

## · 实验研究 ·

## 纤维蛋白溶解酶诱导兔眼玻璃体后脱离

黄玲 王丽丽 王海燕 郝安平 张妍春

**【摘要】 目的** 研究纤维蛋白溶解酶分别联合透明质酸酶和气体六氟化硫(SF<sub>6</sub>)诱导兔眼玻璃体后脱离(PVD)的效果。 **方法** 18只健康成年青紫兰兔随机分为A、B、C3组,每组6只兔。右眼均为实验眼,左眼为对照眼。A、B、C组实验眼玻璃体腔内分别注射纤溶酶1U(浓度10U/ml)、纤溶酶1U和透明质酸酶20U(浓度200U/ml)、纤溶酶1U和SF<sub>6</sub>0.5ml;对照眼玻璃体腔内注射平衡盐溶液(BSS)0.1ml。注药前后行间接检眼镜、裂隙灯和VOLK+90D前置镜及B型超声和视网膜电图(ERG)检查。最后取所有兔眼行光学显微镜、扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察。 **结果** 扫描电子显微镜观察结果:A组实验眼中有2只眼后极部发生不完全性PVD,发生率为33.3%;B、C两组实验眼中分别各有4只眼发生完全性PVD,发生率为66.7%;B、C两组实验眼出现PVD的阳性发生率与A组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。3组实验眼注药后ERG振幅与手术前及对照眼比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。光学显微镜和透射电子显微镜观察结果显示,视网膜组织结构无明显异常改变。 **结论** 纤溶酶联合透明质酸酶或SF<sub>6</sub>较单独采用纤溶酶更能迅速有效的诱发完全性PVD且对视网膜无明显的毒性作用。

**【关键词】** 纤溶酶; 透明质酸葡萄糖胺酶; 玻璃体脱离; 疾病模型,动物

中图分类号:R446-39

**Plasmin-induced posterior vitreous detachment** HUANG Ling, WANG Li-li, WANG Hai-yan, et al. *Departement of Ophthalmology, Xi'an fourth hospital, Xi'an 710004, China*  
Corresponding author: HUANG Ling, Email: huanglingmd@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To detect the effects of plasmin combined with hyaluronidase or hexafluoride SF<sub>6</sub> on inducing posterior vitreous detachment (PVD). **Methods** Eighteen young pigmented rabbits were randomly divided into group A, B, and C with 6 rabbits in each. All of the right eyes were the experimental eyes and the left ones was the control. The right eyes in group A, B, and C were injected with plasmin 1 U, plasmin 1 U and hyaluronidase 20 U, and plasmin 1 U and SF<sub>6</sub> 0.5 ml, respectively; while all of the left eyes underwent intra-vitreous injection with balanced salt solution 0.1 ml. The eyes were observed by indirect ophthalmoscopy, slit lamp examination, biomicroscopy, B-ultrasonography, and electroretinography (ERG) before and after injection respectively. At last, the retinal sections were examined by light microscopy, scanning and transmission electron microscopy. **Results** The results of scanning microscopy showed incomplete PVD in 2 (33.3%) experimental eyes in group A, and complete PVD in 4 (66.7%) experimental eyes in both group B and C, and the positive rate of PVD in both group B and C significantly differed from that in group A ( $P < 0.05$ ). The b-wave amplitudes of ERG in the three groups after injection didn't differ much from that in the control group or before the injection ( $P > 0.05$ ). The results of transmission electron microscopy and light microscopy indicated unchanged retinal structure. **Conclusions** Compared with the application of only plasmin, plasmin combined with hyaluronidase or hexafluoride SF<sub>6</sub> can induce complete PVD more efficiently and do no harm to the retina.

