

曲安奈德对视网膜裂孔光凝愈合的影响

汪 远 常 青

The effects of intravitreal triamcinolone acetate on the healing of retinal perforation after photocoagulation

Wang Yuan, Chang Qing. Department of Ophthalmology, Eye & ENT Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China

Abstract Objective The triamcinolone acetate (TA) is applied to inhibit the development of proliferative vitreoretinopathy (PVR). This study was designed to observe whether the intravitreal administration of TA influence the healing of retinal perforation after photocoagulation in an animal model mimicking the clinical photocoagulation of retinal perforation.

Methods 0.5 mL C₃F₈ was injected intravitreally into both eyes of 8 pigmented rabbits to create a "gas vitrectomy". One week later, laser pipe was inserted into the intraocular through pars plana to touch the retina to create 2 retinal holes in each eye under the surgical microscope. Retinal photocoagulation was performed around the tear by frequency doubled laser, and 4 mg TA was injected intravitreally in the left eye of each rabbit as experimental group and balance fluid to the right eye as control group. The animals were killed and eyeballs were enucleated 2 weeks after injection for the histological examination under the light microscope and transmission electron microscope. TGF-β₂ level in retina around the retinal hole was detected by means of Western blot. **Results** The increase of pigment particles in retinal pigment epithelium (RPE) and the migration of RPE cells were seen, and retinal photoreceptors were obviously decreased around the photocoagulation spot under the light microscope in both experimental group and control group. Under the transmission electron microscope, the proliferation of pigment granule, vacuolar degeneration of endocytosplasmic reticulum and mitochondria in the RPE cells were displayed in control group, and the proliferation of pigment granule and vacuolar degeneration of mitochondria in RPE cells and intact basal membrane of RPE cells were found in experimental group. Western blot assay revealed that TGF-β₂ expression in retina in experimental group was (0.308 ± 0.057), and that in control group was (0.418 ± 0.036), presenting a significant difference between these two groups (*t* = 5.67, *P* < 0.01). **Conclusion** Intravitreal injection of TA may have potential unfavorable effect on the healing of retinal hole after photocoagulation. This procedure may inhibit secretion of TGF-β₂ and delay the local repair of cellular suborgans structure, such as desmosome and microvilli-cross.

Key words triamcinolone acetate; retinal hole; laser photocoagulation; tissue repair; transforming growth factor beta₂

摘要 目的 观察玻璃体腔注射曲安奈德(TA)对视网膜裂孔光凝愈合的影响。**方法** 8只实验兔双眼制作视网膜裂孔模型,光凝孔周,左眼注入4 mg TA作为实验组,右眼注入平衡液作为对照组,光镜和电镜观察双眼裂孔光凝斑,Western blot法测定双眼视网膜裂孔处组织内转化生长因子β₂(TGF-β₂)的表达。**结果** 光镜下两组损伤均主要累及色素上皮层、视锥视杆层、外核层。电镜下仅在对照组发现感光细胞与色素上皮细胞之间微绒毛交叉及色素上皮细胞与邻近细胞之间桥粒连接。实验组裂孔光凝后局部视网膜组织内TGF-β₂的表达量为0.308 ± 0.057,对照组为0.418 ± 0.036,两组比较差异有统计学意义(*P* < 0.01)。**结论** 玻璃体腔注射TA有阻碍视网膜裂孔光凝后愈合的风险。

关键词 曲安奈德; 视网膜裂孔; 光凝; 组织愈合; 转化生长因子β₂

分类号 R 774 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0202-04

玻璃体腔注射曲安奈德(triamcinolone acetate),

TA)对增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)有明确的抑制作用,可明显减轻术后的炎症反应^[1-2]。PVR与视网膜裂孔愈合有着类似的病理生理过程,因此裂孔源性视网膜脱离患者视

作者单位:200031 上海,复旦大学附属耳鼻喉科医院眼科(汪远, 研究生,现在复旦大学附属华山医院眼科,上海 200040)
通讯作者:常青 (Email: qngchang@yahoo.com.cn)

网膜复位手术后玻璃体腔注射 TA 用于抑制 PVR 的同时,可能对视网膜裂孔的愈合有不利影响。临床上已经有学者报道了视网膜复位手术后玻璃体腔注射 TA 出现较多复发性视网膜脱离的现象^[3]。本文通过动物实验初步探讨玻璃体腔注射 TA 对视网膜裂孔光凝后愈合的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物视网膜裂孔模型的制作及光凝

