

# 兔眼玻璃体切割术中应用 dispase 的毒性研究

高永峰 尹娟娟

## Toxic effects of dispase on retina in rabbit

Gao Yongfeng, Yin Juanjuan. Henan Eye Institute, Zhengzhou 450003, China

**Abstract Objective** The present study is designed to observe the safe dose of dispase in vitrectomy. **Methods** Twenty-four adult New Zealand white rabbits were randomized into A, B and C groups and 8 for each, and the right eyes were experimental eyes. The different dosage of dispase (0.05, 0.1, 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) was intravitreally injected in the right eye of each rabbit during the nuclear vitrectomy in A, B, C group, respectively. An equivalent volume of 0.01 mol/L sterile phosphate-buffered saline (PBS) was injected into the fellow eye as control. The animals were sacrificed and the eyeballs were enucleated for the histopathological examination to evaluate the toxicity of dispase under the transmission electronic microscope and light microscope 3 months later. **Results** The structure of retina was integrated in 0.05, 0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase injection groups, and decrease of retinal nerve ganglion cells was found in 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase injection group at the 3 months after surgery under the light microscope. The ultrastructure of retina was almost normal in group A at 3 months after dispase injection under the transmission electron microscope, however, the inner segment and outer segment of photoreceptor cells showed the structural disorder, edema of bipolar cell, collapse and vacuolus change of mitochondrial crista in group B and group C. No obvious ultrastructure change was found in retina of the control group. **Conclusion** Dispase can induce posterior vitreous detachment in vitrectomy of rabbit at the dosage of 0.05, 0.1, 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . This study implies that intravitreal administration of dispase may have the toxic effect on retina in a higher dosage.

**Key words** dispase; posterior vitreous detachment; ultrastructure; retina

**摘要 目的** 兔眼中央玻璃体切割后注射 dispase 蛋白酶, 观察 dispase 蛋白酶诱导玻璃体后脱离 (PVD) 形成的安全浓度。 **方法** 新西兰白兔 24 只, 随机分为 A、B、C 组, 每组 8 只, 以右眼为实验眼, 左眼为对照眼。兔眼中央玻璃体切割后注射 0.5 mL dispase, 浓度分别为 A 组 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 、B 组 0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 、C 组 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ; 对照组注射 0.5 mL 无菌 PBS。用药 3 个月后光镜和透射电镜观察 dispase 蛋白酶对视网膜超微结构的影响。 **结果** 光镜下可见 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}$  组、0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  组、对照组眼视网膜结构完整, 排列整齐, 未发现异常改变。0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$  组神经节细胞减少。透射电镜下见各实验组动物视网膜内界膜清晰完整, 但 A 组用药 3 个月后视网膜光感受器内外节结构大致正常, B 组、C 组实验眼视网膜在用药 3 个月后有不同程度的光感受器内外节结构紊乱; 节细胞水肿, 线粒体嵴断裂、空泡变。对照组视网膜超微结构未见明显异常。 **结论** 0.05、0.1、0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$  的 dispase 均可以诱导兔眼的玻璃体后脱离, 随着浓度的增加, 毒性增大。

**关键词** dispase; 玻璃体后脱离; 超微结构; 视网膜

**分类号** R 776.4 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)04-0293-03

Moorhead 等<sup>[1]</sup>首次提出酶辅助的玻璃体切割手术的概念。在术中或术前使用药物引起的玻璃体后脱离均可以辅助手术。dispase 蛋白酶为自多黏芽孢杆菌中提取的一种非特异性蛋白酶, 目前有研究证实 dispase 蛋白酶可以诱导玻璃体后脱离 (posterior vitreous detachment, PVD), 术中应用 dispase 蛋白酶是

作为简化手术的辅助工具, 对其毒性的研究仅限于在玻璃体腔中单纯注射 dispase 蛋白酶。本实验中, 对兔眼进行中央玻璃体切割后注射 dispase 蛋白酶, 观察 dispase 蛋白酶诱导 PVD 形成的安全浓度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物及分组 健康成年新西兰白兔 24 只

作者单位: 450003 郑州, 河南省眼科研究所

通讯作者: 尹娟娟 (Email: bigcabbage2007@163.com)

(48 只眼), 体重 2.0 ~ 2.5 kg (河南省动物中心提供)。将实验动物分为 A、B、C 组, 每组 8 只 (16 只眼), 左眼为对照眼, 右眼为实验眼。

