

# 高度近视眼黄斑孔玻璃体视网膜界面的超微结构研究

王志良 张哲 王方 罗敏 施沃栋 毕晓萍

**【摘要】 目的** 探讨高度近视眼并发的黄斑孔源性视网膜脱离患者的玻璃体视网膜界面特征。**方法** 12例高度近视眼黄斑孔视网膜脱离患者,玻璃体切割术中剥离黄斑区内界膜及黏附的玻璃体组织。其中8例标本应用透射电镜观察,4例采用免疫胶体金技术进行层粘连蛋白、纤维连接蛋白标记。2例正常尸体眼作对照。**结果** 透射电镜显示除1例玻璃体皮质和内界膜部分脱离外,7例标本均发现有成片的玻璃体后皮质粘附于内界膜表面。6例标本发现有上皮样细胞,其胞浆中含色素颗粒,表面有较多足突。免疫电镜显示其界面的层粘连蛋白、纤维连接蛋白数量明显多于正常人( $P<0.001$ )。**结论** 高度近视眼并发的黄斑孔源性视网膜脱离患者,黄斑区形成玻璃体劈裂。其视网膜表面膜组织中,以上皮样细胞为主介导胶原纤维的收缩。纤维连接蛋白和层粘连蛋白参与了膜收缩。

**【关键词】** 黄斑孔; 高度近视眼; 视网膜脱离; 透射电镜; 免疫胶体金

**The ultrastructure characteristics of vitreoretinal interface in highly myopic eyes with macular hole retinal detachment** WANG Zhi-liang, ZHANG Xi, WANG Fang, et al. Department of ophthalmology, Shanghai no.9 people's hospital, Shanghai, 200011, China; Department of ophthalmology, Shanghai no.1 people's hospital, Shanghai, 200080, China

**【Abstract】 Objective** To approach the ultrastructure characteristics of vitreoretinal interface in highly myopic eyes with macular hole retinal detachment (RD). **Methods** 12 macular hole RD in highly myopic eyes underwent vitrectomy with attempted removal of the inner limiting membrane and the adhered vitreous around the macular. The specimens were examined by transmission electron microscopy (8 cases) and immune colloidal gold electron microscopy (4 cases). 2 normal donated eyes were as control. **Results** The transmission electron microscopy showed laminating vitreous cortex adherent tightly to inner limiting membrane in 7 samples, only 1 case showed partly posterior vitreous detachment. The epithelioid cells were found in 6 cases with pigment and varied polyopodias. More gold particles of fibronectin and laminin were showed in vitreoretinal interface ( $P<0.001$ ). **Conclusions** The posterior vitreous schisis formed in macular zone in highly myopic eyes with macular hole RD. The epithelioid cell participated the contraction of collagen fibers in epiretinal membrane. Fibronectin and laminin were responsible for this contractile action.

**【Key words】** Macular hole; Highly myopic eyes; Retinal detachment; Transmission electron microscopy; Immune colloidal gold electron microscopy

高度近视眼并发的黄斑孔源性视网膜脱离的可能形成机制与玻璃体对黄斑部垂直方向的牵拉,视网膜前膜切线方向的收缩,以及黄斑部玻璃体后脱离 (posterior vitreous detachment, PVD) 有关<sup>[1]</sup>。但高度近视眼患者常伴有后巩膜葡萄肿,并

有明显的玻璃体液化,其并发黄斑孔的机制尚不十分清楚<sup>[2]</sup>。本文试图通过透射电镜和免疫胶体金相结合的方法,研究高度近视眼黄斑孔视网膜脱离患者玻璃体视网膜界面的超微结构,探讨黄斑区玻璃体后皮质与视网膜内界膜之间的关系,进一步阐述高度近视眼并发黄斑孔视网膜脱离的发生机制。

## 材料和方法

1. 标本来源: 入选12例12眼高度近视眼黄斑孔源性视网膜脱离患者,男5例,女7例,近视度

作者单位: 200011 上海,上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科(王志良,罗敏,施沃栋,毕晓萍);上海交通大学医学院附属第一人民医院眼科(张哲,王方)

