

表达下降,从而减轻角膜移植排斥反应。对指导临床治疗具有重要意义。

参考文献

- Zhu SN, Nolle B, Duncker G. Expression of adhesion molecule CD44 on human corneas[J]. Br J Ophthalmol, 1997, 81: 80 - 84
- Affleck DG, Bull DA, Albanil A, et al. Interleukin-18 production following murine cardiac transplantation; Correction with histologic rejection and induction of IFN-gamma [J]. J Interf Cytok Res, 2001, 21(1): 1 - 9
- 邓宏伟, 陈建苏, 李辰, 等. 雷公藤多甙滴眼液防治大鼠角膜移植排斥反应的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(9): 1141 - 1143
- 尚攀峰. CD44 与移植排斥反应研究进展[J]. 国外医学·移植与血液净化分册, 2005, 3(1): 38 - 41
- Williams JG, Jurkovich GJ, Maier RV. Interferon γ : A key immunoregulatory lymphokine[J]. J Surg Res, 1993, 54(1): 79 - 83
- Newell KA, He G, Guo Z, et al. Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD + 4 but not CD + 8 T cells [J]. J Immunol, 1999, 163(5): 2358 - 2362
- 郑劲草, 许国铭, 李淑德, 等. 干扰素 γ 对人胰腺癌细胞 CD44 蛋白表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(5): 473 - 474
- 刘银萍, 柳林. 细胞间黏附分子与角膜移植免疫[J]. 眼科研究, 2005, 23(5): 546 - 548
- 张晗, 黄一飞. 角膜移植的免疫学研究进展[J]. 中国实用眼科杂志, 2006, 24(4): 357 - 360
- 王玉宏, 孙兴怀, 周行涛, 等. 大鼠角膜移植术后植片内 γ 干扰素 mRNA 的表达及血清白介素 2 的变化[J]. 眼视光学杂志, 2005, 7(2): 88 - 91
- 沈峰, 郭亚军, 吴孟超. LFA-1, LFA-2, CD44 和 CD45 分子对 T 细胞的共刺激作用[J]. 第二军医大学学报, 1995, 16(3): 218 - 222
- 李志杰, 李辰. 雷公藤多甙防治角膜移植免疫排斥反应实验研究[J]. 眼科研究, 1996, 14(2): 76 - 78

(收稿: 2008-03-07 修回: 2008-10-25)

(本文编辑: 刘艳)

· 短篇论著 ·

玻璃体腔注射促红细胞生成素对大鼠视网膜结构和功能的影响

解正高 陈放 庄朝荣 马晓蓉 华欣

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)对视网膜光损伤、视网膜缺血-再灌注损伤、高眼压视网膜神经节细胞损伤、视神经损伤诱导的神经节细胞损伤及视神经轴突再生、早期糖尿病视网膜病变视网膜神经元、血-视网膜屏障和变应性视神经脱髓鞘病变均具有保护作用。本研究将重组大鼠 EPO 注入大鼠玻璃体腔,旨在观察 EPO 对视网膜的结构和功能的影响以及是否会诱发视网膜新生血管形成。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 只正常雄性 SD 大鼠(中科院上海实验动物中心提供,鼠龄为 8 周,体重(200 ± 20)g,眼部检查无异常;每只大鼠的右眼用于实验。

1.2 玻璃体腔给药 采用速眠新注射液在大鼠大腿部肌肉注射麻醉(0.6 mL/kg)后,美多丽滴眼液点眼 3 次,倍诺喜滴眼液表面麻醉。角膜放置自制的前置镜,凹面填充透明质酸钠。于角膜缘后约 2.0 mm 处用 4 号针头行睫状体平坦部穿刺,避免损伤晶状体;沿穿刺口插入微量进样器针注射 5 μ L 重组大鼠 EPO(美国 Sigma 公司)400 ng;术毕涂迪可罗眼膏。

1.3 闪光视网膜电图(flash electroretinogram, FERG)检查 于注药前和注药后 3 d 分别行 FERG 检查。采用速眠新 0.6 mL/kg 大腿部肌肉注射麻醉,点倍诺喜滴眼液点眼表面麻醉,美多丽滴眼液散瞳点眼。暗适应 30 min 后,采用 Tomey EP1000(日本 Tomey 公司)分别记录 FERG 最大反应和视网膜振荡电位。刺激参数:刺激器为全视野 Ganzfeld Q400,刺激光强

