

#### 4 应用前景及存在的问题

综上所述,与其他常用标记物如  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -gal) 和 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 相比,GFP 应用于角膜内皮疾病基因治疗领域的主要优势在于分裂或静息状态下的 CEC 都可以被成功标记,同时活体观察可使基因转染过程可视化;GFP 仅标记活细胞,细胞死亡荧光便随即消失,无扩散干扰;携带 GFP 的转基因动物的转染效果更加稳定,表达时间可大大延长。当然,GFP 也存在一些不足,如 GFP 的表达随载体的不同和体内外环境的转换,转染效率可以差别很大;GFP 突变体能表达不同颜色的荧光,但性质还欠稳定,使得 GFP 双标记或多标记技术的推广受限等。随着对这些问题的深入研究,GFP 在 CEC 的基因转染效果检测、细胞内定位、移植 CEC 来源鉴别及命运追踪、创伤愈合机制等方面的应用空间将进一步扩大。

#### 参考文献

- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, aequorea [J]. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59: 223 - 239
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, et al. Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein [J]. *J Gene*, 1992, 111: 229 - 233
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science*, 1994, 263: 802 - 805
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, et al. Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein [J]. *Science*, 1996, 273: 1392 - 1395
- Cody CW, Prasher DC, Westler WM, et al. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the aequorea green-fluorescent protein [J]. *Biochemistry*, 1993, 32: 1212 - 1218
- Gubin AN, Reddy B, Njoroge JM, et al. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells [J]. *Biochem Biop Res Commun*, 1997, 236: 347 - 350
- Stadtfeld M, Varas F, Graf T. Fluorescent protein-cell labeling and its application in time-lapse analysis of hematopoietic differentiation [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 105: 395 - 412

- Tsien RY. The green fluorescent protein [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509 - 544
- Tavare JM, Fletcher LM, Welsh GI, et al. Using green fluorescent protein to study intracellular signaling [J]. *J Endocrinol*, 2001, 170: 297 - 306
- Liu YP, Dovzhenko OV, Garthwaite MA, et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells stably over-expressing enhanced green fluorescent protein [J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13: 636 - 645
- Kahn J, Byk T, Jansson-Sjostrand L, et al. Overexpression of CXCR4 on human CD34 + progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation [J]. *Blood*, 2004, 103: 2942 - 2949
- Teresa B. Recent developments in ocular gene therapy [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76: 643 - 652
- Lai L, Lin K, Foulks G, et al. Highly efficient ex vivo gene delivery into human corneal endothelial cells by recombinant adeno-associated virus [J]. *Curr Eye Res*, 2005, 30: 213 - 219
- 袁进, 陈家祺, 刘祖国, 等. IL-1ra 基因修饰角膜内皮细胞及其表达 [J]. *眼科新进展*, 2006, 26: 2 - 6
- Nguyen TH, Murakami A, Fujiki K, et al. Transferrin-polyethylenimine conjugate, FuGENE6 and TransIT-LT as nonviral vectors for gene transfer to the corneal endothelium [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2002, 46: 140 - 146
- Challa P, Luna C, Liton PB, et al. Lentiviral mediated gene delivery to the anterior chamber of rodent eyes [J]. *Mol Vis*, 2005, 11: 425 - 430
- Borrás T, Gabelt BT, Klintworth CK, et al. Non-invasive observation of repeated adenoviral GFP gene delivery to the anterior segment of the monkey eye in vivo [J]. *J Gene Med*, 2001, 3: 437 - 449
- Qian Y, Leong FL, Kazlauskas A, et al. Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer to corneal graft endothelial cells in mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45: 2187 - 2193
- Klebe S, Coster DJ, Sykes PJ, et al. Prolongation of sheep corneal allograft survival by transfer of the gene encoding ovine IL-12-p40 but not IL-4 to donor corneal endothelium [J]. *J Immunol*, 2005, 175: 2219 - 2226
- Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, et al. Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts [J]. *J Exp Med*, 2002, 195: 259 - 268
- Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, et al. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 497 - 503
- Brazelton TR, Blau HM. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo [J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 1251 - 1265

(收稿:2008-10-19 修回:2009-05-20)

(本文编辑:王莉红)