通讯作者: 王志良, E-mail: ophwzl@163.com

数 $-6.0D\sim-17.0D$ , 平均 $-9.4D$ , 均为单纯黄斑孔, 无外伤或手术史, 视网膜脱离时间 $6\sim 96d$ , 平均 $17d$ 。行玻璃体切割术, 术中 ICG 染色后剥离视网膜内界膜及其表面附着的玻璃体组织, 湿棉签迅速过渡到消毒的生理盐水中, 然后用吸管转入专用固定液中固定备用。另外取 2 例正常尸体眼黄斑区玻璃体视网膜组织作对照。

2. 透射电镜标本制作: 标本用 2.5% 戊二醛(磷酸缓冲液配置)固定 24h, 1% 锇酸固定液固定 3h, 梯度酒精脱水, 纯丙酮加包埋液室温浸透 3h、包埋液内 2h, 经固化后超薄切片, 枸橼酸铅染色, JEM-1200EX 透射电镜观察超微结构。

3. 免疫胶体金电镜技术: 获取患者和正常尸体眼黄斑区玻璃体视网膜标本, 立即放入免疫电镜固定液中(0.1M PBS 中包含 0.5% 戊二醛和 2% 福尔马林, PH=7.2) 在 4℃ 环境中固定 20min, PBS 液漂洗 3 次, 1% 的卵蛋白阻断 15min, 0.05M TBS 稀释的一抗(层粘连蛋白抗体稀释成 1:2, BIOMEDA, 美国; 纤维连接蛋白抗体稀释成 1:5, ONCOGENE, Cambridge, 美国) 在 4℃ 孵育过夜, 然后在室温孵育 2h。二抗采用山羊抗兔 IgG 链接的 10nm 胶体金颗粒稀释成 1:2 在室温下孵育 2h。用 1% 锇酸后固定组织 2h, 梯度酒精脱水, epon812 包埋剂包埋和聚合组织。超薄切片机切成 0.5μm 厚的超薄切片, 用氧化铀和柠檬酸铅染色后在透射电镜(JEM-1200EX 透射电子显微镜, 日本) 下分析标记胶体金的层粘连蛋白和纤维连接蛋白的密度分布。每个标本计数 5 个显微镜视野上胶体金颗粒的总数(每个显微镜视野面积为  $1.75\mu m \times 1.25\mu m$ )。

## 结 果

透射电镜显示 8 例组织中均有完整的视网膜内界膜组织, 其内侧面是较为光滑的膜样组织, 中间为大量排列较为整齐的胶原纤维组织, 外侧面由胶原纤维黏附少量粗糙不平的神经纤维层组织, 未见明显的细胞器成分。8 例组织中, 除 1 例发现玻璃体皮质和内界膜部分脱离外, 均发现有完整的玻璃体皮质粘附于内界膜内表面。透射电镜显示 8 例标本的玻璃体皮质中均有散在的色素颗粒, 6 例标本发现有上皮样细胞, 其胞浆中有少量或多量的色素颗粒, 这些上皮样细胞外形多样, 表面有较多足突(见图 1)。

免疫电镜显示患者玻璃体视网膜界面的层粘连蛋白、纤维连接蛋白数量明显多于正常人黄斑区的层粘连蛋白、纤维连接蛋白分布(见图 2)。

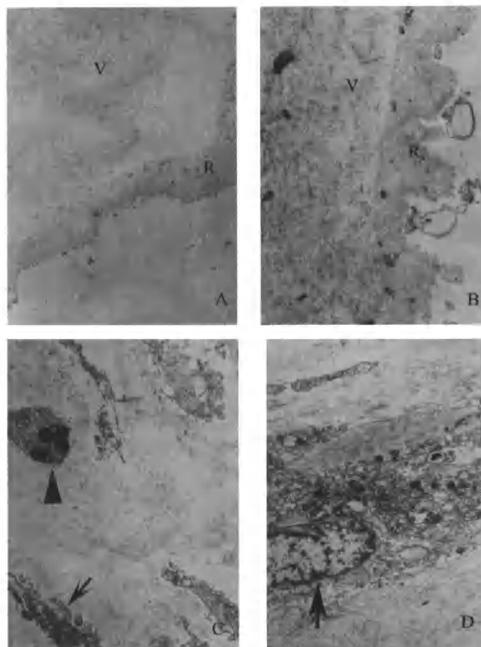


图 1 玻璃体视网膜界面透射电镜图: A 为玻璃体视网膜界面大体图: 内界膜(R)内表面粘附大量的玻璃体胶原纤维(V), 部分发生后脱离(2500x)。B 为内界膜(R)与玻璃体紧密粘连, 外侧面粗糙不平, 内侧面较光滑, 其内无明显细胞器成分(5000X)。C 为色素颗粒(三角指)和细胞器成分(箭头指)散在分布于玻璃体胶原纤维中(7500X)。D 为玻璃体胶原纤维中可见上皮样细胞, 其形状不规则, 核仁(箭头指)饱满, 胞浆丰富, 其内含有大量的色素颗粒(7500X)