**1.1.2 主要试剂和仪器** dispase 蛋白酶 6  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  (德国 Roche 公司)。YZ-200 手术显微镜 (苏州医疗器械厂); Hammony 玻璃体切割机 (荷兰医疗基础设备公司)。

**1.2 方法**

**1.2.1 动物模型的制备** 术前 30 min 用复方托品酰胺滴眼液点眼 3 次, 使瞳孔充分散大。耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠溶液 (1.5 mL/kg) 全身麻醉。进行兔眼中央玻璃体切割分别注射 dispase 蛋白酶 0.5 mL, 含量为 A 组 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 、B 组 0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 、C 组 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ; 在玻璃体腔中保留 5 min, 灌注 2 min, 缝合巩膜穿刺口。对照组注射 0.5 mL 无菌 PBS。

**1.2.2 透射电镜观察** 每组各取 6 只兔用药 3 个月, 经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠 (1.5 mg/kg) 麻醉后, 立即摘除眼球, 4% 戊二醛溶液固定, 4 h 后冲洗。取 1 mm<sup>2</sup> 眼球后极部全层组织块 1% 锇酸液固定 1.5 h, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂浸透包埋, 半薄切片进行光镜定位。超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色, 进行透射电镜观察。

**1.2.3 苏木精 - 伊红染色** 每组 2 只兔用药 3 个月 后摘除眼球, 置预冷的 2.5% 戊二醛固定液中 4  $^{\circ}\text{C}$  固定 2 h, 剪除眼前节, 再于 2.5% 戊二醛固定液中 4  $^{\circ}\text{C}$  固定 1 d, 常规石蜡包埋, 7  $\mu\text{m}$  连续切片, 苏木精 - 伊红染色, 观察视网膜形态和超微结构的改变, 研究药物的毒性。

**2 结果**

**2.1 苏木精 - 伊红染色**

对照组、A 组、B 组视网膜各层结构排列整齐, 未见明显异常 (图 1)。C 组可见视网膜神经节细胞减少 (图 2)。

**2.2 透射电镜观察结果**

对照组视网膜各层超微结构未见明显损害征象 (图 3)。A、B、C 组内界膜清晰完整, 表面光滑, A 组用药 3 个月 后视网膜光感受器内外节结构大致正常, B 组、C 组实验眼视网膜在用药 3 个月 后有不同程度的光感受器内外节结构紊乱; 节细胞水肿, 线粒体嵴断裂、空泡变、大部分积液融合, 缺失, 大部分膜融合, 模糊不清, 粗面内质网轻度扩张, 脱颗粒 (图 4 ~ 10)。

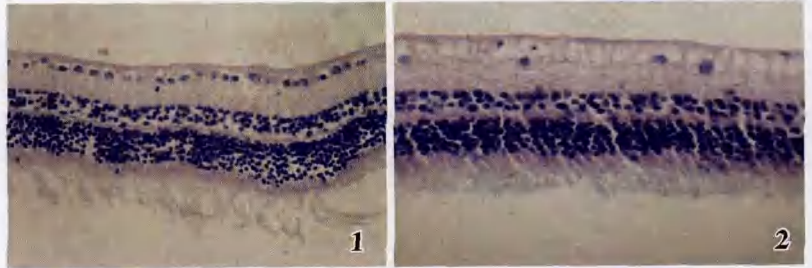


图 1 对照组、A 组和 B 组用药后 3 个月, 视网膜各层结构未见明显异常 (HE  $\times 400$ )

图 2 C 组用药后 3 个月, 视网膜神经节细胞减少 (HE  $\times 400$ )

**Fig. 1** The structure of retina was integrated, and no any abnormality was found in control group, 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group and 0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group at 3 months after injection (HE  $\times 400$ ) **Fig. 2** The number of retinal ganglion cells is decreased in 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group at 3 months after injection (HE  $\times 400$ )

