文章编号:1000-5404(2005)12-1335-03

论著

兔胚胎全层视网膜移植到大鼠视网膜下腔的研究

余 涛,阴正勤,王仕军 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察兔胚胎全层视网膜移植物,包括神经上皮和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE),在正常Wistar大白鼠和视网膜变性(Royal college of surgeons, RCS)大鼠视网膜下腔的发育状况,从而探讨异种胚胎全层视网膜移植方法的可行性。**方法** 采用17只孕3周兔胚胎作为移植供体,酶法分离得到全层视网膜片(包括神经上皮和RPE),将其移植到20只Wistar大鼠和14只RCS大鼠的右眼视网膜下腔;分别于术后3 d、1、2、4周处死宿主,应用视网膜组织切片进行HE染色和免疫组化染色,观察供体视网膜的生长发育状况。**结果** 兔胚胎视网膜能在两种大鼠视网膜下腔发育为典型的"玫瑰花结"及视网膜各层结构。**结论** 兔胚胎视网膜在大鼠视网膜下腔能进行分化和发育。异种胚胎全层视网膜移植是可行的,但移植方法还需进一步探索和完善。

关键词: 胚胎视网膜;移植;玫瑰花结
中图法分类号: R-332; R617; R779.6 **文献标识码:** A

Transplantation of rabbit embryonic full-thickness retina into the subretinal space of rats

YU Tao, YIN Zheng-qin, WANG Shi-jun (Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the transplantation of embryonic full-thickness retina, including neural retina and retinal pigment epithelial (RPE), into the subretinal space of rats and to investigate the development of the grafts. **Methods** A total of 34 eyes from 3-week-old pigmented rabbit embryos were treated with the dispase to obtain pieces of the full-thickness retina, and then grafts were injected into the subretinal space of the right eyes of 20 Wistar rats and 14 RCS (Royal college of surgeons) rats. Host rats were sacrificed at 3, 7, 14, and 28 d after transplantation. Sections were stained with hematoxylin eosin and immunohistochemistry. **Results** The rabbit embryonic retina was capable of developing and differentiating in the subretinal space of the host rats. **Conclusion** The rabbit embryonic retina is capable of developing and differentiating in the subretinal space of host rats. Transplantation of xenografts of embryonic full-thickness retina is practicable, but the methods of transplantation need to be improved.

Key words: transplantation; embryonic retina; rosette

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一组能导致进行性感光细胞变性和视觉障碍的遗传病症候群,目前尚无有效的治疗方法。近年来研究表明视网膜移植是最接近临床应用治疗RP的方法[1]。当RP进展到晚期,感光细胞和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞都出现变性死亡,单独移植这两种成分都没有作用,此时病变视网膜的修复需要全层视网膜的移植[2]。本实验将青紫蓝兔胚胎全层视网膜移植到正常Wistar大白鼠和视网膜变性(Royal college of surgeons, RCS)大鼠的视网膜下腔,来观察移植物在宿主视网膜下腔的发育状况,从而探讨异种胚胎全层视网膜移植方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

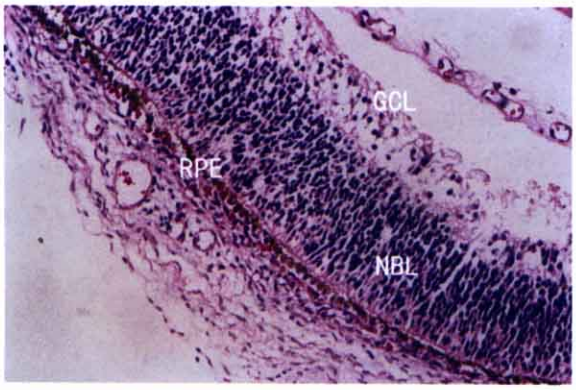
健康3月龄Wistar大鼠20只(本校实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量100~150 g;右眼行视网膜移植手术,左眼为对照;观察时相点为术后3 d(5只)、1周(5只)、2周(5只)、4周(5只)。健康3月龄RCS大鼠14只(北京医科大学动物研究所提

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270457)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270457)
作者简介: 余 涛(1974-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事眼底病及小儿眼病方面的研究。电话:(023)68765881, E-mail: yt423@sina.com
通讯作者: 阴正勤,电话:(023)68754401, E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2004-05-18; **修回日期:** 2004-07-16

供),雌雄不拘,体质量 100 ~ 150 g;右眼行视网膜移植手术,左眼为对照;观察时相点为术后 3 d(2 只)、1 周(4 只)、2 周(4 只)、4 周(4 只)。