**【Key words】** Plasmin; Hyaluronoglucosaminidase; Vitreous detachment; Disease models, animal

玻璃体后脱离(PVD)指玻璃体后界膜与视网膜内界膜表面分离。通过各种途径来诱导完全性PVD可防止视网膜玻璃体牵引引起的相关疾病,改善此类病变的进程,为玻璃体手术的顺利进行和提高手术成功率创造条件。近几年国内外开始研究采用各种酶来诱导PVD<sup>[1-4]</sup>。在本研究中我们通过对照兔眼玻璃体腔

内联合注射纤维蛋白溶解酶、透明质酸酶以及膨胀气体SF<sub>6</sub>,观察诱导其产生PVD的效果,并对其安全性进行评价。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组及实验试剂

由第四军医大学动物实验中心提供的健康成年青紫兰兔18只,体重2.0~2.5kg,雌雄不分。随机分为A、B、C3组,每组各6只兔。所有兔右眼均为实验眼,

左眼为对照眼。在实验眼玻璃体内注射不同酶;其中 A 组注射纤溶酶 1 U(浓度为 10 U/ml),B 组注射纤溶酶 1 U+透明质酸酶 20 U(浓度为 200 U/ml),C 组注射纤溶酶 1 U+SF<sub>6</sub> 0.5 ml。对照眼玻璃体内注射眼用平衡盐溶液(BSS)0.1 ml。

纤溶酶、透明质酸酶购于上海生物化学制药厂, SF<sub>6</sub> 购于核工业理化工程研究院特种气体研究中心。纤溶酶及透明质酸酶于 -20℃ 下储存,使用时室温下溶于无菌 BSS 配制最终浓度。

## 1.2 方法

所用兔双眼在注射前均行间接检眼镜、裂隙灯、VOLK+90 D 前置镜、B 型超声及视网膜电图(ERG)检查。兔闸固定,充分散瞳。用 0.1% 爱尔卡因表面麻醉,前房穿刺抽出适量前房水以防止注射后眼压升高。对不同组兔眼用一次性皮试针在角膜缘后 2 mm 巩膜处间接检眼镜直视下向玻璃体腔注射相应酶或 BBS 溶液。拔针后用湿棉签按压 1 min 以避免药液和气体漏出。注药后定期眼压监控,若眼压升高,可行前房穿刺降眼压。

所有手术后的兔眼于手术后 1 h、1.3、5、7 d 时充分散瞳,用裂隙灯、VOLK+90 D 前置镜、间接检眼镜观察其眼前节、玻璃体及眼底情况,行 B 型超声检查,观察有无 PVD 的发生。

记录各组兔玻璃体腔注药前后双眼 ERG 全视野暗适应最大反应。充分散瞳,将兔置于暗室内暗适应 30 min,表面麻醉,进行标准闪光 ERG 检查,计算机自动处理并打印结果。

所有兔于注药后第 7 天在完成眼前、后节观察,B 型超声及 ERG 检查后经空气栓塞处死并迅速摘除两侧眼球。用 5-0 丝线在上方角膜缘 12 点钟处缝线做方向标记,沿角膜缘除去角膜以利固定液渗入,再沿眼球的前后径剖分成两部分,其中一部分放入 10% 的甲醛固定液中固定。48 h 后常规脱水、浸蜡、包埋、切片,HE 染色后行光学显微镜组织学检查。将球体的另一半置入 2.5% 戊二醛溶液固定 24 h,制成扫描电子显微镜(S-520,日本 Hitachi 公司)标本。另从眼球后极部取 1 mm×5 mm 大小的全层组织,制作超薄切片,经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,透射电子显微镜(JEM-2000,日本 Jeol 公司)下观察。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 统计分析软件对数据进行 *t* 检验和  $\chi^2$  检验统计分析。

## 2 结果

经裂隙灯前置镜和间接检眼镜检查发现,所有实验眼注药后角膜、晶状体透明且无脱位,注药后第 1 天前房深度恢复正常。注药后 1 h、1 d 时有睫状充血,玻璃体有不同程度的混浊,并有少许絮状漂浮物。3 d 后上述反应逐渐减轻。所有实验眼未出现玻璃体积血、视网膜出血及渗出等毒性反应,对照眼无明显阳性反应。

