维普资讯 http://www.cqvip.com

40-44

(14)

手术显微镜光源对豚鼠视网膜损伤及维生素E保护作用的研究－电镜观察与生化分析

R774.1
R779.1

临床学院眼科 姚小莉* 汪湘琳

提 要 研究手术显微镜光源对豚鼠视网膜的影响及维生素E(Vitamim E,V_E)的防护作用。方法:照射豚鼠眼15、30、60和90分钟,并于光照60分钟前2小时和光照后1及6小时用V_E。结果:光照15分钟组已有视网膜超微结构明显改变和超氧化物歧化酶(Superoxid dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Gluthione peroxidase,GSH－P_X)明显降低,视网膜超微结构损伤程度及SOD、GSH－P_X降低,丙二醛(Malondialdehyde,MDA)升高与光照时间延长呈平行关系。锥细胞损伤程较杆细胞重。光照前2小时用V_E对视细胞和Bruch膜的保护作用较光照后1及6小时用V_E效果好,但V_E对视网膜色素上皮(Retinal pigmental epithelium,RPE)的损伤无明显保护作用。结论:手术显微镜光源可引起视网膜光损伤,V_E是有效的防护剂。

关键词 视网膜; 光损伤; 维生素E
中图分类号 R779.1

视网膜损伤. 显微外科手术, 光源,

随着显微手术的普及和强光源眼科治疗仪器的应用,医源性视网膜光损伤已日益引起人们的关注。本研究从超微结构水平结合有关生化定量测定,观察分析手术显微镜光源对豚鼠视网膜的影响,探讨视网膜光损伤的机理及维生素E(V_E)的预防和治疗作用,为临床防治医源性视网膜光损伤提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 动物模型 35只健康无眼疾花豚鼠,体重250－350克,随机分为三大组,8个小组(表1)。

表1 实验动物分组

组 别		动物数(只)	实验眼数(n)
A	单纯光照组		
	A_1 光照15分钟组	5	10
	A_2 光照30分钟组	4	8
	A_3 光照60分钟组	5	10
	A_4 光照90分钟组	4	8
B	光照60分钟＋V_E组		
	B_1 光照前2小时给药	4	8
	B_2 光照后1小时给药	4	8
	B_3 光照后6小时给药	5	10

* 女,1963－03出生,主治医师

全麻后1%阿托品扩瞳,固定眼球于水平位,用YZ－20型手术显微镜距角膜200mm分别照射左右眼(照射一眼时,另眼遮盖),照射时间15－90分钟,照度12000Lux。V_E给药组按50mg/kg体重的剂量作腹腔内注射。

1.2 检测指标 所有实验动物均于照射后24小时取材,每小组取6－8只眼球的视网膜匀浆上清液测定超氧化物歧化酶(SOD)[1,2]、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH－P_X)[3]及丙二醛(MDA)[4]的含量和活力,反映视网膜组织内自由基的生成和脂质过氧化反应水平;2只眼球于灌流固定后取材,按常规制备电镜样品,定向包埋,以H－600型透射电镜观察。

2 结果

2.1 视细胞和色素上皮(RPE)的超微结构改变

2.1.1 正常对照组 豚鼠视网膜的锥细胞内节线粒体数量较杆细胞内节少,而高尔基复合体则较发达,两种视细胞外节膜盘腔狭窄,排列整齐(图1)。RPE细胞胞质内有丰富的滑面内质网(SER),基底面有许多胞质突起附于基板,其外是Bruch膜(图2)。

2.1.2 单纯光照组 光照15分钟(A_1组),电镜下已见损伤改变,视网膜外节膜盘腔扩大,盘膜局部断裂崩解,内节正常,RPE未见明显异常,Bruch膜有局限性断裂,视细胞内髓样结构增多(图3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 正常及光照各组视网膜SOD、GSH－P_X、MDA含量变化

组 别	SOD (μg/mg · pro)	GSH－P_X (μg/mg · pro)	MDA (nmol/mg · pro)
C(n=8)	7.4917±1.781	41.9871±5.0138	1.5051±0.1933
A_1(n=8)	6.3526±0.8866 *	23.6233±7.0276 * *	1.6735±0.1981
A_2(n=6)	6.0945±0.1846 * *	20.2103±2.9349 * *	1.6464±0.1906
A_3(n=8)	4.9269±0.5200 * *	16.3850±3.8122 * *	1.7906±0.1316 *
A_4(n=6)	4.9544±0.3006 * *	14.4464±2.9731 * *	2.0570±0.1638 * *

