维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0416－05

兔眼晶状体再生的实验研究

汤永强，李　立

(重庆医科大学第二临床学院眼科，重庆　400010)

【摘　要】目的：观察活体内兔眼晶状体再生现象及维生表素 A 对晶状体再生的影响。方法：兔眼行囊晶体摘除术，术后实验给隔日腹部皮下注射维生素 A0.1ml，对照组隔日腹部皮下注射用水 0.1ml，注射共持续 2 月。术后定期观察，16 周后处死动物，观察晶状体再生情况并做组织切片和超薄切片观察。结果：实验组与对照组中分别有 3 眼和 1 眼可见虹膜后再生的晶状体样物质，行光镜和电镜检查为典型晶状体结构。结论：兔眼晶体摘除后可再生出具有典型晶体结构的物质，但目前尚未观察到完整的再生晶体。维生素 A 对上述过程有一定的正向调节作用。

【关键词】兔；晶体再生；维生素 A

【中国图书分类法分类号】R77　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－09－02

The experimental study on regeneration of lens

TANG Yongqiang, et al

(*Department of Ophthalmology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the phenomena of lens regeneration in rabbits in vivo and the influence of vitamin A on it. *Methods*: Intracapsular lens extraction were done. Following the operation, 0.1ml vitamin A oil was given by subcutaneous injection into abdomen every other day in experimental group, while 0.1ml saline was given in control group. This procedure lasted 2 months. The animals were observed regularly after operation and were put to death at the 16th week follwing the operation. The state of lens regeneration were analyzed by means of tissue sections and ultrathin sections. *Results*: There were 3 and 1 eye(s) in which regenerated lens－like substance was found in the back of iris respectively in experimental group and in control group. The regenerated substance was estimated to be typical lens sturcture after the light microscopical and electron microscopical analysis. *Conclusion*: Our experiment suggests that the substance possessing typical lens structure can be regenerated after lens extraction in rabbit, although the intact regenerated lens is not found at present. Vitamin A can accelerate this course in vivo.

【Key words】Rabbit; Lens regeneration; Vitamin A

目前白内障仍是世界范围内的主要致盲原因，虽然复明手术正日益精细，但术后后发障的发生还难以避免，人工晶体的调节等问题远未解决，特别是 2 岁以下的患儿不能植入人工晶体，术后无晶体眼易产生弱视，人工晶体植入后的长期影响由于尚无足够资料更是无法估计。在这样的背景下进行晶体再生的研究是十分必要的，尽管这涉及组织工程需要长期复杂的研究，但这个课题有着广泛的发展空间和应用前景。本实验在以往研究的基础上，选择常见的哺乳动物兔为实验对象，初步探讨活体内兔晶体再生的现象。

作者介绍：汤永强(1974－　)，男，主治医师，硕士，主要研究方向：晶状体病。

1　材料和方法

1.1　实验动物

出生后刚能睁眼、兔龄 10～12 天的新西兰大白兔共 13 只，雌雄不拘，体重 235～260g(248±8g)。由重庆医科大学实验动物中心提供。入选乳兔兔毛均匀光滑，食欲旺盛，精神活跃。外眼检查无明显可见的畸形，眼睑开闭功能正常，结膜囊内无分泌物。

所选动物分为 A、B 两组，分别产于两只母兔。A 组为实验组，共 7 只；B 组为对照组，共 6 只。两组动物以下手术操作均由同一人完成。步骤一致，所选动物均以左眼为手术眼。

1.2　实验方法

1.2.1　术前准备及麻醉

术前正常进食，麻醉前用庆大霉素稀释液冲洗术眼，1%

维普资讯 http://www.cqvip.com

阿托品眼液扩瞳3次，并小心剪去术眼周围兔毛，碘伏消毒。取氯胺酮、氯丙嗪混合液（体积比为2:1），按2ml/kg的剂量给予大腿肌肉内注射，给药后3～5min起效，对手术刺激无反应，但可保持自主呼吸。

