论著

文章编号:1000-5404(2008)11-0998-04

# 光性视网膜变性猪视网膜移植术后视功能的综合评价

陈少军,阴正勤,李世迎 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 通过移植分化完成而发育不完全的新生猪全层视网膜组织,探讨此种供体改善光变性猪视功能的可能性。方法 选1~6 d新生小猪为供体,用准分子激光微切削脉络膜制备神经上皮-RPE联合移植片,并通过玻璃体-视网膜手术将联合移植片移植进光变性猪视网膜下腔。在视网膜移植术后1周、1~5个月,通过检眼镜、眼底彩照、荧光造影,观察移植物的存活状况及宿主视网膜有无排斥反应迹象;用mfERG检测并比较不同时相间$N_1$、$P_1$波振幅和潜伏期,综合评价移植术后视网膜功能的变化。结果 对8只光变性猪15眼实施视网膜移植手术,移植物植入视网膜下腔11眼,手术成功率为84.6%。移植术后1~2个月可见与宿主视网膜有清楚界限的移植床及其内灰黑色移植物,FFA检查可见移植物有荧光渗漏。光变性猪视网膜移植术后1~5个月,mfERG检测$N_1$波、$P_1$波幅值和潜伏期并在不同时相点间比较,发现$N_1$波、$P_1$波幅值随存活时间延长而增高,反应活跃区在第2、3环;而各环$N_1$波、$P_1$波潜伏期较手术前均明显缩短,存活后期更显著。结论 功能检测结合活体形态的同步观察,综合评价视网膜移植术后光变性猪视网膜功能改善的效果,从而证实了分化成熟的新生猪视网膜移植确实改善了光变性猪的视网膜功能。

关键词:微型猪;光变性视网膜;视网膜移植;玻璃体切割术;多焦视网膜电图;RPE-神经上皮联合移植片

中图法分类号:R770.42;R774.13;R779.6 文献标识码:A

# Evaluation of retinal function after retinal transplantation for light-induced retinal degeneration in miniature pigs

CHEN Shao-jun, YIN Zheng-qin, LI Shi-ying (Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To investigate the possibility that transplanting the full-thickness neonatal piggy retinas that are completely differentiated but immature improves the retinal function after light-induced retinal degeneration in pigs. Methods Retinas from normal Guangxi Bama pigs aged 1 – 6 days were used as donor tissues. Neuroretina-RPE cografts were obtained from newborn pigs by using excimer laser for microablation of choroidal tissue and transplanted into the subretinal cavity of adult Bama pigs after light-induced retinal degeneration through vitrectomy and retinotomy. On days 5 – 7 and in 1st to 5th month after retinal transplantation, the survival of the cografts in the recipients and whether the host retinas have rejection were observed by ophthalmoscope, colour fundus photography and fundus fluorescein angiography, and the amplitude and lantency of $N_1$, $P_1$ waves between different periods were measured by mfERG. Results The retinal transplantation was performed in 15 eyes of 8 Bama pigs after light-induced retinal degeneration. The subretinal transplantation of the cografts was performed successfully in 11 eyes, with the operation success rate of 84.6% (11/15). In host retina, the gray-black graft inside transplantation bed could be seen clearly in 1st to 2nd month after transplantation and the leaked fluorescence in transplants was checked with FFA. The vertical comparison between different periods showed the amplitude of $N_1$, $P_1$ waves of retinal transplants rose with the extension of the survival time, and the areas where active response was observed were ring 2 and ring 3; but the latency of $N_1$, $P_1$ waves

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2007CB512203);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G072);重庆市自然科学基金(2006BA5002)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2007CB512203), the Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (06G072) and the Natural Science Foundation of China (2006BA5002)

作者简介:陈少军,女,山西省太原市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事玻璃体-视网膜疾病方面的研究。电话:13983766044

通信作者:阴正勤,电话:(023)68754401

收稿日期:2007-11-28;修回日期:2008-01-08

was shortened significantly in each ring as compared with that before operation, especially in late survival period. Conclusion The function measurement and the observation of living body together confirm the transplantation of completely differentiated retina from newborn pigs improves the retinal function of pigs after light-induced retinal degeneration.