B 型超声检查结果显示,实验眼手术后玻璃体腔内出现程度不同的点状回声,视网膜表面发现运动活跃、弱回声的带状弯曲光带(图 1)。A 组手术后 3 d 有 2 只实验眼发生 PVD;B、C 组手术后 5 d 各有 3 只实验眼发生 PVD。



图 1 PVD B 型超声检查像。玻璃体内飘浮弱回声的带状弯曲光带

Fig. 1 Photograph of B ultrasonography of PVD shows faint echo band floating in the vitreous cavity

A、B、C 组实验眼及对照眼手术后 b 波振幅的平均值与手术前比较,差异无统计学意义( $t=0.730, 1.818, 1.774; P=0.482, 0.099, 0.107$ ),各实验组实验眼注药后 7 d 时, b 波振幅与对照眼比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ) (表 1)。

表 1 实验眼与对照眼手术前及手术后 7 d b 波振幅变化 ( $\bar{x} \pm s, P$  值)

组别	n	b 波振幅		t 值	P 值	
		手术前	手术后 7 d			
A 组	6	实验眼	239.12±41.54	222.20±38.74	0.730	0.482
		对照眼	240.56±43.45	231.77±44.58	0.346	0.736
		t 值	0.959	0.397		
B 组	6	实验眼	247.42±25.45	217.39±31.44	1.818	0.099
		对照眼	243.28±24.96	235.85±26.72	0.511	0.620
		t 值	0.285	1.081		
C 组	6	实验眼	232.86±25.62	204.26±30.97	1.774	0.107
		对照眼	224.24±37.95	221.41±17.15	0.166	0.871
		t 值	0.461	1.214		
		t 值	0.650	0.253		

光学显微镜检查结果发现,3 组实验眼视网膜及细胞形态结构均大致正常。扫描电子显微镜下,A 组有 2 只实验眼发生不完全性 PVD,后极部内界膜表面较光滑,在一些区域仍有稀疏的胶原纤维与内界膜相粘连(图 2),PVD 发生率为 33.3%;B、C 组实验眼后极部及赤道部内界膜表面光滑,基底部表面胶原纤维呈丝网状分布(图 3.4)。B、C 组实验眼中各有 4 只眼发生完全性 PVD,PVD 的发生率为 66.7%;B、C 组实

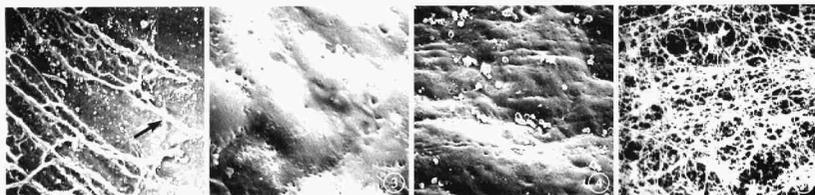


图 2 纤维酶实验眼扫描电子显微镜像。视网膜表面稀疏胶原纤维(黑箭) SEM  $\times 300$  图 3 纤溶酶联合透明质酸酶实验眼扫描电子显微镜像。视网膜表面光滑,内界膜表面无胶原纤维附着 SEM  $\times 700$  图 4 纤溶酶联合 SF<sub>6</sub> 实验眼扫描电子显微镜像。视网膜表面光滑 SEM  $\times 400$  图 5 对照眼扫描电子显微镜像。玻璃体视网膜附着,视网膜胶原纤维束 SEM  $\times 300$

眼出现 PVD 的阳性发生率与 A 组实验眼比较,差异有统计学意义( $\chi^2=5.545, P=0.019$ )。各组对照眼视网膜表面胶原纤维密集(图 5)。