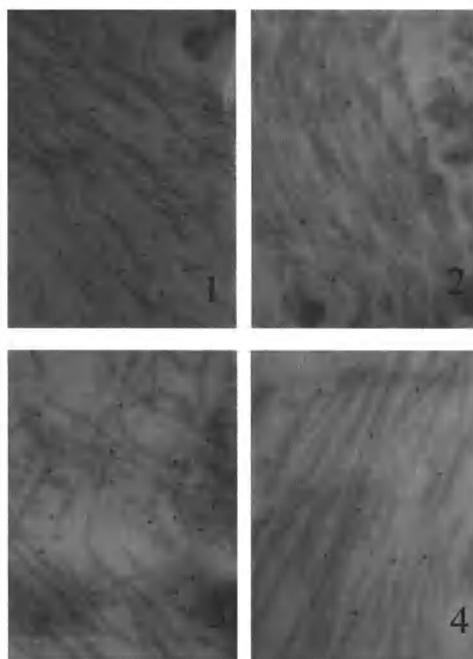


图 2 免疫胶体金电镜: 1: 玻璃体视网膜界面可见较多标记了纤维连接蛋白的胶体金颗粒。2: 正常对照眼的纤维连接蛋白胶体金颗粒明显减少。3: 玻璃体视网膜界面可见较多标记了层粘连蛋白的胶体金颗粒。4: 正常对照眼的层粘连蛋白胶体金颗粒明显减少。(40000x)

表 1 玻璃体视网膜界面层粘连蛋白和纤维连接蛋白抗体胶体金密度

胶体金的分类	分组	平均胶体金密度(n/μm <sup>2</sup> )	t 值	P 值
纤维连接蛋白	实验组	9.90 ± 2.31	10.38	<0.001
	对照组	4.82 ± 1.98		
层粘连蛋白	实验组	10.15 ± 2.65	9.16	<0.001
	对照组	5.18 ± 2.08		

## 讨 论

由于高度近视眼患者的玻璃体液化普遍存在,既往研究认为该类患者后极部往往发生了PVD。我们这些患者术前临床眼底检查及超声波均提示后极部PVD的存在。但是我们通过透射电镜发现,无论术前临床发现有或无 Weiss 环,所有患者视网膜内界膜表面均附有明显的玻璃体胶原纤维组织。由于PVD的实质是玻璃体后界膜的Ⅱ型胶原纤维和视网膜内界膜Ⅳ型胶原纤维之间的分离<sup>[3,4]</sup>。故严格意义说,该类患者后极部并没有发生完全的玻璃体后脱离,而是一种玻璃体劈裂。虽然黄斑区玻璃体劈裂的存在,但膜样的玻璃体胶原纤维并不能形成显著的视网膜垂直方向的牵拉,提示玻璃体对视网膜垂直方向的牵拉在该类患者黄斑孔的发生、发展过程中可能不占主要地位。

我们发现与内界膜紧密粘连的视网膜前膜组织主要由玻璃体胶原纤维组成,这些玻璃体胶原纤维排列较为整齐,其间散在分布的色素颗粒多位于前膜组织的玻璃体腔面,提示色素颗粒是从黄斑孔播散入玻璃体腔内,再游走、定位于视网膜前膜组织中,但8例患者的视网膜前膜组织中均未发现色素上皮细胞。然而,在视网膜前膜组织的深面,即靠近内界膜面,可发现上皮样细胞的存在,这些上皮样细胞的胞浆丰富,且吞噬了较多色素颗粒,提示细胞活性较强,且有向色素上皮细胞转化的趋势。先前的研究提示在黄斑孔患者的视网膜前膜组织中,肌纤维母细胞是主要的细胞成分<sup>[5,6]</sup>,我们的研究结果提示色素上皮样细胞是视网膜前膜组织中的主要细胞,与Ishida等的报道相一致<sup>[2]</sup>,可能与我们的病例是单纯的黄斑孔,且视网膜脱离时间较短,PVR增生不明显有关。同时这些上皮样细胞的足突非常丰富,这些足突长短不一,并和细胞外胶原纤维接触,尤其在足突的游离端更明显。提示这些上皮样细胞通过足突和细胞外的胶原纤维连接,完成细胞介导胶原纤维的收缩活动<sup>[7]</sup>,产生切线方向的视网膜收缩力<sup>[8]</sup>,促使黄斑孔的形成和RD的发生。