**Key words**: miniature pig; light-induced retinal degeneration; retinal transplantation; vitrectomy; mfERG; RPE-neuroretina cograft

近 20 年大量视网膜移植的研究工作已取得初步成果，确认了手术操作的安全性，移植物可被宿主接受，宿主尚有视功能改善的基础[1]。这些研究成果为治疗视网膜色素变性（retinitis pigmentosa，RP）等视网膜变性疾病提供了可靠的实验室依据。目前用于视网膜移植的细胞和组织都不充足且来源有限，采用的动物模型多是视网膜自然变性的鼠类模型且在非直视下进行视网膜移植，建立的手术方法距临床应用相去甚远。形态学和免疫组化研究结果显示供体组织与受体视网膜产生了联系，但采用电生理手段对移植后功能方面的研究还缺乏说服力。然而，关于成熟视网膜供体及大型动物模型的研究报道很少，大型动物在视网膜移植后从活体水平上进行形态观察结合功能检测评价移植效果的研究更少见报道。本研究通过移植分化完成而发育不完全的新生猪全层视网膜组织，探讨此种供体改善光变性猪视功能的可能性。

## 1　材料与方法

### 1.1　主要实验器材

节能灯（上海康普莱公司）、ST-80B 光度计（北京师范大学光电仪器厂）、Leica Qwin 图像分析系统、准分子激光机（美国鹰视酷眼系统）、玻璃体切割机（美国 Alcon）、手术显微镜（德国 Zeiss S5）、视网膜移植器（自制）、荧光血管造影系统（德国 HRA Ⅱ）、视觉电生理诊断系统（德国 Roland Consult）。

### 1.2　动物模型及供体移植片的制备

1.2.1　微型猪光性视网膜变性模型的建立与鉴定　12 只 2 月龄广西巴马猪（第三军医大学实验动物中心提供），雌雄不拘，体质量 3.0～4.2 kg，被节能灯产生的可见光（波长 400～700 nm，照射强度 2 500 lux，照射时间 12 h/d）持续照射 3 个月以上，慢性诱导视网膜变性。

取 1 只光变性猪眼球用于模型鉴定。采用 Leica Qwin 图像分析系统测量视网膜外核层（outer nuclear layer，ONL）厚度，透射电镜观察感光细胞超微结构，多焦视网膜电图（multifocal electroretinogram，mfERG）检测光变性猪 $N_1$ 波、$P_1$ 波振幅和潜伏期，从功能和形态两方面鉴定模型。

1.2.2　新生猪神经视网膜-RPE 联合移植片的制备及鉴定　选出生后 1～6 d（postnatal days 1-6，PN1-6）新生小猪为供体，眼球取出后制成神经视网膜-RPE-脉络膜复合体，用准分子激光（能量密度 0.84 mJ/cm$^2$，发射频率 400 Hz，切削直径 6.5 mm）PTK（phototherapeutic keratectomy）模式微切削新生猪脉络膜，切削深度 45～75 μm。组织病理学检查鉴定。

### 1.3　视网膜移植手术程序

光变性猪术前 24 h 禁食禁水。视网膜移植术前每次取 1 只 PN1-6 新生小猪双眼制备联合植片。将激光切削后的植片行明胶双面包埋，再切成 2 mm × 3 mm 大小的矩形条，浸入 Ames'液紫外灯下消毒 30 min，置入 4 ℃冰箱备用。3% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉后，散瞳，备眼，消毒铺巾，角膜缘后 4 mm 巩膜穿刺建立玻切三通道；切净玻璃体后在黄斑区上方约 1 视盘直径（papillary diameter，PD）处用钝针头于视网膜上造一小口，并注入 Ames'液少许，造成视网膜局限性浅脱离；用自制视网膜移植器吸入联合移植片，插入视网膜脱离区内的小口中，然后匀速推注。行气-液交换，视网膜平复后硅油填充。

### 1.4　术后临床观察

术后 1 周、1～5 个月，观察眼前节表现，用检眼镜、眼底彩照、荧光造影从活体水平观察移植物的存活状况及宿主视网膜有无排斥反应迹象。

### 1.5　视网膜移植术后视网膜功能检测

用视觉电生理诊断系统进行 mfERG 检测。刺激及记录条件：刺激图形为随离心度增加的六边形阵列。刺激范围 70°，103 个等大六边形，通频带 3～300 Hz。检测 mf-ERG 的 N1 波、P1 波振幅、N1 波、P1 波潜伏期。

### 1.6　统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析或 $t$ 检验，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 2　结果