健康清洁级成年青紫蓝兔 8 只,由复旦大学附属眼耳鼻喉科医院实验动物中心提供,实验经该大学动物实验中心批准。体重 2.3~2.6 kg,雌雄不限。眼表面麻醉、消毒后在角膜缘后 2 mm 处缓慢注入约 0.5 mL C₃F₈,同时进行前房穿刺以降低眼压,双眼操作后局部用降眼压、抗炎、扩瞳滴眼液,观察 1 周。盐酸氯胺酮(1~2 mg/kg)肌内注射麻醉,散瞳、眼表面麻醉、消毒,在角膜缘后约 2 mm 处穿刺,经穿刺口伸入眼内激光头,手术显微镜直视下,在双眼视盘下方左右两侧分别轻触视网膜,造成直径约 1.5 PD 的视网膜裂孔各 1 个,随即用氩 532 倍频激光在裂孔周围光凝,能量为 80 mW,曝光时间为 0.3 s,每个裂孔周围光凝 150 个直径约 200 μm 光斑,光凝斑在手术显微镜直视下均呈二级反应,术毕分别向左眼玻璃体腔内注入 0.1 mL (4 mg/0.1 mL) TA 作为实验组,右眼玻璃体腔内注入 0.1 mL 平衡液作为对照组,缝合穿刺口,局部滴用抗炎、扩瞳滴眼液。术后每日滴用抗炎、扩瞳滴眼液。

1.2 组织病理学检查

光凝 2 周后处死实验兔并立即摘除眼球,沿锯齿缘划破眼球,剪取双眼视盘两侧裂孔周围的眼球组织(包括视网膜、脉络膜和巩膜),分别置入光镜或电镜固定液中,固定 48 h。光镜标本经梯度乙醇系列脱水、石蜡包埋后切片,用二甲苯脱蜡,苏木精-伊红染色,光镜观察并用光学显微镜照相摄片。电镜标本用 1% 四氧化锇后固定,系列乙醇逐级脱水,环氧丙烷置换 2 次,浸透,环氧树脂 618 包埋,半薄切片定位后,做超薄切片,置于透射电镜下观察摄片。

1.3 视网膜裂孔处视网膜组织内转化生长因子 β₂ (transforming growth factor β₂, TGF-β₂) 表达的测定

1.3.1 取材 处死 4 只实验兔后立即摘除双侧眼球,在显微镜下找到视网膜裂孔及激光斑,用显微镊剥除局部视网膜组织,置于 -80 °C 冰箱内冷藏。组织称重,切小块放入管中。配置含抑制剂的蛋白质抽提试剂(1 mL 抽提试剂中加入 5 μL 蛋白酶抑制剂混合液, 5 μL PMSF 和 5 μL 磷酸酶混合液)并加入管中(250 mg

组织中加入 1 mL 抽提试剂)。用匀浆器每次 30 s 低速匀浆,每次匀浆间隔冰浴 1 min,至组织完全裂解。裂解液于预冷的离心机中 14 000 r/min 离心 15 min。行 BCA 蛋白质定量后分装,置于 -80 °C 冰箱内冷藏。

1.3.2 Western blot 免疫印迹法 以 10% 变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE 电泳)分离蛋白,30 mA 恒流条件下,4 °C 转移至硝酸纤维素膜过夜。膜在 5% BSA 溶液中室温孵育 1 h 以封闭膜上的非特异结合。封闭过的膜加入兔抗 TGF-β₂ 多克隆抗体一抗(1:500,美国 Santa cruz 公司)室温孵育 1.5 h。TBS/T 洗膜 3 次,每次 5 min。加入 HRP 标记的山羊抗兔多克隆 IgG 抗体为二抗(1:5 000,上海康成生物有限公司),室温孵育膜 1 h。TBS/T 洗膜 3 次,每次 5 min。KCTM 化学发光试剂盒中两种试剂等比例混合为反应液。将膜置于反应液中室温孵育 5 min。用 Image J 分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学分析。Western blot 测得的实验组与对照组视网膜组织内 TGF-β₂ 的含量定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组与对照组间测试指标的比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜下实验兔视网膜裂孔及周围激光斑的组织学表现