1.2 供体视网膜的获取

取青紫蓝孕兔 5 只(E19-21 d)(本校实验动物中心提供),在耳背静脉注入空气,处死后剖腹取出胚胎;将胚胎眼球取出,浸于 dispase 溶液中,37 ℃孵育 10 min,然后在冰浴环境下用 4 ℃的 Ames' 液漂洗眼球数次,分离巩膜和脉络膜全层并将其剥离,得到神经视网膜层及色素上皮层(图 1);将全层视网膜剪成长宽约为 0.8 ~ 1.0 mm 的条状,保存在 4 ℃的 Ames' 液中,30 min 内用于移植。



GCL: Ganglion cell layer; NBL: Neuroblastic layer; RPE: Retinal pigment epithelium

图 1 兔胚胎 19 d 视网膜 (HE × 100)

Fig 1 Retina of E19 rabbit (HE × 100)

1.3 视网膜移植手术

1%戊巴比妥钠溶液腹腔内注射麻醉,将大鼠固定在木板上,点托吡卡胺眼液散瞳,丁卡因眼液作角膜表面麻醉;在 Olympus 手术显微镜下,行上睑牵引缝线,在右眼颞上方作一以角膜缘为底的结膜瓣,使注射部位暴露并固定眼球;在睫状体后切开巩膜约 0.5 mm,深达脉络膜下,将移植器伸入,注入视网膜小条;术后缝合切口,涂抗生素眼膏。

1.4 视网膜组织学观察和免疫组化染色

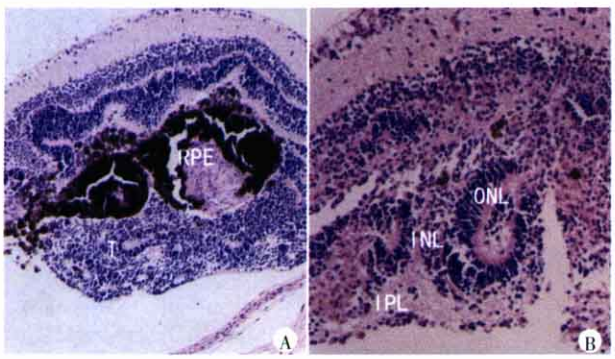
在术后各时相点取出眼球,常规石蜡切片后行 HE 染色;免疫组化染色采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒、鼠抗人 Rhodopsin 单克隆抗体(Rho)和兔抗人 Synaptophyin 多克隆抗体(SYN)(迈新公司)。

2 结果

共移植 Wistar 大鼠 20 只眼,其中 9 只眼在宿主视网膜下腔找到供体视网膜(3 d 4 只眼、1 周 2 只眼、2 周 2 只眼、4 周 1 只眼)。共移植 RCS 大鼠 14 只眼,其中 2 只眼在宿主视网膜下腔找到供体视网膜(3 d 1 只眼、1 周 1 只眼)。术后并发症:眼内炎 1 眼,视网膜下出血 3 眼。

2.1 供体视网膜在宿主视网膜下腔的发育

Wistar 大鼠移植术后 3 d,供体视网膜发育出不典型"玫瑰花结"(图 2A),细胞呈未分化状态,不能区分视网膜各层结构。术后 1 周,呈现出典型"玫瑰花结"形态(图 2B),其中内核层和内丛状层发育成熟,感光细胞内外节开始分化,而外丛状层未分化。术后 2 周,感光细胞内外节结构发育完整(图 3A),其中 1 例形成外界膜;外丛状层仍未发育成熟;但可见不完整的神经节细胞层(图 3B)。术后 4 周,部分"玫瑰花结"开放、伸展并与宿主视网膜平行,供体视网膜各层均可见(图 4A),特别是结构完整的神经节细胞层(图 4B)。所有移植物中有聚集成团的供体 RPE,与视网膜神经上皮分离,散在"玫瑰花结"之间。



A: Day 3 postoperatively; T: Transplants; RPE: Retinal pigment epithelium; B: 1 week postoperatively; INL: Inner nuclear layer; ONL: Inner nuclear layer; IPL: Inner plexiform layer

图 2 Wistar 大鼠移植术后 3 d 和 1 周的移植物 (HE × 200)

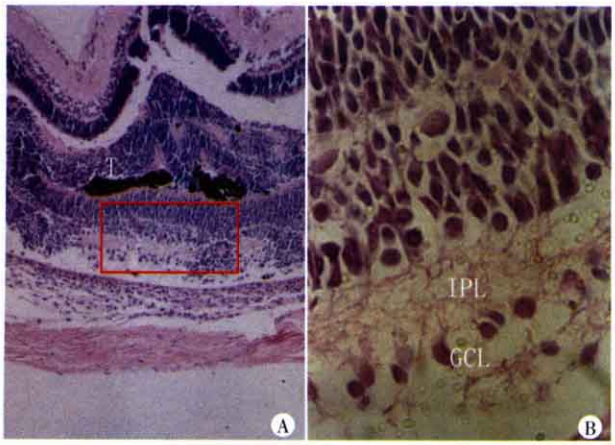
Fig 2 Transplants in Wistar rat on day 3 and week 1 postoperatively (HE × 200)



