抑制 MMPs 的活性,降低视网膜组织 MMPs 的表达,减轻其对 ECM 的降解和破坏作用;以及抑制其他细胞因子的表达,抑制 RPE 等细胞运动与增殖,减轻炎症反

应。并通过维持视网膜基底膜与 ECM 成分降解和合成的协调<sup>[7,8]</sup>。这在创伤后视网膜组织的修复重塑中可能存在重要意义:减弱基底膜与 ECM 基质的降解,促进新合成胶原的沉积,抑制炎性细胞浸润及其分泌的蛋白水解酶,从而维持细胞的静止状态,保护视网膜组织结构,干预 tPVR 形成<sup>[8-10]</sup>。本研究结果表明 GM 6001 对 tPVR 病程中的视网膜光感受器细胞、RPE、视网膜内外屏障所受到的损害,具有一定程度的保护作用。本研究为临床应用 GM 6001 干预 tPVR 的发生发展提供实验基础及理论依据。

#### 参考文献

- 1 冯春燕,徐国兴. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与增生性玻璃体视网膜病变. 中国实用眼科杂志 2005;23(13):330-333
- 2 Weller M, Wiedemann P, Heimann K. Proliferative vitreoretinopathy is it anything more than wound healing at the wrong place? *Int Ophthalmol* 1990;14:105-117
- 3 Hui YN, Liang HC, Cai YS, et al. Corticosteroids and daunomycin in the prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy induced by macrophages. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:109-114
- 4 Hui YN, Sorgente N, Ryan SJ. Posterior vitreous separation and retinal detachment induced by macrophages. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987;225:297-284
- 5 洪玉,徐国兴. MMP-1、MMP-3、TIMP-1 对外伤性 PVR 的影响研究. 国际眼科杂志 2008;8(10):2195-2198
- 6 Tsanou E, Loachim E, Stefanidou M, et al. Immunohistochemical study of angiogenesis and proliferative activity in epiretinal membranes. *Int J Clin Pract* 2005;59(10):1157
- 7 Loachim E, Stefanidou M, Gorezis S, et al. Immunohistochemical study of extracellular matrix components in epiretinal membranes of vitreoproliferative retinopathy and proliferative diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol* 2005;15(3):384
- 8 徐国兴,吴雅冰. 基质金属蛋白酶抑制剂-GM 6001 干预外伤性增生性玻璃体视网膜病变的研究. 眼科 2008;17(6):415-421
- 9 Ozerdem U, Mach-Hofacre B, Keefe K, et al. The effect of prinomastat (AG3340), a posttraumatic proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 2001;33(1):20-23
- 10 徐国兴,吴雅冰,谢茂松. MMPs 抑制剂-GM 6001 干预外伤性 PVR 的超微结构观察. 眼科研究 2008;26(12):904-907