### 2.1　微型猪光性视网膜变性模型的鉴定

形态学方面：HE 染色见光变性猪感光细胞内外节变短，外核层细胞核减少至 4～6 排，外核层厚度减少了 20.98%；电镜下见在后极部光变性猪视网膜感光细胞内线粒体数量减少，肿胀明显并可见嵴断裂。视功能方面：mfERG 检测光变性猪同正常猪相比较，N1、P1 波振幅在 1～6 环内均较正常明显降低，而在视网膜内传导时间明显延长，反映外层视网膜功能受到损害。从功能和形态两方面证实光损伤部位是在光感受器。

### 2.2　新生猪神经视网膜-RPE 联合移植片的鉴定

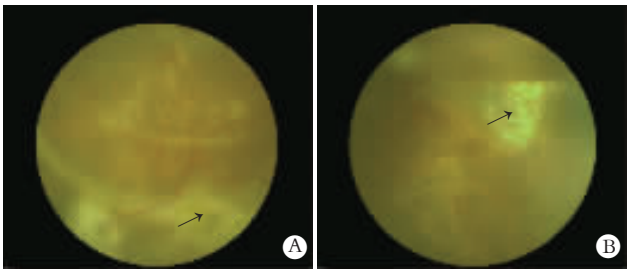
使用 PTK 模式切削 45 μm 厚时，显示大部分脉络膜主体消失，残留少许脉络膜毛细血管组织；而切削厚度到达 65 μm 时，显示切削中心脉络膜组织基本祛除，组织切削面较均匀。

### 2.3　视网膜移植术后临床观察

2.3.1　概述　3 只光变性猪因追加麻药过量分别于术中、术后抢救无效死亡。8 只光变性猪实施视网膜移植术 15 眼，伪手术 1 眼（伪手术眼除不植入移植片外，其余步骤相同），发生眼内

炎2眼。移植物植入视网膜下腔11眼,手术成功率为84.6%。

2.3.2 眼底检查、眼底彩色照相及FFA检查 光变性猪术后1个月,移植术眼黄斑中心区稍上方可见椭圆形移植区,与正常视网膜有清楚的分界线。移植部位色素沉着并隐约可见黑灰色移植物,而光变性猪伪手术眼未见移植物(图1)。FFA检查移植术后早期见移植物荧光渗漏明显,边界清楚(图2);而移植术后晚期移植区内瘢痕着染。




A 移植手术眼:箭头示移植区内见黑色移植物;
B 伪手术眼:箭头示瘢痕区内未见移植物

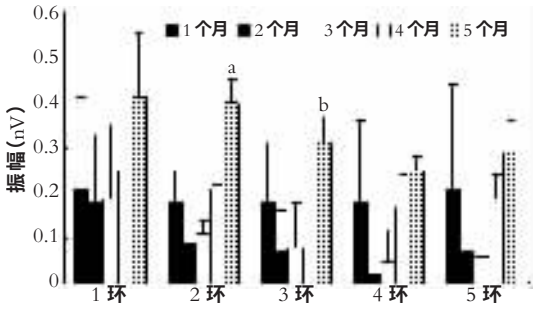
图1 视网膜移植术后眼底观察



图2 视网膜移植术后1个月移植物荧光渗漏

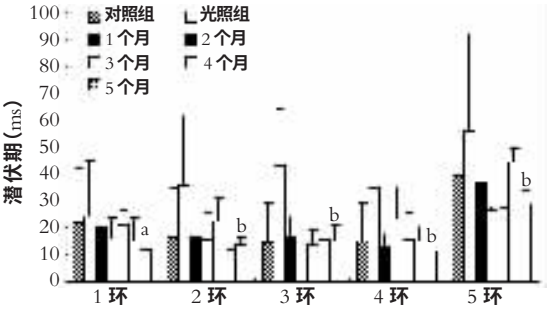
## 2.4 光变性猪组视网膜移植术后mfERG检测

2.4.1 $N_1$波振幅和潜伏期 视网膜移植术后1个月,各环$N_1$波幅值无差异,移植术后2、3个月,$N_1$波振幅在第4、第5环显著降低,而在移植术后第5个月,第3环$N_1$波振幅增高非常显著,其余各环均显著增高。视网膜移植术后1~5个月,$N_1$波潜伏期在各环较手术前均显著缩短($P<0.05$),移植术后4、5个月差异非常显著($P<0.01$)。见图3、4。