细胞介导胶原纤维完成收缩过程中必须有分子胶的参与,通过分子胶的作用使细胞足突和胶原纤维完

成手拉手式的膜收缩过程<sup>[9,10]</sup>,同时玻璃体视网膜界面胶原纤维之间的粘连也需要分子胶的参与。目前这些分子胶主要是纤维连接蛋白,层粘连蛋白和硫酸软骨素蛋白等成分<sup>[11,12]</sup>,本研究采用2种主要的分子胶纤维连接蛋白和层粘连蛋白,通过免疫胶体金电镜技术,分析玻璃体视网膜组织界面的分子胶分布。研究发现玻璃体视网膜界面组织中,纤维连接蛋白和层粘连蛋白数量增多非常显著。提示纤维连接蛋白和层粘连蛋白积极参与了上皮样细胞介导的胶原纤维收缩过程,内界膜前的表面膜组织具有收缩活性。玻璃体视网膜界面分子胶的增多也提示它们之间有着异常紧密地粘连,这也是首次通过免疫胶体金技术支持在黄斑部发生了玻璃体劈裂而不是后脱离的有力证据。

总之,在高度近视眼并发的黄斑孔源性视网膜脱离患者,其玻璃体对视网膜垂直方向的牵拉在黄斑孔的发生、发展过程中可能不占主要地位。同时黄斑区的视网膜表面膜组织中以上皮样细胞为主介导胶原纤维的收缩,促使黄斑孔的发生、发展。纤维连接蛋白和层粘连蛋白等分子胶参与了膜收缩过程。

## 参 考 文 献

- Gass JDM. Advancing the classification of macular hole: the possible role of muller cells. *Ophthalmology*, 1996,103(5):2-30
- Ishida S, Yamazaki K, Shinoda K, et al. Macular hole retinal detachment in highly myopic eyes: ultrastructure of surgically removed epiretinal membrane and clinicopathologic correlation. *Retina*, 2000; 20(2): 176-83
- WANG Zhiliang, ZHANG Xi, XU Xun, et al. PVD following plasmin but not hyaluronidase-implications for combination pharmacologic vitreolysis therapy. *Retina*, 2005; 36(1): 54-58
- WANG Fenghua, WANG Zhiliang, XUN Xiaodong, et al. The safety of dispase and plasmin in induce PVD. *IOVS*, 2004; 24(9):3286-3290
- Bando H, Ikuno Y, Choi JS, et al. Ultrastructure of internal limiting membrane in myopic foveoschisis. *Am J Ophthalmol*, 2005; 139(1): 197-199
- Yoon HS, Brooks L JR, Caporne A JR, et al. Ultrastructural features of tissue removed during idiopathic macular hole surgery. *Am J Ophthalmol* 1996; 122:67-75
- 王方, 颜永碧, 张哲等. 视网膜表面膜的超微结构特征. *中华眼科杂志*, 1999; 35(6): 440-442
- Gandorfer A, Rohleder M, Grosselfinger S, et al. Epiretinal pathology of diffuse diabetic macular edema associated with vitreomacular traction. *Am J Ophthalmol*, 2005;139(4):638-52
- Casaroli Marano RP, Vilaro S. The role of fibronectin, laminin, vitronection and their receptors on cellular adhesion in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994,35:2791-2803
- Glaser PA. Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol*, 1997,115:237-241
- Heegaard S, Jensen OA, Prause JU. Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1986, 224(4):355-336
- Heegaard S. Morphology of the vitreoretinal border region. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*, 1997,222(1):1-31

(收稿时间: 2006-11)