1.2.2 手术方法

沿角膜缘剪开上方球结膜，作120°弧形切口；掀开角膜瓣，暴露出晶状体（瞳孔已充分散大），用虹膜恢复器伸向晶状体赤道部，在360°范围内轻轻拨断悬韧带；将二氧化碳冷疗器的冷凝头紧贴晶状体表面，冷凝20s左右，见晶状体已大部分凝固变为白色，轻轻拨动冷凝头，使晶状体慢慢脱位，最后完全摘除晶状体，间断缝合角巩膜缘切口，注入平衡盐液以形成前房，手术结束。

1.2.3 术后处理及观察

术皮点典必殊眼液和迪可罗眼液，每日4次，夜间眼部涂四环素可的松眼药膏，用药1周。实验组隔日腹部皮下注射维生素A油剂（取自贝特令胶囊，浙江海力生医药公司）0.1ml，对照组隔日腹部皮下注射注射用水0.1ml。注射共持续2月。

术后第1周每天观察术眼情况，包括结膜充血、结膜囊内分泌物、角膜及角巩膜切口、前房及虹膜等。此后每周观察术眼情况，重点是角膜、前房、虹膜。2月后扩瞳，做裂隙灯显微镜检查。

1.2.4 再生晶体的观察

术后16周，耳缘静脉注射空气20ml，处死实验动物后立即摘除双眼，迅速沿赤道部剖开眼球，去除玻璃体后观察虹膜后的结构。游离出实验组再生出的晶体样结构和对照组的正常晶状体组织，拍照，部分用10%福尔马林固定进行HE染色后进行光镜检查，部分用4℃预冷的戊二醛固定，4℃冰箱内放置1周后制样进行扫描电镜观察。

2 结 果

2.1 术中情况

2.1.1 一般情况 所有兔眼晶状体囊内摘除术均有同一手术才完成，每眼手术时间约在30min左右，其中晶状体冷冻时间约20s。术后90～120min麻醉消退后动物可自行苏醒，并在一天内逐渐恢复正常进食和活动。

2.1.2 术中并发症

①玻璃体脱出：见于最初2眼手术（实验组与对照组各1眼），玻璃体前界膜破裂，玻璃体脱出。清除切口附近玻璃体并回复虹膜后同样关闭切口；

②术中前房出血：晶状体摘除后发生前房内出血1眼，前房冲洗后出血被清除干净；

③角膜内皮水肿混浊：术中角膜内皮水肿混浊见于3眼，可能与术中操作操作有关。

2.2 术后观察

2.2.1 术后动物生长情况 术后动物生长情况良好，进食活动正常，于术后3周（即兔龄1月左右）将幼兔与母兔分开，以全价兔料分笼饲养，每笼3～4只。术后动物死亡2只，实验组与对照组各1只，分别在术后第40天和72天，死亡原因不详。