a $P<0.05$,b $P<0.01$,与术后2个月比较

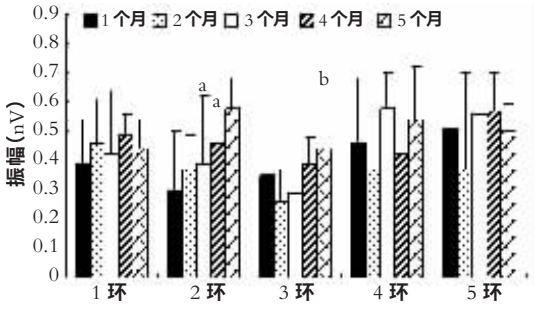
图3 $N_1$波振幅在光变性猪视网膜移植术后1、2、3、4、5个月的比较




a $P<0.05$,b $P<0.01$,与术后2个月比较

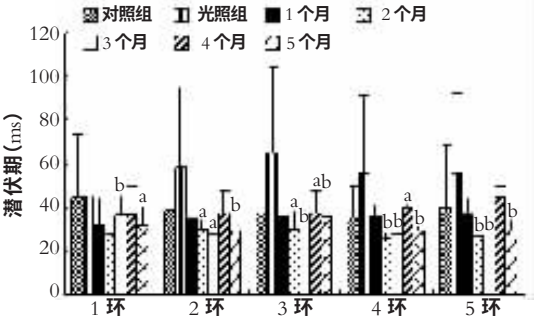
图4 $N_1$波潜伏期在光变性猪视网膜移植术后1、2、3、4、5个月的比较

2.4.2 $P_1$波振幅和潜伏期均值和柱图 视网膜移植术后1、2月个$P_1$波幅值在各环无差异,移植术后3、4个月在2环区域$P_1$波幅值显著增高($P<0.05$),移植术后5个月在2、3环区域$P_1$波幅值增高非常显著($P<0.01$)。视网膜移植术后1~5个月,在各环$P_1$波潜伏期较手术前均明显缩短,尤其在2、3、5个月缩短非常显著($P<0.01$)。见图5、6。




a $P<0.05$,b $P<0.01$,与术后2个月比较

图5 $P_1$波振幅在光变性猪视网膜移植术后1、2、3、4、5个月的比较




a $P<0.05$,b $P<0.01$,与术后2个月比较

图6 $P_1$波潜伏期在光变性猪视网膜移植术后1、2、3、4、5个月的比较

## 3 讨论

在大多数视网膜移植实验和临床研究中,视网膜移植术后使用眼底荧光造影是为了在移植后较长时间内评价移植术后排斥反应[1],主要观察的指标在宿主视网膜有:黄斑囊样水肿、视网膜广泛水肿、视网膜下渗出、色素脱失、荧光渗漏等;在移植物有移植物胶囊

化、存活后期荧光渗漏。本实验在移植后 1 ~ 2 个月时观察荧光造影，移植物有荧光渗漏，提示获取的移植片具有微循环功能，可能与宿主组织间已建立了细胞间联系。我们还观察到移植床内没有新生血管生成，没有发现移植物的排斥迹象，同眼底镜检查结果一致，确认了同种异体视网膜移植的安全性[2]。

mfERG 是通过特殊性质的刺激，得以记录不同区域的多个不同部位的视网膜电图。mfERG 包括 $N_1$、$P_1$、$N_2$等波成分，对于波形的分析包括振幅密度和潜伏期。通过 mfERG 不仅了解了单个视网膜病灶区的变化，还获悉了相邻视网膜部位的视网膜状况、相互之间的联系及互比。采用 mfERG 研究人类 RP 疾病发现[3-5]，该病典型的表现是振幅降低和潜伏期延长，原因是光感受器外节受到破坏。近年来，研究人员对猕猴、鼠类、猫、兔等动物采取不同刺激方式对视网膜组织结构和视网膜疾病进行各种研究[6,7]，为一些遗传性视网膜疾病提供新的评价方法。目前我们未检索出有关猪的 mfERG 的研究报道。