注:与C组比较 * P<0.05 * * P<0.01

表3 V_E用药各组与正常及单纯光照60分钟组视网膜SOD、GSH－P_X、MDA含量变化

组 别	SOD (μg/mg · pro)	GSH－P_X (μg/mg · pro)	MDA (nmol/mg · pro)
C(n=8)	7.4917±1.0781	41.9871±5.0138	1.5051±0.1933
A_3(n=8)	4.9269±0.5200	16.4856±3.8122	1.7906±0.1316
B_1(n=6)	5.0953±0.4471$^{\Delta\Delta}$	26.5616±3.1472$^{**}_{\Delta\Delta}$	1.6080±0.0525 *
B_2(n=6)	4.9509±0.6233$^{\Delta\Delta}$	22.2342±4.7664$^{*}_{\Delta\Delta}$	1.6718±0.1294
B_3(n=6)	5.0126±0.4030$^{\Delta\Delta}$	16.9711±1.8686$^{\Delta\Delta}$	1.6503±0.1404

注:与A_3组比较 * P<0.05 * * P<0.01 与C组比较 $\Delta\Delta P$<0.01

光照30分钟(A_2组),视细胞损伤加重,其中锥细胞的损伤较杆细胞重,表现为部份锥细胞内节的高尔基复合体囊泡扩大,排列紊乱(图4),RPE内部份SER扩大融合呈大空泡,Bruch膜局限性断裂。



图1 正常组。视细胞外节膜盘排列整齐(*),锥细胞内节高尔基复合体(Go),杆细胞内节线粒体(Mi),内外节连接区纤毛横断面(↑)×15000



图2 正常组。RPE内SER丰富,基底面许多胞质突起附于基板(⇧),Bruch膜完整(★)×30000

维普资讯 http://www.cqvip.com

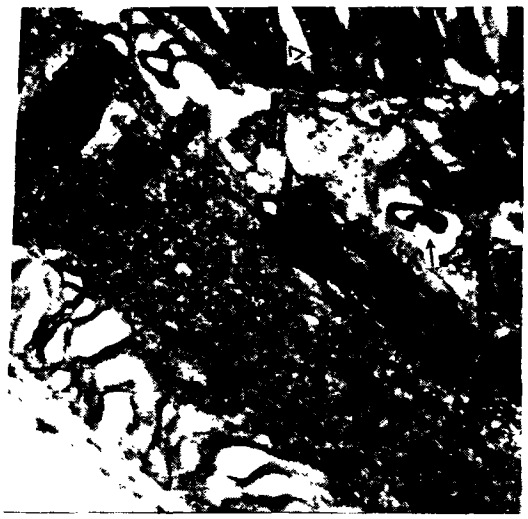


图3 光照15分钟(A_1组)。视细胞膜盘腔扩大(Δ),RPE细胞基底面胞质突起紊乱,质膜局部失去连续性(↑),髓样结构(↑)×15000



图4 光照30分钟(A_2组)。锥细胞内节高尔基复合体囊泡扩大,排列紊乱(↑),髓样结构(↑),杆细胞内节基本正常(Δ)×10000



图5 光照60分钟(A_3组)。锥细胞内节线粒体肿胀(↑),外节崩解消失(↑)×10000



图6 光照60分钟(A_3组)。RPE细胞内SER显著扩张融合为多个大空泡(V),Bruch膜断裂(↑)×10000

光照60分钟(A_3组),损伤进一步加重,大部份锥细胞外节膜盘大片肿胀崩解,有的外节几乎消失,髓样结构多见(图5),RPE内SER形成的大空泡在数量和扩张程度上较前增加,Bruch膜断裂多见(图6)。光照90分钟(A_4组),损伤较前3组重,除以上表现外,细胞内节线粒体内室出现肿胀空化(图7)。

2.1.3 光照60分钟+V_E用药组 电镜下见光照前2小时给药(B_1)组的视细胞超微结构接近正常,仅见个别外节膜盘腔有局限性扩大,与单纯光照60分钟(A_3组)比较有很明显的差别,但RPE内SER的空泡改变仍可见,Bruch膜完整(图8)。光照后1小时给药(B_2)组损伤也较A_3组轻,镜下见少数锥细胞外节膜盘扩大及膜断裂,部份内节线粒体轻度肿胀,RPE内SER的大空泡改变未见减轻,Bruch膜偶见局限性断裂。光照后6小时给药(B_3)组,损伤变化虽较A_3组轻,但比B_2组明显。

2.2 视网膜有关生化成份的变化

2.2.1 单纯光照组 A_1组的视网膜SOD和GSH

维普资讯 http://www.cqvip.com



图7 光照90分钟(A_4组)。锥细胞内节线粒体内室肿胀(↑)。外节膜盘腔扩张,局部崩解(★)×17000



图8 光照前2小时注射V_E(B_1组)。视细胞外节膜盘基本正常,RPE内SER的大空泡改变仍可见(V),Bruch膜完整(↑)×12000

$-P_X$已出现具有统计学意义的明显降低,MDA虽略有增高,但A_1、A_2组与正常组比较无显著差别。随着光照射时间的延长,SOD和GSH－P_X进一步降低,MDA则在A_3、A_4组有明显的升高(表2)。

2.2.2 光照60分钟＋V_E用药组 与A_3组比较,V_E用药各组SOD的含量增加变化无统计学意义。B_1、B_2两组的GSH－P_X明显升高,但未达到正常组水平。MDA只在B_1组其含量明显低于A_3组($P<0.05$)(表3)。