实验组与对照组视网膜在光镜下均表现出相似的组织学特征:光凝损伤主要累及色素上皮层、视锥视杆

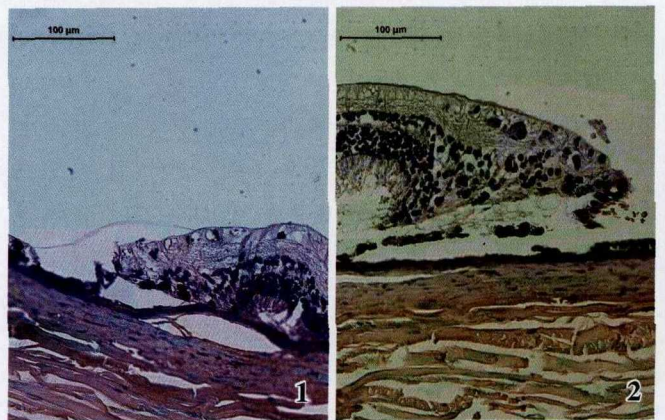


图 1 对照组裂孔边缘的激光斑色素上皮细胞增生和游离(HE × 100) 图 2 玻璃体腔注射 TA 后裂孔边缘的激光斑出现与对照组类似的色素上皮细胞增生和游离(HE × 100)

Fig.1 The obvious proliferation and liberation of RPE cells at photocoagulation spot are seen in control group(HE × 100) Fig.2 The proliferation and liberation of RPE cells in experimental group are similar to control group(HE × 100)

细胞层及外核层。可见色素上皮层细胞增生或萎缩,细胞内色素颗粒增多,并有色素上皮细胞向视网膜内层游离。视锥视杆细胞层破坏、汽化。视网膜外核层细胞萎缩、细胞数量减少、局部坏死。两组裂孔边缘的激光斑均出现明显的色素上皮细胞的增生和游离(图 1,2)。

2.2 电镜下实验兔视网膜裂孔及周围激光斑的组织细胞学表现

实验组与对照组均表现为视网膜色素上皮细胞内色素大量增生,色素上皮层的基底膜完整,色素上皮细胞胞浆内可见到内质网和线粒体的空泡变性(图 3,4)。有特征意义的是,仅在对照组观察到视网膜光凝损伤修复过程中产生的感光细胞与色素上皮细胞之间的微绒毛交叉以及色素上皮细胞与邻近细胞之间的桥粒连接(图 5,6)。

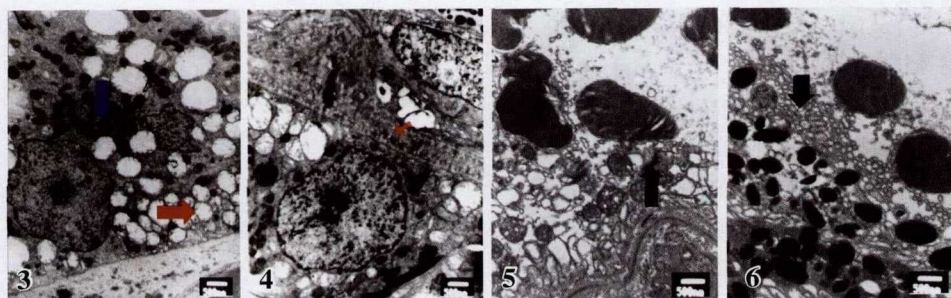


图 3 对照组色素上皮细胞内色素颗粒(红箭头)大量增生,胞浆内质网和线粒体空泡变性(蓝箭头)
图 4 实验组色素上皮细胞内色素颗粒增生及线粒体空泡变性,可见色素上皮细胞完整的基底膜(箭头)
图 5 对照组色素上皮细胞与邻近细胞之间的桥粒连接(箭头) 图 6 对照组感光细胞与色素上皮细胞之间的微绒毛交叉(箭头)

Fig. 3 The proliferation of pigment granule (red arrow), vacuolar degeneration of endocyttoplasmic reticulum and mitochondria (blue arrow) in the RPE cells are displayed in control group Fig. 4 The proliferation of pigment granule and the vacuolar degeneration of mitochondria in RPE cells and intact basal membrane of RPE cells are found (arrow) in experimental group Fig. 5 The desmosome connection (arrow) between the RPE cell and adjacent cell is exhibited in control group Fig. 6 The cross network among microvilli is seen in control group

2.3 视网膜裂孔局部的视网膜组织 TGF-β₂ 的表达

实验组视网膜裂孔光凝灶局部的视网膜组织内 TGF-β₂ 的含量为 0.308 ± 0.057, 对照组为 0.418 ± 0.036, 两组比较差异有统计学意义(t = 5.67, P < 0.01)。

3 讨论

本实验选择了 Smiddy 等^[4] 在类似研究中所采用的简易动物模型并加以改良,参照临床上治疗要求以达到 Wallow 二级光凝斑反应为标准对实验动物视网膜裂孔进行光凝。实验中 TA 玻璃体腔注射剂量的选择与目前大多数视网膜术后用量相一致。既往研究表明,桥粒连接结构在眼内组织中仅见于睫状体上皮和视网膜冷凝术后的组织改变^[5];在针对视网膜冷凝灶