2.2.2 术后眼部情况观察 术后第1周，每日观察术眼情况。术后第1天，术眼分泌物较多，全部术眼

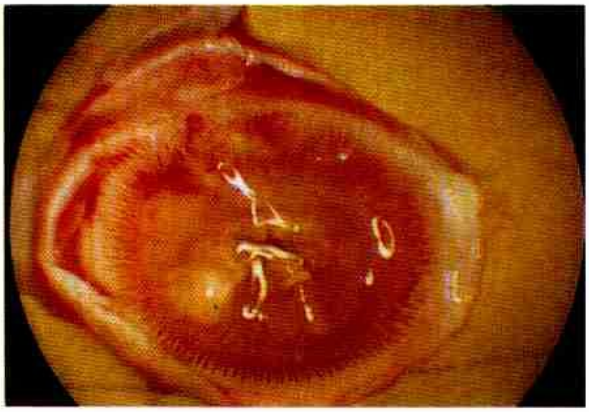


图1 再生的晶体样结构



图2 再生结构的HE染色，显示多层上皮细胞和纤维样结构（HE×400）

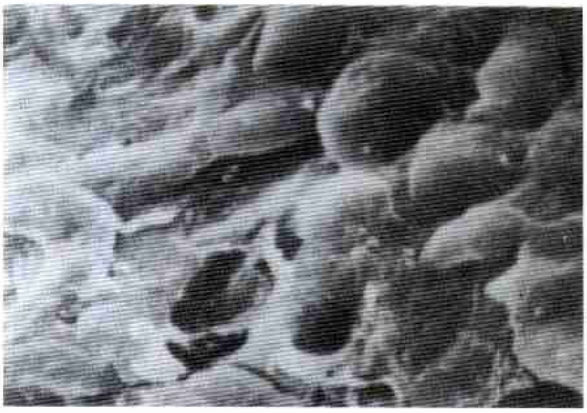


图3 再生结构中上皮细胞的扫描电镜像（×300）

维普资讯 http://www.cqvip.com

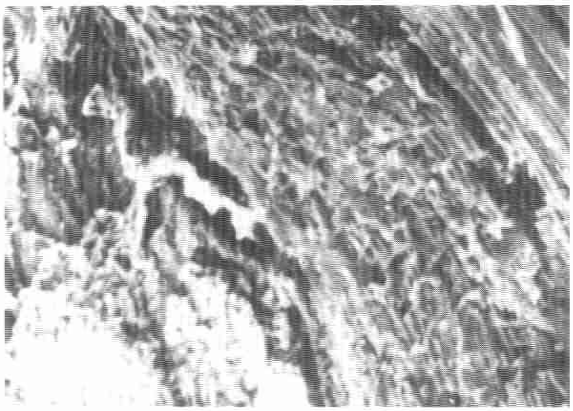


图 4 再生纤维结构的扫描电镜像(×200)

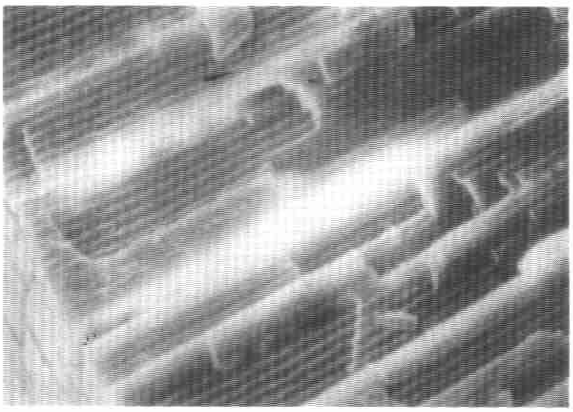


图 5 正常晶体纤维的扫描电镜图(×200)

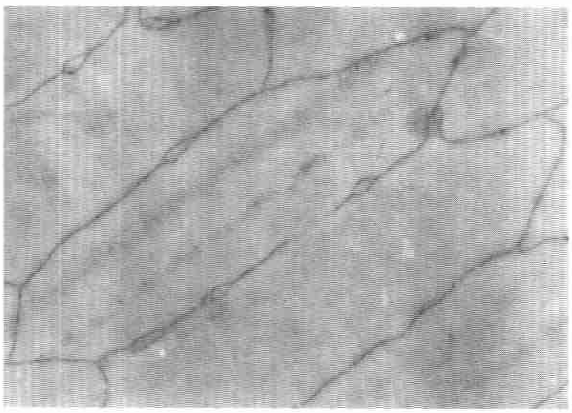


图 6 再生纤维结构的透射电镜像(×16000)

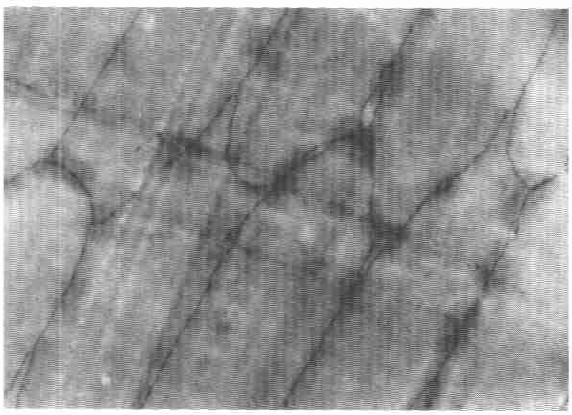


图 7 正常晶体纤维的透射电镜像(×16000)