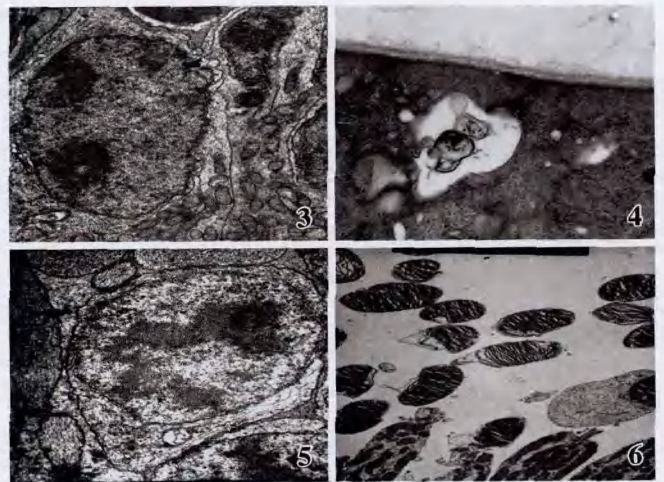


图 3 对照组用药后 3 个月, 外核层细胞排列大致规则, 未见细胞器 ( $\times 3500$ ) 图 4 C 组用药后 3 个月可见完整的内界膜 ( $\times 8000$ )

图 5 C 组用药后 3 个月, 外核层线粒体大部分积液融合, 缺失、大部分膜融合, 模糊不清, 粗面内质网轻度扩张、脱颗粒 ( $\times 8000$ )

图 6 C 组用药后 3 个月, 外节数量减少, 排列松散 ( $\times 4000$ )

**Fig. 3** The arrangement of cells of outer nuclear layer was in good order, and no organelle was seen in 3 months after injection under the transmission electron microscope ( $\times 3500$ ) **Fig. 4** Retinal inner limited membrane was integrated in 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group under the transmission electron microscope ( $\times 8000$ )

**Fig. 5** The edema of bipolar cells, collapse of mitochondrial crista, vacuolus change, fusion and loss of fluidify, expand and detrunulation of rough endoplasmic reticulum were found in 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group ( $\times 8000$ ) **Fig. 6** The arrangement of outer segment of photoreceptor cells was disordered in 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group after 3 months ( $\times 4000$ )

**3 讨论**

玻璃体和视网膜之间的粘连与许多视网膜疾病的发生发展密切相关<sup>[2-3]</sup>。完全性 PVD 对许多玻璃体视网膜疾病的预后有良好的作用, 对于预防术后 PVR 的形成和视功能的恢复有重要的意义。多种药物和酶类制剂应可造成完全性 PVD, 促进玻璃体液化、解除 V-R

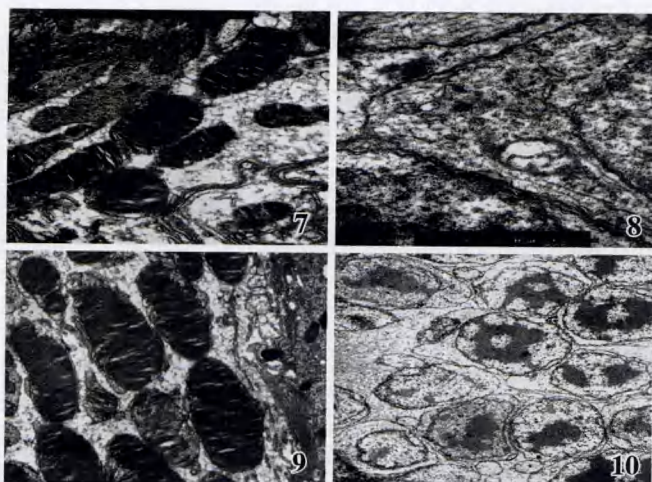


图 7 B 组用药后 3 个月,外节病变较轻( $\times 8\,000$ ) 图 8 B 组用药后 3 个月,节细胞水肿,线粒体嵴断裂,空泡变,线粒体大部分积液融合,缺失,大部分膜融合,模糊不清,粗面内质网轻度扩张,脱颗粒( $\times 20\,000$ ) 图 9 A 组用药后 3 个月,外节排列基本整齐,膜盘轻度变化( $\times 8\,000$ ) 图 10 A 组用药后 3 个月,外核层细胞排列大致规则( $\times 3\,500$ )

Fig. 7 The outer segment showed the mild change in 0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group under the transmission electron microscope ( $\times 8\,000$ )

Fig. 8 The cellular edema, mitochondrial crista collapse, vacuolus change, fusion and loss of fluidify, membrane fusion, expand and detumulation of rough endoplasmic reticulum were found in 0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group ( $\times 20\,000$ ) Fig. 9 The arrangement of outer segment of photoreceptors was in good order, but the mild abnormality was seen in the disc membrane in 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group ( $\times 8\,000$ ) Fig. 10

The arrangement of cells in outer nuclear layer was normal under the transmission electron microscope in 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}$  dispase group after 3 months ( $\times 3\,500$ )