#### · 临床经验 ·

### 玻璃体视网膜手术治疗严重眼外伤的临床观察

贾乃伟 李兵 李寅伟 张爽 张晓飞 李玉娟

开放性眼外伤合并眼内异物常伴有多种并发症,若不及时治疗,则发展为增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR),重者导致眼球萎缩。我院对严重眼外伤患者进行玻璃体视网膜手术治疗和随访观察,报告如下。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本组病例为 2004—2008 年在本院住院治疗的开放性眼外伤患者 45 例 (46 眼),其中男 39 例 (40 眼),女 6 例 (6 眼);右眼 22 眼,左眼 24 眼;年龄 8 - 63 岁。术前视力无光感者 1 例 (1 眼),光感 ~0.05 者 37 例 (37 眼),0.06 ~0.1 者 7 例 (8 眼)。其中眼球破裂伤 13 眼,眼球贯通伤 8 眼,眼内异物 25 眼;非磁性异物 9 眼,磁性异物 16 眼。术前合并外伤性白内障 27 眼,晶状体脱入玻璃体腔 4 眼,晶状体脱失 3 眼,视网膜脱

离 32 眼,合并脉络膜脱离 3 眼,所有患眼均伴有玻璃体出血。

**1.2 手术方法** 本组开放性眼外伤均先行一期角膜巩膜伤口清创缝合。一期术后在抗炎治疗同时行 B 型超声、X 线及 CT 眼部检查,以确定异物的性质、位置、异物与视网膜的关系,伤后 10~14 d 行玻璃体切割联合晶状体摘出及异物取出术。

所有患眼均采用经睫状体平坦部三通道闭合式玻璃体切割术。年轻患者外伤性白内障使用玻璃体切割头切除晶状体,尽量保留晶状体前囊。年长患者外伤性白内障经角膜巩膜隧道切口取出。晶状体脱入玻璃体腔者经重水浮起后切除,或经前房由常规的白内障切口取出。术中先切除中轴部和后部玻璃体后,再用巩膜压陷法切除基底及周边玻璃体。寻找到异物后,先将异物包膜切开,充分游离异物。如异物嵌于视网膜上且靠近血管,行水下电凝以防视网膜出血,根据异物大小将平坦部切口适当扩大,伸入异物钳或接力磁棒摘出异物,部分较大异物送入前房,经角膜巩膜隧道切口取出。2 例片状大异物从原角膜伤口取出。术中切除玻璃体条索,剥离视网膜前膜,解除玻璃体对视网膜的牵引。对视网膜瘢痕、视网膜下增生及视网膜嵌顿致视网膜不能平覆者,行视网膜切开,彻底解除视网膜下牵引,恢复视网膜的活动度。根据眼内情况选用气液交换或用重水平覆视网膜,对视网膜裂孔行眼内光凝或巩膜外冷凝,玻璃体腔 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 或硅油填充,术后必要时进行光凝补充治疗。术后随访 3~15 个月。

**2 结果**

**2.1 术后眼内填充物情况** 术后注入硅油者 36 眼,注入 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 者 5 眼,未填充者 5 眼。C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 全部吸收平均需 65 d,3~6 个月后取出硅油者 32 眼,1 眼硅油取出后视网膜脱离复发,放弃治疗。3 眼因伤情严重及并发症未取出硅油,为硅油依赖眼。

**2.2 术后视力** 术后视力提高者 40 眼(87%),视力下降者 4 眼(9%),视力不变者 2 眼(4%)。矫正视力较好者在硅油取出后行人工晶状体植入术,手术前后视力变化见表 1。

表 1 患者手术前后矫正视力比较(眼数)

	n	无光感	光感 ~0.05	0.06 ~0.1	0.2 ~0.3
术前	46	1	37	8	0
术后	46	0	14	24	8

**2.3 视网膜复位情况** 本组患者视网膜脱离 32 眼,术后 27 眼解剖复位,2 眼硅油取出术后视网膜再脱离,其中 1 眼经再次手术复位,1 眼放弃治疗。3 眼术后下方视网膜出现增生及局限性视网膜脱离,未取出硅油。注入 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 的 1 眼气体全部吸收后,于上方一侧穿刺口处出现局限性视网膜脱离,经激光补充治疗,脱离范围未扩大。