均有眼睑粘连。仔细用玻棒分开粘连,坚持眼部用药,到术后第 3 天术眼分泌物已基本消失,未再发生眼睑粘连。术后眼部充血持续时间约 5~7 天。

2.2.3 术后并发症:

①角膜混浊:术后角膜混浊发生率较高,与术中操作有关。术后第 1 周时,实验组与对照组分别有 2 眼和 1 眼存在角膜混浊水肿,到术后 16 周时观察,两组仍各有 1 眼存在角膜混浊,前房内结构不能看清。

②虹膜嵌顿、瞳孔移位:术后 16 周时观察,实验组与对照给在角膜透明的术眼中,分别有 1 眼存在瞳孔明显向上移位,虹膜嵌顿于角巩膜切口。

③术后高眼压:术中明确发生了玻璃体脱出的 2 眼,术后 1 月时观察眼压高,其中 1 眼发生葡萄肿。该实验动物后来均已死亡。术后 16 周观察,剩余术眼均无明显高眼压表现。

2.3 术后晶状体再生情况观察

2.3.1 活体内晶状体再生的观察

术后定期观察,裂隙灯下未能发现肉眼可见的虹膜后再生物质。

2.3.2 眼球摘除后观察

动物处死时,实验组与对照组分别摘除 6 只和 5 只手术眼。实验组与对照组中分别有 3 眼和 1 眼可见虹膜后再生的晶体样物质,其余手术眼解剖后虹膜后空虚,未见特殊物质生长。

2.3.3 再生的晶状体样物质的观察

肉眼观(见图 1):虹膜后晶状体样物质呈片状生长,但形状不规则,也未铺满原有晶状体位置。厚度不均,部分区域还可见局限性的混浊增厚,形似后发性白内障。

光镜观察(见图 2):选取虹膜后晶状体样物质,经 10% 福尔马林固定后制成组织切片并作 HE 染色,光镜下观察可发现层状排列的晶状体上皮细胞,细胞形态与正常晶状体上皮细胞相似,但光镜下晶状体上皮细胞向晶状体纤维细胞分化的过程不明显。再生组织无明显极性,也不能分出前后极、赤道部以及皮质与核等正常晶状体的组织结构。镜下见再生组织内部充满大量嗜伊红、排列混乱的晶状体纤维样物质,无极性,也无明显排布规律。

扫描电镜观察(见图 3、4、5):扫描电镜下上皮细胞可见到层状排列的细胞部分可见到层状排列的细胞表面,呈半球状突出,细胞间可见不规则间隙;而相当于纤维的部分则可见到不规则排列的柱状纤

维普资讯 http://www.cqvip.com

维,无明显分布规律。与正常晶体纤维的扫描电镜图像有显著差异。

透射电镜观察(见图 6、7):再生物质制样后透射电镜观察,未发现光镜下可见的上皮细胞。镜下可见大量纤维结构,各自边界清晰,相互间以指状突起和相应的凹陷紧密嵌合。而纤维的细胞结构难以分辨。与正常晶体纤维的图像相似。

3 讨 论

国外对晶体再生的研究已进行了多年,主要集中在一些低等生物如蝾螈,研究较多的是虹膜色素上皮的转分化过程,发现在晶体摘除后,背侧虹膜色素上皮细胞开始增殖、脱色素、去分化,随后形成晶体泡,不断分化出晶体纤维,最终再生出一个完整的晶体。对哺乳动物晶体再生的研究较少,主要见于鼠和兔。研究表明幼鼠和成年鼠在完整摘除晶体后均可不同程度的再生晶体。兔晶体再生实验多保留了晶体囊膜,发现在残留的晶体囊袋内同样可以再生晶体物质。本实验在以往研究的基础上,选择常见的哺乳动物兔为实验对象,研究了兔眼晶状体摘除后活体内的晶体再生现象及维生素 A 对该过程的影响。