的组织学研究中,损伤修复过程中所产生的细胞间新建立的桥粒连接和微绒毛交叉结构被认为是产生裂孔愈合黏附力的基础^[6]。本研究表明,光凝 2 周后实验组和对照组视网膜裂孔光凝灶局部损伤的组织学表现有类似的过程,光镜下主要累及视网膜外层,均呈现典型的二级光凝损伤反应的特征,两组均未见明显的纤维化和瘢痕形成。透射电镜观察发现两组细胞损伤性表现一致,仅在对照组观察到视网膜光凝损伤修复过程中产生的感光细胞与色素上皮细胞之间微绒毛交叉增多的现象以及色素上皮细胞与邻近细胞之间的桥粒连接。提示玻璃体腔注射 TA 对视网膜裂孔光凝后愈合的光镜下形态改变与对照组比较无特征性的区别,而在电镜水平的超微结构上对照组的裂孔修复过程较玻璃体腔注射 TA 后进展更快,反应更显著。

TGF-β₂ 是一种具有多种生物学活性的细胞因子,参与眼内一系列损伤修复、瘢痕化的过程,如 PVR 的发生发展、结膜伤口的愈合、白内障的形成等^[7-15]。TGF-β₂ 所具有的生物学效应使得视网膜裂孔光凝区局部视网膜组织的 TGF-β₂ 的含量能间接反映视网膜组织对光凝损伤的修复反应程度,并能预测视网膜裂孔光凝灶处视网膜组织进一步愈合和纤维化的速度和进度。应用 Western blot 检测发现玻璃体腔注射 TA 后裂孔光凝后局部视网膜组织的 TGF-β₂ 的表达低于对照组。这一结果提示玻

璃体腔注射 TA 可能通过下调局部 TGF-β₂ 的分泌表达从而阻碍裂孔光凝局部的愈合和纤维化的进程而影响视网膜裂孔光凝后的愈合。

本实验提示视网膜脱离复位术后应用玻璃体腔注射 TA 抗炎、抗 PVR 的患者应重视术后随访,警惕裂孔源性视网膜脱离的复发。

参考文献

- 1 Cheema RA, Peyman GA, Fang T, et al. Triamcinolone acetonide as an adjuvant in the surgical treatment of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy[J]. Ophthalmic Surg, Lasers & Imaging, 2007, 38 (5): 365 - 370
- 2 Karalezli A, Borazan M, Akova YA. Intracameral triamcinolone acetonide to control postoperative inflammation following cataract surgery with phacoemulsification[J]. Acta Ophthalmol, 2008, 86 (2): 183 - 187
- 3 段安丽, 王景昭. 曲安奈德玻璃体腔注射治疗脉络膜脱离型视网膜

脱离的初步研究[J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(7): 606 - 609

4 Smiddy WE, Hernandez E. Histopathologic characteristics of diode laser-induced chorioretinal adhesions for experimental retinal detachment in rabbit eyes[J]. Arch Ophthalmol, 1992, 110(11): 1630 - 1633

5 惠延年, 译. 视网膜脱离最小量手术治疗实用指南 1[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2004: 100

6 Lincoff H, Kreissig I. The anatomy of the cryosurgical adhesion[J]. Conc Ophthalmol Mexicana Acta, 1970, 1(3): 406 - 418

7 Yang F, Strand DW, Rowley DR. Fibroblast growth factor-2 mediates transforming growth factor-beta action in prostate cancer reactive stroma[J]. Oncogene, 2008, 27(4): 450 - 459

8 Connor TB, Roberts AB. Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye[J]. J Clin Invest, 1989, 83(5): 1661 - 1666

9 Hales AM, Chamberlain CG. Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(8): 1709 - 1713

10 Kay EP, Lee HK. Indirect mitogenic effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation of subconjunctival fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(3): 481 - 486

11 Ashcroft GS, Dodsworth J. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta₁ levels[J]. Nat Med, 1997, 3(11): 1209 - 1215

12 Shah M, Foreman DM. Neutralisation of TGF-beta₁ and TGF-beta₂ or exogenous addition of TGF-beta₃ to cutaneous rat wounds reduces scarring[J]. J Cell Sci, 1995, 108(3): 985 - 1002

13 Levine JH, Moses HL. Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor-beta-1, -beta-2 and -beta-3 during excisional wound repair[J]. Am J Pathol, 1993, 143(2): 368 - 380

14 Merwin JR, Roberts A, Kondiah P, et al. Vascular cell responses to TGF-beta 3 mimic those of TGF-beta 1 in vitro[J]. Growth Factors, 1991, 5(2): 149 - 158