A: Week 2 postoperatively (HE × 100); RPE: Retinal pigment epithelium; B: Enlargement of A (HE × 1 000); INL: Inner nuclear layer; IPL: Inner plexiform layer; White arrow: Ganglion cell layer

图 3 Wistar 大鼠移植术后 2 周的移植物

Fig 3 Transplants in Wistar rat on week 2 postoperatively



A: Week 4 postoperatively (HE × 200); T: Transplants;
B: Enlargement of A (HE × 1 000); GCL: Ganglion cell layer; IPL: Inner plexiform layer

图 4　Wistar 大鼠移植术后 4 周的移植物

Fig 4　Transplants in Wistar rat on week 4 postoperatively

RCS 大鼠移植术后 3 d，供体视网膜发育出不典型"玫瑰花结"，细胞呈未分化状态，不能区分视网膜各层结构。术后 1 周，表现出典型"玫瑰花结"结构，其中外核层和感光细胞内外节分化，内核层与内外丛状层发育不成熟，且未见神经节细胞层。供体 RPE 也散在"玫瑰花结"之间。

2.2　免疫组化染色结果

Wistar 大鼠移植术后 3 d，供体视网膜的 SYN 和 Rho 免疫组化染色均为阴性；移植术后 1 周，供体视网膜发育的内丛状层部位 SYN 染色阳性，"玫瑰花结"内感光细胞内外节 Rho 染色阴性；移植术后 2 周，4 周：供体视网膜 SYN 和 Rho 染色均为阳性。RCS 大鼠移植术后 3 d 和 1 周，供体视网膜 SYN 和 Rho 染色均为阴性。

3　讨论

本研究采用 dispase 消化联合机械分离的方法获得全层胚胎视网膜，但移植后供体视网膜在早期形成了"玫瑰花结"结构，只有 4 周后移植物才形成平行结构。Sharma 等[3]认为"玫瑰花结"形成的关键是分离和移植时对供体视网膜造成了损伤。本实验"玫瑰花结"形成率高，可能由于自制移植器对供体和宿主视网膜的伤害所导致。因此，只有进一步改进移植手术方法和移植器械，才能使全层视网膜移植物更好的生存和发育。但是"玫瑰花结"是否能在发育过程中自动开放和伸展还需以后大样本的实验证实。同时 Sagdullaev 等[4]研究发现，在上丘相应部位可以记录到来自"玫瑰花结"的视觉诱发反应。而本研究显示"玫瑰花结"能发育出视网膜各层结构，并表达相应功能蛋白。因此"玫瑰花结"是否参与形成新的视觉通路，其机理仍需进一步研究。

全层胚胎视网膜移植比视网膜神经上皮层移植困难得多，因为在移植中或移植后 RPE 片容易发生卷曲脱离视网膜神经上皮层[5]。本研究结果也显示大部分供体视网膜中的 RPE 细胞聚集成团，与供体视网膜神经上皮层完全分离，位于"玫瑰花结"之间。因此，如何保证供体 RPE 细胞与视网膜神经上皮在移植中始终不发生分离，并有正常的极性状态，还需进一步研究探讨。

本研究结果初步提示，异种胚胎全层视网膜移植是可行的，但移植方法还需进一步的探索和完善。

参考文献：

[1] Seiler M J, Aramant R B. Intact sheets of fetal retina transplanted to restore damaged rat retinas[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(11): 2121 - 2131.

[2] Aramant R B, Seiler M J, Ball S L. Successful cotransplantation of intact sheets of fetal retina with retinal pigment epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(7): 1557 - 1564.

[3] Sharma R K, Bergstrom A, Ehinger B. Influence of technique and transplantation site on rosette formation in rabbit retinal transplants[J]. Acta Ophthalmol Scand, 1997, 75(1): 3 - 10.

[4] Sagdullaev B T, Aramant R B, Seiler M J, *et al*. Retinal transplantation-induced recovery of retinotectal visual function in a rodent model of retinitis pigmentosa[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(4): 1686 - 1695.

[5] Aramant R B, Seiler M J. Retinal transplantation——advantages of intact fetal sheets[J]. Prog Retinal Eye Res, 2002, 21(1): 57 - 73.

（编辑　陈聪连）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，"名"可以有 1 个、2 个或 3 个，但"姓"只有 1 个，因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；"名"可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q

本刊编辑部