2.5 cd · s/m², 采样频率 2 000 Hz, 500 μ s, 通频带 0.3 ~ 300 Hz。振荡电位:刺激频率 0.07 Hz, 循环时间 14.286 ms, 采样频率 2 000 Hz, 500 μ s, 通频带 75 ~ 300 Hz, 叠加 3 次。记录电极采用环形金属电极,放置于涂有迪可罗眼膏的角膜缘;钢针参考电极置于颞部皮下;钢针地电极置于尾部皮下。

1.4 光学显微镜检查 注射后 14 d 和 2 个月采用腹腔注射过量 1% 戊巴比妥钠各处死 2 只大鼠,于角膜 12:00 处缝线作标记,保留 12:00 角膜缘处的球结膜,去除其他部位的球结膜,迅速摘除眼球,置入 10% 中性甲醛固定液中,24 h 后沿缝线标记做经视盘的矢状切片,然后梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片(片厚 5 μ m)、苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察摄像。

1.5 透射电子显微镜检查 注药后 3 d, FERG 检查后处死 2 只大鼠后迅速摘除眼球;于碎冰上去除眼前节和玻璃体并小心剥离神经视网膜固定于 2% 戊二醛磷酸盐缓冲液中固定 2 h,再用 1% 锇酸缓冲液固定 2 h;梯度乙醇脱水,环氧树脂 618 包埋;超薄切片(50 ~ 70 nm)、醋酸铀和枸橼酸铅双重染色;透射电子显微镜下观察、摄像。

1.6 统计学方法 所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 6.12 统计学软件对数据进行统计学处理。注药前后的 FERG 变化进行配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物活体眼部观察 注药后 3 d 在手术显微镜下进行活体观察。所有手术眼角膜透明,前房无渗出,晶状体透明,晶状体后囊虽有轻微损伤,但未导致明显的晶状体混浊。玻璃体透明,无白色粉尘样结晶,眼底清晰可见,视网膜无明显水肿、出血,血管形态未见明显异常改变。

作者单位:225001 扬州,江苏省苏北人民医院 扬州大学临床医学院眼科

通讯作者:解正高 (Email: zgxie87@163.com)

2.2 FERG 检测结果 注药前和注药后 3 d FERG 检查结果显示:玻璃体腔注射 EPO 400 ng 对大鼠 FERG 的最大反应的 a 波和 b 波的潜伏期和振幅均无明显影响,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。OPs 波的 P₄ 潜伏期和各子波总振幅在注药前后差异亦均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1, 图 1)。

表 1 玻璃体腔注射 EPO 前后 FERG 变化 ($\bar{x} \pm s$)

	a-wave		b-wave		OPs	
	Latency (ms)	Amplitude (μV)	Latency (ms)	Amplitude (μV)	P ₄ Latency (ms)	Total amplitude (μV)
Pre-injection	15.68 ± 3.12	186.68 ± 28.86	59.00 ± 2.55	332.8 ± 17.25	51.63 ± 3.83	340.73 ± 18.64
Post-injection	16.11 ± 3.64	173.75 ± 4.04	55.88 ± 4.80	335.82 ± 8.34	57.33 ± 4.66	334.00 ± 96.30
t	-0.2195	0.827	2.021	-0.141	-1.363	0.116
P	0.840	0.468	0.136	0.896	0.266	0.914

2.3 视网膜组织病理学检查结果 光学显微镜检查结果显示:玻璃体腔注射 400 ng EPO 后 14 d, 视网膜各层结构排列整齐, 各层未见明显水肿和坏死, 视网膜厚度无明显改变。注射后 2 个月视网膜仍保持整齐排列, 未见明显水肿和坏死, 视网膜内和视网膜表面也未见新生血管。透射电子显微镜检查结果显示:视网膜神经元未见明显坏死及凋亡, 光感受器的外节盘膜排列整齐, 未见明显溶解 (图 2)。