间粘连<sup>[4-5]</sup>,但目前尚无应用于临床的报道。中性 dispase 蛋白酶作用于玻璃体视网膜界面的 IV 型胶原和纤维连接蛋白,从而诱发完全性 PVD。Tezel 等<sup>[6]</sup>报道在离体的猪眼和人尸眼中注射 0.1 ~ 0.5  $\mu\text{mol}/\text{min}$  的 dispase, 可以造成 PVD 模型。

对于 dispase 蛋白酶的安全性研究,黄玲等<sup>[7]</sup>报道多数实验眼注药后均出现前房渗出及玻璃体混浊,但随着时间的延长,前房及玻璃体反应基本消失。本实验对晶状体后囊、玻璃体出血等方面未进行研究。

视网膜的毒性检测结果是实验用药的重要指标,以往对 dispase 蛋白酶视网膜毒性研究时间最长为 28 d,观察时间较短,难以评价该酶使用的安全性。ERG 检查对了解术后视网膜功能十分重要<sup>[8]</sup>,但透射电镜及光学显微镜更能准确、客观地反映视网膜细胞的结构和功能改变。本研究实验眼用药 3 个月后光学

显微镜显示 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}$  组、0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  组、对照组眼视网膜结构完整,排列整齐,未发现异常改变。0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}$  组眼有神经节细胞减少。透射电镜下见各实验组动物视网膜内界膜清晰完整,未见明显受损,Müller 细胞足板完好无损,与 Oliveira 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。本研究显示 A、B、C 组实验眼视网膜在用药 3 个月后有不同程度的节细胞、双极细胞水肿,线粒体嵴断裂,空泡变,光感受器内外节结构紊乱,说明较大剂量的 dispase 对视网膜有毒性作用,透射电镜发现视网膜的神经节细胞和光感受器的损害。当剂量大于 0.05  $\mu\text{mol}/\text{min}$  时,尽管应用 0.5 mL 的 dispase 在玻璃体切割手术中能够有效地诱发 PVD,术中能快速灌洗了玻璃体腔,但残留的 dispase 蛋白酶随着在玻璃体腔中持续时间的延长及剂量的增加,该酶的毒性也随之增加。

本实验仅研究了 dispase 对视网膜的毒性,未排除灌洗对视网膜的损伤作用,所以 dispase 能否应用于临床,应用浓度、时机及效果均有待进一步的研究。

## 参考文献

- 1 Moorhead LC, Chu HH, Garcia CA. Enzyme-assisted vitrectomy with bacterial collagenase. Time course and toxicity studies [J]. Arch Ophthalmol, 1983, 101(2): 265 - 274
- 2 Sebag J. Classifying posterior vitreous detachment; a new way to look at the invisible [J]. Br J Ophthalmol, 1997, 81(7): 521
- 3 Kakehashi A, Kado M, Akiba J, et al. Variations of posterior vitreous detachment [J]. Br J Ophthalmol, 1997, 81(7): 527 - 532
- 4 Hikichi T, Yanagiya N, Kado M, et al. Posterior vitreous detachment induced by injection of plasmin and sulfur hexafluoride in the rabbit vitreous [J]. Br J Ophthalmol, 1999, 19(1): 55 - 58
- 5 Hesse L, Kroll P. Enzymatically induced posterior vitreous detachment in proliferative diabetic vitreoretinopathy [J]. Klin Monatsbl Augenheilk, 1999, 214(2): 84 - 89
- 6 Tezel TH, del Priore LV, Kaplan HJ. Posterior vitreous detachment with dispase [J]. Retina, 1998, 18(1): 7 - 15
- 7 黄玲, 王玲玲, 王海燕, 等. Dispase 蛋白酶诱导兔眼玻璃体后脱离的实验研究 [J]. 国际眼科杂志, 2005, 5(2): 246 - 249
- 8 江枫桦, 张哲, 孙晓东, 等. Dispase 蛋白酶诱导兔眼玻璃体后脱离的效果与安全性评价 [J]. 眼科研究, 2003, 21(2): 121 - 124
- 9 Oliveira LB, Yashi MT, Mahmoud TH, et al. Dispase facilitates posterior vitreous detachment during vitrectomy in young pigs [J]. Retina, 2001, 21(4): 324 - 331

(收稿: 2008-07-02 修回: 2009-02-19)

(本文编辑: 王莉红)