15 Iongh RU, Wederell E, Lovicu FJ, et al. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation[J]. Cells Tissues Organs, 2005, 179(1-2): 43 - 55

(收稿: 2008-08-22 修回: 2008-11-25)

(本文编辑: 刘 艳)

· 病例报告 ·

伴有青光眼及高度远视的 Sturge-Weber 综合征一例

李焕丽 郑燕林 周季家 李春丽

患者, 女, 36 岁, 因左眼睑肿物逐渐增大 10 余年, 影响美观, 为行手术治疗到我院就诊。患者 26 年前左眼眼睑出现小肿物, 逐渐长大, 10 余年前因影响美观行激光切除术, 术后复发。左眼自幼视力不佳, 常伴眼红, 偶有轻度眼胀。身体及智力发育正常, 无癫痫发作病史, 家族中无类似病例。眼科检查: 视力右眼 1.2, 左眼 0.08, 小孔镜下视力 0.2; 眼压右眼 19.7 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 左眼 35.3 mmHg。左眼眼睑、颜面及眶周皮肤呈紫红色, 沿左侧三叉神经 I、II 支分布, 至鼻中线, 高出于皮肤, 压之不褪色, 皮温稍高, 上睑缘正中可见一球状肿物, 直径约 5 mm, 与周围皮肤颜色相同, 表面无色素沉着及溃疡(图 1)。裂隙灯下可见肿物内血管扩张, 质韧, 与周围组织

无粘连。眼平视时肿物遮挡瞳孔, 球结膜充血, 血管迂曲, 角膜透明, 晶状体、玻璃体未见异常。右眼前节未见异常。双眼眼底见视盘杯盘比扩大, 约为 0.7, 血管呈屈膝状,

改变视网膜静脉血管充盈, A/V = 1:2。双眼眼位及活动度正常。术中将眼睑肿物切除并送病理检查。术后左眼视力 0.08 (+6.00 DS = 0.6); 眼压右眼在 20 mmHg 波动, 左眼在 30 mmHg 波动; 左眼视野可见旁中心暗点(矫正视力后), 右眼正常。房角检查: 左眼角呈窄 1 和窄 2 改变; HRT 示左眼鼻侧视盘损害; 角膜地形图如图 2、图 3 示。肿物病理结果示血管瘤。诊断: (1) Sturge-Weber 综合征; (2) 左眼睑血管瘤; (3) 左眼继发性青光眼; (4) 左眼高度远视; (5) 左眼弱视。给予噻吗洛尔滴眼液点左眼, 眼压下降至 20 mmHg 左右。

讨论: Sturge-Weber 综合征又称脑三叉神经血管瘤病、神经皮肤血管瘤病等, 属于先天性但非遗传性疾病, 婴幼儿及青少年青光眼是本症的主要特征, 患者可表现为眶部血管瘤、眼肌麻痹、斜视、高度屈光不正、偏盲、眼球突出、结膜巩膜毛细血管扩张、角膜缘血管网及角膜变性、虹膜异色、虹膜萎缩、虹膜血管瘤、先天性晶状体移位混浊、视盘缺损及水肿^[1]。全身可见颜面血管瘤、癫痫、智力发育异常等^[2], 为胚胎时期原始血管系统发育畸形的结果。相关文献对合并青光眼的报道较多, 而屈光的问题较少报道。我们对该患者视力进行矫正后, 视野有了明显的改善, 为青光眼的诊治提供了更准确的资料。因此在患者早期就诊时即进行严格的屈光检查对高度屈光不正、弱视及青光眼的诊治均具有重要的临床意义。

参考文献

1 林顺潮, 赵秀琴, 译. 常见眼病综合症[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 451 - 453

2 Pascual-Castroviejo I, Pascual-Pascual SI, Velazquez-Fragua R, et al. Sturge-Weber syndrome: study of 55 patients[J]. Canada J Neurol Sci, 2008, 35(3): 301 - 307



图 1 左眼睑肿物外观

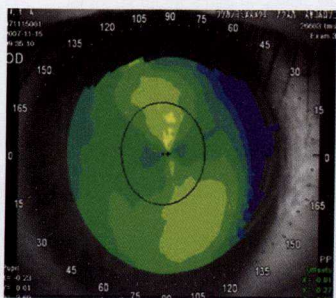


图 2 右眼角膜地形图

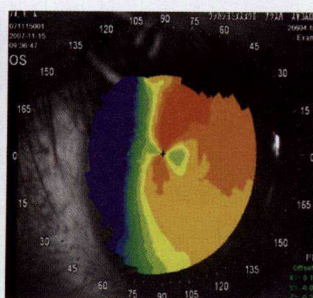


图 3 左眼角膜地形图