Shekhwat DS 等[1]的实验发现,不作任何处理的幼年和成年小鼠的晶体再生率分别为 20%(4/20)和 0(0/20),而给予 Vit A 的实验组的晶体再生率分别达到 90%(18/20)和 80%(16/20),该实验表明,Vit A 能显著提高幼年小鼠的晶体再生率,并对通常不能再生晶体的成年小鼠也有明显的促进作用。实验结果,晶体再生率实验组为 50%(3/6),对照组为 20%(1/5),也可发现 VitA 的促进作用。

VitA 效应的本质还不甚明了,推测可能与其促进去分化过程有关。对禽类和哺乳类动物组织的研究表明,VitA 可增加溶酶体水解酶的合成和释放,引起骨和软骨基质分解,健康细胞释放,这些细胞则表现为基质细胞的表型,此外它还可促进不同类型细胞的有丝分裂[2]。Niazi I A 等[3]发现在蛙和蟾蜍蝌蚪的肢体再生中,VitA 可提高酸性磷酸酶的活性并增加细胞有丝分裂。提示 Vit A 的促进作用。

另一方面,VitA 的效应还可以通过视酸(retinoic acid,RA)来体现。VitA(即视黄醇)有三种存在形式:视黄醇、视黄醛和视黄酸。视黄醇与视黄醛在体内可相互转化,并具有相同功能,视黄醛可进上步氧化成视黄酸,但这是个不可逆过程。RA 是一种亲脂的信号分子,来源于广泛存在的非信号前体——视黄醇,通过激活细胞核受体而决定多种组织的分化和形态发生,这些核受体是存在于靶细胞内的配本依赖性转录因子。RA 水平由胞浆内的视黄酸结合蛋白所调控。外源性给予 RA 可通过一种特殊方式对涉及再生过程的多种同源盒基因进行调控[4]。

RA 可激活晶体蛋白的表达,包括 αB-晶体蛋白,一种晶体分化终结的特征性蛋白。上述效应是通过晶体蛋白基因启动子内的晶体特异性调节域来实现的,该调节域也是 Pax-6 激活 αB-晶体蛋白基因的作用位点。Pax-6 是决定晶体发育的主要基因之一,突变后可导致晶体形态发育的破坏,RA 的信号传导也需要依赖 Pax-6 来完成,在携带 Pax-6 突变的小鼠眼内可发现 RA 信号传导受阻,发育中的晶体原基也不能对外源性 RA 发生反应[5]。

Tsonis 等[6]的实验发现,抑制 RA 合成或抑制 RA 受体(RAR)活性都可明显影响晶体再生。双硫仑可抑制视黄醛的醛脱氢酶,从而抑制 RA 的合成,在蝾螈晶体摘除后眼内给予双硫仑,可观察到 50% 以上的晶体再生过程迟滞。RAR 拮抗剂"193109"则使 60% 的晶体再生完全抑制、明显延迟或使再生晶体形态异常,其效应呈浓度依赖性。作者因而认为 RA 及其受体在调控晶体再生方面作用明显,并推测虹膜色素上皮细胞(IPE)的转分化现象对特定浓度或特定时间段内的 RA 及其受体尤为敏感。进一步的研究有 RAR-δ 探针作原位杂交观察其表达情况,发现 RAR-δ 在正常眼内表达极少,在 IPE 细胞去分化和晶体泡形成后开始表达,并随着晶体泡发育而逐渐增多,在晶体纤维分化成熟后达到高峰。上述结果提示,RAR-δ 对转分化过程和晶体纤维的分化极为重要,也可以解释为何抑制 RAR 能够影响晶体再生。该作者的另一项研究还观察了 RAR-α 在晶体再生中表达和作用,提出不同亚型 RAR 可在晶体再生的不同阶段发挥不同作用,RAR-α 主要对细胞增殖和晶体泡的分化过程起作用[7]。

实验在兔的体内重复了晶体再生过程,观察到了再生的晶体样结构,该结构位于虹膜后方,组织学检查证明有覆盖的上皮和内部的纤维状结构,电镜下可看到纤维结构的细节,但纤维排列紊乱。该研究从活体实验方面证实了有关 IPE 细胞转分化进