**2.4 术后并发症** 注入硅油的 11 眼和注入 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 气体的 2 眼术后眼压均升高,经药物治疗后眼压均可以控制在 24 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 以下。硅油乳化引起眼压增高者取出硅油后眼压恢复正常,1 例硅油取出后视网膜再脱离,导致低眼压,眼球萎缩。8 眼出现继发性白内障,5 眼在硅油取出手术后由于玻璃体视网膜增生,导致视网膜脱离复发。

**3 讨论**

机械性眼外伤可造成眼球结构破坏和视功能损害。David 等<sup>[1]</sup>对开放性眼外伤的预后进行研究,表明开放性眼外伤眼球摘除者占 28%,视力为无光感者占 10%,光感 ~0.1 者占 24%, >0.1 者占 38%。严重眼外伤常合并眼内多种组织损伤,甚至眼内纤维组织增生牵引导致眼球变形、萎缩,以往多放弃治疗或摘除眼球<sup>[2-3]</sup>。传统的眼内异物取出术多在 X 线定位后经巩膜切口取出,成功率低,并发症多,易发生 PVR。对于包裹时间较长的异物及非磁性异物摘出难度更大。玻璃体视网膜手术可在直视下取出异物,恢复眼球正常的解剖结构,有效地切除增生细胞依附的纤维支架,防止 PVR 形成<sup>[4]</sup>。本组 25 眼眼内异物均一次性成功取出,包括 3 眼为多发异物,达到了视网膜解剖复位、清除混浊的屈光间质的目的。

开放性和闭合性眼外伤都可直接引起视网膜破裂或外力通过玻璃体基底部对视网膜周边部施加强烈牵引产生裂孔及锯齿缘截离,甚至睫状体脱离,玻璃体腔炎症反应形成 PVR 引起视网膜脱离。本组 45 例(46 眼)中合并视网膜脱离者 32 眼,通过玻璃体视网膜手术,有效切除玻璃体内机化条索,解除视网膜表面和视网膜下增生膜的牵引,眼内光凝或巩膜外冷凝封闭视网膜裂孔,玻璃体腔内填充 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 或硅油,使脱离的视网膜得以复位<sup>[5]</sup>。

眼外伤玻璃体视网膜手术后的常见并发症包括(1)继发性青光眼:由于惰性气体膨胀,硅油影响房水循环等原因造成术后眼压持续增高,对症处理后多可缓解;(2)继发性白内障:为硅油填充的常见并发症,本组术中保留晶状体的 8 眼术后出现继发性白内障,均先行白内障摘出术,根据视网膜复位情况及视功能情况,决定是否植入人工晶状体;(3)复发性视网膜脱离:本组 5 眼术后出现继发性视网膜脱离,3 眼于硅油取出术后出现,2 眼由于多发性异物造成视网膜多个裂孔,PVR 严重,视网膜顺应性差,下方视网膜出现局限性脱离。由于外伤性 PVR 眼内增生的细胞成分与特发性 PVR 不完全相同,部分来源与伤口通道有关,因此修复晚期形成瘢痕组织,导致视网膜脱离复发。

通过对本组病例的临床治疗,可以认为,眼外伤一旦发生,应尽早进行 I 期清创缝合,恢复眼球的完整性,控制感染,然后选择时机进行玻璃体视网膜手术,最大限度挽救患者的眼球和视功能。

**参考文献**

- David S, Keith W, Lawrence SB, et al. The epidemiology and diagnosis of penetrating eye injuries [J]. Acad Emery Med, 2002, 9: 209 - 213
- 惠延年, 王林, 韩泉洪, 等. 严重眼外伤的玻璃体手术治疗 [J]. 中华眼底病杂志, 1999, 15(1): 4 - 6
- 马志中, 魏世辉, 王常规, 等. 机械性眼外伤玻璃体切割术的预后因素分析 [J]. 中华眼底病杂志, 2000, 16(3): 189 - 191
- 秦波, 董丽娜, 赵铁英, 等. 玻璃体视网膜手术治疗外伤后早期眼球萎缩的临床观察 [J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2007, 29(1): 14 - 16
- 黎晓新, 王景昭. 玻璃体视网膜手术学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 112

(收稿:2009-03-20)

(本文编辑:尹卫靖)