3 讨论

多种眼病模型通过缺氧预处理或转基因动物表达内源性 EPO 及补充外源性 EPO 的实验结果均显示了较强的神经保护作用。然而, 目前尚不清楚通过各种途径增加机体组织内部 EPO 含量是否会干扰组织的正常物质代谢或者会导致组织的其他结构或功能的改变, 因此我们对玻璃体腔注射 EPO 是否会引起视网膜结构和功能的改变进行了研究。Tsai 等^[1] 通过 625 ng EPO 玻璃体腔给药后 FERG 的安全性研究提示该剂量的 EPO 对视网膜是安全的, 本研究结果与其一致。我们在 Tsai 等^[1] 应用 EPO 剂量的基础上选用 400 ng 的 EPO, FERG 结果显示玻璃体腔注射 400 ng 的 EPO 后最大反应波及振荡电位的潜伏期和振幅与注药前差异均无统计学意义, 表明玻璃体腔注射 400 ng 的 EPO 对视网膜的功能并无明显影响。组织病理学检查结果也显示注药后 14 d 及 2 个月, 视网膜各层结构排列整齐, 视网膜厚度无明显变化, 视网膜内未见明显水肿及坏死, 也未出现明显视网膜的新生血管化。这些结果表明玻璃体腔注射 400 ng 以下的 EPO 不影响视网膜的结构和功能, 因此是安全的。EPO 与新生血管形成是另一个值得关注的问题。Takagi 等^[2] 认为 EPO 在增生型糖尿病视网膜病变中是一个强烈的促血管生成因子, 而且其作用并不依赖于血管内皮生长因子。Chen 等^[3] 则认为在缺氧性视网膜病变的早期 EPO 生成减少会导致视网膜血管的不稳定性, 而在增生期 EPO 水平的升高则会导致视网膜的新生血管形成。Zhang 等^[4] 的研究结果证明在 STZ 诱导的糖尿病大鼠早期玻璃体腔注射重组人 EPO 可减轻血-视网膜屏障的破坏程度。本研究 EPO 注射后 2 个月光学显微镜下未见明显视网膜新生血管形成, 但不同剂量的 EPO 对视网膜微血管的影响尚有待进一步研究。

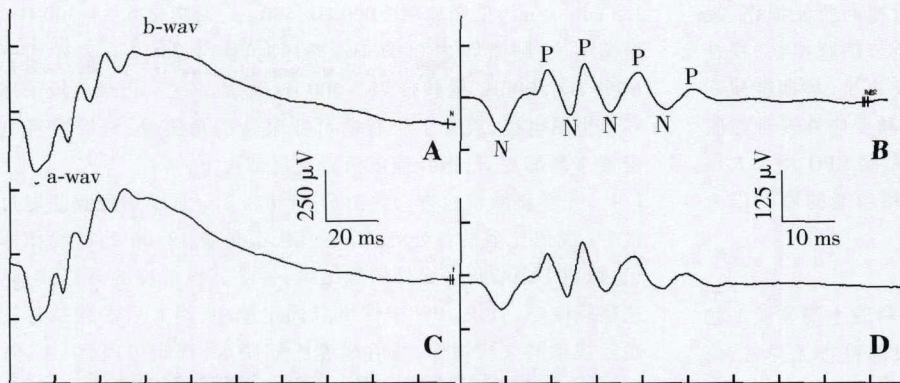


图 1 同一大鼠注药前及注药后 3 d FERG 变化 A: 注药前 FERG 最大反应波 B: 注药前 OPs 波 C: 注药后 FERG 最大反应波 D: 注药后 OPs 波

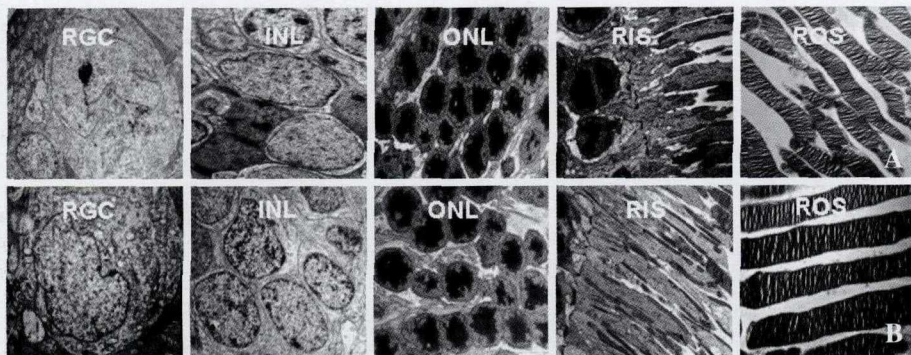


图 2 注药后视网膜超微结构改变透射电子显微镜 ($\times 7400$) A: 正常视网膜 B: 注药后 3 d 视网膜 RGCs: 视网膜节细胞 IN: 内界膜层 ONL: 外界膜层 RIS: 光感受器内盘膜 ROS: 光感受器外盘膜

参考文献

- 1 Tsai JC, Wu L, Worgul B, et al. Intravitreal administration of erythropoietin and preservation of retinal ganglion cells in an experimental rat model of glaucoma [J]. *Curr Eye Res*, 2005, 30: 531 - 538
- 2 Takagi H, Watanabe D, Suzuma K, et al. Novel role of erythropoietin in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007, 77: S62 - 64
- 3 Chen J, Connor KM, Aderman CM, et al. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118: 526 - 533
- 4 Zhang JF, Wu Y, Jin Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49: 732 - 742

(收稿: 2008-07-24 修回: 2008-11-05)

(本文编辑: 尹卫靖)