维普资讯 http://www.cqvip.com

而再生晶体的理论。但从实验结果看,无论是再生晶体的发生率,还是再生物质的形态学、组织学,与以往研究相比均有较大差距,在进一步的研究中还需要仔细分析相关的调控因素和影响条件,并且对再生过程进行详细的组织学分析,甚至遗传学的研究,希望能在较高等哺乳动物体内观察到晶体再生的发生。

参 考 文 献

[1] Shekhawat D S, Jangir O P, Prakash A, et al. Lens regeneration in mice under the influencee of vitamin A[J]. J Biosci, 2001;26(5):571 - 576.

[2] Fell H B, Rinaldini L M. The effect of vitamin A and C on cells and tissues; in cell and tissues in crlture(ed)[J]. E N Wilmer(New York: Academic Press) vol 1, 659 - 699.

[3] Niazi I A. Background to work on retinoids and amphibian limb regeneration; studies on anuran tadpoles[J]. A retrospect. J Biosci, 1996;21:273 - 297.

[4] Maden. the homeotic transformationof tails into limb in Rana temporaria[J]. Dev Biol, 1993;159:379 - 391.

[5] Emwright JF, grainer RM. Altered retinoid signaling in the heads of small eye mouse embryos[J]. Dev Biol, 2000;221(1):10 - 22.

[6] Tsonis PA, Trombley MT, Rowland T, et al. Role of retinoic acid in lens regeneration[J]. Dev Dyn, 2000;219(4):588 - 593.

[7] Tsonis PA, Tsavaris M, Call MK, et al. Expression and role of retinoic acid receptor alpha in lens rgeneration [J]. Dev Growth Differ, 2002;44(5):391 - 394.

(上接第 411 页)是一种抗凋亡基因可加速雄激素非依赖性的进展。Gleave 等[9]用 Clusterin 反义寡核苷酸作用于雄激素非依赖性前列腺癌,发现在动物模型中与紫彬醇有相同作用,可提高肿瘤的凋亡率和消退率。综上,Clusterin 不仅可望成为前列腺癌诊断和评估预后的指标而且有望成为前列腺癌,尤其是激素非依赖性前列腺癌治疗新的靶目标。

参 考 文 献

[1] Sintich SM, Steinberg J, Kozlowski JM, et al. Cytotoxic sensitivity to tumor necrosis factor - alpha in Pc3 and LNCaP prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP - 2(clusterin)[J]. Prostate, 1999;39(2):87 - 93.

[2] Kirszbaum L, Sharpe JA, Murphy B, et al. Molecular cloning and characterlzation of the novel human complement - associated protein, SP - 40, 40: a link between the complement and reproductive system[J]. EMBO J, 1989;8:711 - 718.

[3] Steinberg I, Oyasu R, Lang S, et al. Intracellular levels of SGP - 2(Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 1997;3(10):1707 - 1711.

[4] 张 徽,刘 纯,李园园. 47 例甲状腺癌中 FasL 检测的病理学意义[J]. 重庆医科大学学报, 2003;28(1):69 - 71.

[5] Mapara, MY, Bargou R, Zugck C, et al. APO - 1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl - 2 oncogene expression[J]. Eur J Immunol, 1993;23(3):702 - 708.

[6] Mikata K, Uemura H, Ohuchi H, et al. Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of P53 gene: gene transfer by electroporation [J]. Mol Cancer Ther, 2002;1(4):247 - 252.

[7] Gleave M, Tolcher A, Miyake H, et al. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisene bcl - 2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model[J]. Clin Cancer Res, 1999;5(10):2891 - 2898.

[8] Miyake H, Nelson C, Rennie PS, et al. Testosterone - repressed prostate message - 2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2000;60(1):170 - 176.

[9] Gleave ME, Miyake H, Zellweger T, et al. Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, Clusterin/testosterone - repressed prostate message2 to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer[J]. Urology, 2001 ;58(2 suppl 1):39 - 49.