透射电子显微镜检查结果显示,各组实验眼及对对照眼视网膜组织结构正常,各层细胞解剖结构清晰,内界膜表面光滑,未发现明显药物损害的表现。

### 3 讨论

纤溶酶白溶解酶是一种非特异性酶,可水解玻璃体后皮质与内界膜粘连中起重要作用的层粘连蛋白、纤维粘连蛋白,可间接消化 IV 型胶原,促进玻璃体皮质胶原纤维与内界膜的分离。近几年国外开始在动物眼进行纤溶酶诱导 PVD 的实验研究。Verstraeten 等<sup>[1]</sup>证实:兔眼玻璃体腔注入纤溶酶后 15~60 min 酶活性最大,60 min 后开始减弱,24 h 后该酶活性消失。因而在联合玻璃体切割术前 60 min 将 1 U 的纤溶酶注入兔眼玻璃体腔可产生完全性 PVD。而单独将 1 U 的纤溶酶注入兔眼玻璃体腔可产生不完全性 PVD,这与我们部分实验结果一致。Hikichi 等<sup>[2]</sup>将纤溶酶和 SF<sub>6</sub> 同时注射到兔眼玻璃体腔可诱导完全性 PVD,这在本实验中得到了证实,但 Hikichi 等<sup>[2]</sup>在视网膜毒性方面在组织学上未进一步探讨。我们发现纤溶酶联合透明质酸酶或 SF<sub>6</sub> 较单独采用纤溶酶更能迅速有效的诱发完全性 PVD( $P<0.05$ ),原因在于透明质酸酶和 SF<sub>6</sub> 能使透明质酸释出、液化,导致玻璃体胶原支架塌陷,为 PVD 的产生创造条件,同时有利于纤溶酶迅速扩散到玻璃体视网膜界面,从而易产生有效的完全性 PVD。然而,由于联合注射膨胀气体易产生高血压且增加了增生性玻璃体视网膜病变的危险,因此,对于视网膜的远期影响还有待于进一步研究。

Li 等<sup>[4]</sup>的实验结果显示:适当剂量的纤溶酶可以很好地诱导人尸眼的 PVD,对视网膜形态及细胞活性

无明显影响。人尸眼更接近临床,但尚难评价在视网膜功能方面的影响。ERG 从细胞水平综合反映视网膜功能,b 波反应了视网膜双极细胞和 Müller 细胞的电活动,可反应视网膜的功能状态<sup>[5]</sup>。本实验结果显示,各实验组实验眼手术前后 ERG 无明显变化( $P>0.05$ ),且视网膜结构亦无异常改变。因此,对视网膜无明显的毒性作用。

另外,对于 PVD 的诊断有许多方法,扫描电子显微镜由于能全方位精确观察玻璃体视网膜界面之间的粘连情况,区别完全与不完全 PVD,阳性率较高。因此,可作为诊断 PVD 的最可靠最重要的指标。从本实验结果可以看出,扫描电子显微镜检出的 PVD 阳性例数高于其它方法,但由于实验样本偏少未做统计学处理。

因此,根据本实验结果,我们认为纤溶酶联合透明质酸酶或 SF<sub>6</sub> 较单独采用纤溶酶更能迅速有效的诱发完全性 PVD 且对视网膜无明显的毒性作用。

### 4 参考文献

- Hikichi T, Kado M, Yoshida A. Intravitreal injection of hyaluronidase cannot induce posterior vitreous detachment in the rabbit. *Retina*, 2000; 20:195-198.
- Hikichi T, Yanagiya N, Kado M, et al. Posterior vitreous detachment induced by injection of plasmin and sulfur hexafluoride in the rabbit vitreous. *Retina*, 1998; 19:55-58.
- Tzeel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Posterior vitreous detachment with dispase. *Retina*, 1998; 18: 7-15.
- Li XX, Shi X, Fan JY. Posterior vitreous detachment with plasmin in the isolated human eye. *Graefes Arch for Clin and Exp Ophthalmol*, 2002; 240:56-52.
- Verstraeten TC, Chapman C, Hertzog M, et al. Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in rabbit. *Arch Ophthalmol*, 1993; 111:849-854.
- 吴乐正, 吴德正. 临床视觉电生理学. 北京: 科学出版社, 1999: 17-25.

(收稿日期: 2004-04-05)

(本文编辑: 朱敏)