本实验中我们测得正常微型猪 mfERG $N_1$ 波潜伏期为 11 ms，$P_1$ 波潜伏期为 30 ms，光诱导视网膜变性猪的 $N_1$ 波潜伏期 39 ms，$P_1$ 波潜伏期 56 ms，潜伏期的延长反应了光损伤的部位在光感受器。mfERG 检测光变性猪视网膜移植术后视功能的变化，并与术前、正常猪视功能比较，$N_1$ 波和 $P_1$ 波幅值较术前均增大，在存活后期接近正常；而 $N_1$ 波和 $P_1$ 波的潜伏期却较术前显著缩短，在存活后期接近正常甚至低于正常。$N_1$ 波和 $P_1$ 波反应活跃区在第 2 ~ 4 环，离中心凹 3 ~ 15°，也正是手术中选择的移植部位。我们还观察到随着动物存活时间的延长，$N_1$ 波和 $P_1$ 波反应越高、传导越快，提示移植物可能与宿主视网膜在组织结构上建立了联系。

光变性猪实施视网膜移植手术后虽然在个别术眼引出的刺激反应甚至高于正常，而在宿主视网膜内的传导也短于正常，但总体水平还是较正常略低。我们分析原因：①2 mm × 3 mm 大小的移植物不可能替代较大范围的宿主视网膜光感受器的凋亡细胞，移植物周围的变性或凋亡细胞影响检测结果；②玻璃体腔填充的硅油导致 ERG 幅度下降[8]；③手术创伤本身的影响。本研究中我们设伪手术眼作对照，目的在于了解手术本身对视网膜功能的影响。mfERG 检测结果提示，在视网膜移植区手术创伤对视网膜功能产生了影响；而其他区域既没有移植物又无手术损伤，所以 $P_1$ 波、$N_1$ 波幅值不会增大或降低，潜伏期也没有变化。从伪手术猪双眼 mfERG 检测结果看出，视网膜移植术眼 $P_1$ 波、$N_1$ 波幅值比假手术眼显著增高，排除手术创伤、光性损伤共同的影响因素，移植物改善光变性猪视功能的作用得以确认。

最近几年对视网膜前体细胞的可塑性研究成为热点。移植无限扩增并具有多向分化潜能的视网膜前体细胞，以期在宿主眼内继续发育、增殖并向感光细胞分化，替换坏死和凋亡的细胞，重建视网膜的神经网络，改善视功能。有研究证实，成年哺乳动物眼内也具有多向分化潜能的视网膜前体细胞的存在[9]，推测分化完成而发育不完全的新生猪应具有视网膜前体细胞。本实验光变性猪视网膜移植术后视功能改善机制可能是联合移植片激活了受体视网膜休眠状态的内源性干细胞（视锥前体细胞），定向分化为视锥和视杆细胞，并诱导成熟神经胶质细胞的逆向分化[10]，重建了视网膜神经层细胞与残存感光细胞的突触联系。因此，分化完成而发育不完全的新生猪视网膜可以作为一种供体来源。

## 参考文献：


[1] Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, *et al*. Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice[J]. Vision Res, 2003, 43: 867 - 877.

[2] 马　静，唐仕波，罗　燕，等. 条件培养液对人视网膜前体细胞分化的诱导[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(1)：65 - 68.

[3] Abe T, Tomita H, Kano T, *et al*. Autologous iris pigment epithelial cell transplantation in monkey subretinal region[J]. Curr Eye Res, 2000, 20(4): 268 - 275.

[4] Chan H L, Brown B. Investigation of retinitis pigmentosa using the multifocal electroretinogram[J]. Ophthalmic Physiol Opt, 1998, 18(4): 335 - 350.

[5] Greenstein V C, Holopigian K, Seiple W, *et al*. Atypical multifocal ERG responses in patients with diseases affecting the photoreceptors [J]. Vision Res, 2004, 44(25): 2867 - 2874.

[6] 吴德正，江福钿，梁炯基，等. 视网膜色素变性的多焦视网膜电图[J]. 眼科研究，2000，18(4)：346 - 349.

[7] Hare W A, Ton H. Effects of APB, PDA, and TTX on ERG responses recorded using both multifocal and conventional methods in monkey. Effects of APB, PDA, and TTX on monkey ERG responses [J]. Doc Ophthalmol, 2002, 105(2): 189 - 222.

[8] Ball S L, Petry H M. Noninvasive assessment of retinal function in rats using multifocal electroretinography[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(2): 610 - 617.

[9] Seeliger M W, Narfstrom K, Reinhard J, *et al*. Continuous monitoring of the stimulated area in multifocal ERG[J]. Doc Ophthalmol, 2000, 100(2 - 3): 167 - 184.

[10] Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, *et al*. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration[J]. Exp Eye Res, 2007, 85(2): 234 - 241.


（编辑　龙　亮）