3 讨论

本研究结果显示,手术显微镜光照15分钟即可导致豚鼠视网膜超微结构的明显改变,延长光照时间,视网膜损伤改变程度随之加重。超微结构损伤的主要表现是视细胞外节膜盘腔扩张,盘膜断裂崩解,内节线粒体肿胀,高尔基复合体囊泡扩大,RPE内SER扩张融合形成大空泡以及髓样结构增多等。以上改变皆系生物膜损伤为主的细胞肿胀溶解性病理变化表现,是光照损伤导致膜通透性改变,以及膜内ATP酶受损,钠－钾泵功能障碍,引起水钠潴留的结果。本实验所见两种视细胞中,以锥细胞的损伤较重,文献中也曾见类似报道[5,6],这可能与锥细胞对强光刺激敏感有关。Bruch膜的损伤表现为局限性断裂,此与Tso等报道的光损伤后血－视网膜屏障破坏结果一致。我们认为Bruch膜的断裂损伤是临床上光损伤后眼底荧光血管造影异常的结构改变基础。

本实验有关生化测试结果表明,光照15分钟即有SOD和GSH－P_X的明显降低,且随着光照时间的延长,二者进一步降低而MDA亦有明显升高,这三项指标的变化反映了在视网膜的光损伤中自由基生成增多,脂质过氧化水平增高。此与本实验所见一系列以生物膜损伤为主的超微结构病理改变有密切关系。国内外学者也曾报道在视网膜的各种类型光损伤中,自由基生成增多,脂质过氧化水平提高[7,8,9],皆说明脂质过氧化作用是视网膜光损伤的主要机理。

V_E作为天然的抗氧化剂,对生物膜具有良好的稳定性和强大的抗氧化功能。本实验光照60分钟前后应用V_E的三组中,无论从超微结构还是生化指标方面来看,都说明V_E对视细胞及Bruch膜有不同程度的保护和稳定作用,保护的效果与给药的时间有关,其中以光照前2小时给药效果最好,光照后1小时给药效果次之,光照后6小时给药对损伤虽有一定减轻,但效果比前两组均差。该结果从另一角度进一步支持视网膜光损伤的主要

维普资讯 http://www.cqvip.com

机理－脂质过氧化作用对视细胞的损伤。V_C虽然对视细胞及Bruch膜的光损伤有较明显的保护作用，但是电镜下所见揭示，本文所采用的V_E剂量和给药时间对豚鼠RPE的光损伤无明显保护作用，对此尚需作进一步的研究。

本实验采用的手术显微镜光源照射时间是15－90分钟，此时间阶段也是一般眼科显微手术操作所需的时间。本研究结果提示，临床眼科显微手术时间应尽可能缩短，术中应注意遮盖，减少不必要的照射，术后需注意眼底及视力变化。此外，提倡术前及术后及时给手术病人服用足量的V_E等抗氧化剂，以保护视网膜，避免手术显微镜光源所致的医源性损伤。

参考文献

1.李益新、方允中，刘 智.中国人民解放军军事医学科学院院刊 1984;31:359
2.李益新，方允中.生物化学与生物物理进展 1983;(2):59
3.夏奕明，朱莲珍.卫生研究 1987;16:29
4.李爱群，李 燕，莫简.生物化学与生物物理进展 1987;(6)72
5.Parver LM, Auker CR, Fine BS. Ophthalmology 1983;90:964
6.Tso MOM, Woodford BJ. Ophthalmology 1983;90:952
7.Yamashita H, Horie K, Tamamoto T, et al. Retina 1992;12:59
8.李文松，等.眼底病 1991;7:193
9.李文松，等.眼底病 1993;9:14

(收稿日期 1997－06－16)

Photogenic retinal damage induced by operating microscope and the protective action of vitamin E in guinea－pig－ultrastructural observation and biochemical analysis

Yao Xiaoli, et al
Department of Ophthalmology,College of Clinical Medicine

In order to study the effects of operating microscope on retina and the protective action of vitamin E (VE).

Method The eyes of guinea－pig were exposed to the light of operating microscope in 15、30、60 and 90 minutes,the VE were administrated 2 hours before exposure and 1 or 6 hours after exposure.

Results The results showed that pronounced ultrastructural alteration of retina and distinct decrease in SOD、GSH－P_x were detectecd in the 15－minute exposed group.The ultrastructural damage extent of retina and decrease of SOD, GSH－P_x as well as increase in MDA were paralled to the length of the exposed time.The damage of cone cell was more prominent than rod cell.The protective effectof VE on the visual cell and Bruch's membrane were obvious,and the protective effect of the VE administration 2 hours before exposure were better than 1 and 6 hours after exposure.However,no protective effect was found on retinal pigmental epithalium with the dosage and administration way of VE in this study.

Conclusion The light of operating microscope could induce the photogenic retinal damage.VE was an effective protective medicine for lightinduced retinopathy.

KEY WORDS Retina; Photogenic damage; Vitamin E