DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.06.017

激光视网膜损伤后神经元凋亡及bFGF作用的研究

何春燕* 许立军 王一 钱焕文** (第三军医大学附属西南医院眼科) 重庆,400038

提 要 目的:探讨兔视网膜激光损伤后视网膜神经元凋亡与时间的关系,以及碱性成纤维生长因子(bFGF)对神经元凋亡的影响。方法:应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP-X切口末端标记法(TUNEL法)标记凋亡细胞。结果:伤后6 h、1、3、7 d视网膜各层可见散在分布的TUNEL阳性凋亡细胞,尤以外核层多见。伤后14 d,凋亡细胞数减少,同时外核层厚度降低。伤后眼内给予bFGF,可减少伤后3 d视网膜神经元的细胞凋亡。结论:激光损伤后视网膜神经元的细胞凋亡是造成光感受器细胞丢失的原因之一。bFGF可抑制视网膜神经元的细胞凋亡而维持光感受器细胞的生存,表明bFGF对激光视网膜损伤具有有效的治疗作用。

关键词 视网膜;激光损伤;细胞凋亡;碱性成纤维生长因子(bFGF)
中图法分类号 R779.1;R977.6

随着激光技术的发展和应用,激光对人眼的损伤日益受到重视。研究发现在许多视网膜病变中,视网膜光感受器细胞均发生不同程度的细胞凋亡,并认为这与视功能的损害有关[1~3]。本实验对兔视网膜行YAG激光损伤,观察伤后不同时相点视网膜神经元细胞凋亡的改变,以及眼内给予碱性成纤维生长因子(Basic fibroblast growth factor,bFGF)对视网膜神经元的细胞凋亡有无抑制作用,为探讨激光视网膜损伤的病理机制及其治疗提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及动物模型

1.1.1 实验动物及分组 选用健康无眼病的有色家兔20只,雌雄兼用。体重1.5~2.3 kg。随机分为四组:①正常对照组(2只)。②激光损伤组(12只)。分6 h、1、3、7、14 d 5个时相组。3 d组动物4只,一只用于电镜观察。余各时相组分别为2只。③激光损伤+bFGF治疗组(3只)。④激光损伤+注射用水对照组(3只)。

1.1.2 模型制作 动物麻醉后以调Q倍频YAG激光器双眼致伤。激光器波长:532 nm,照射间期:20 ns,重复频率每秒1次。平均照射能量每次2.82 mJ。每眼照射3次。眼底镜观察到视网膜后极部出血性损伤斑。③组及④组动物于激光损伤后立即眼内注入bFGF 10 μg/20 μl或注射用水20 μl。bFGF由珠海东大生物制药有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 标本取材及切片制作 各组兔于所需时相点麻醉致死,摘除眼球,10%中性福尔马林固定,切取视网膜损伤出血区为中心的全层眼球壁组织4 mm×7 mm,石蜡包埋,4 μm厚切片用于TUNEL染色及光镜观察。3 d组动物一只于伤后3 d处死,摘除眼球。3%戊二醛固定,切取视网膜出血区的全层眼球壁组织2 mm×3 mm,环氧树脂包埋,超薄切片电镜观察。

1.2.2 TUNEL法标记凋亡细胞 石蜡切片60℃烤片30 min,常规脱蜡、水化。蛋白酶K(20 mg/ml)消化15 min,37℃;3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶10 min,37℃;将凋亡试剂盒(宝灵曼公司,德国)的Ⅰ液和Ⅱ液按1∶9比例混匀,覆盖组织孵育90 min,37℃;抗荧光素抗体孵育30 min,37℃。每步骤后均以PBS清洗。DAB液显色,2%甲基绿复染,常规脱水、透明、封片,光镜观察。正常对照:正常兔视网膜切片为正常对照。阴性对照以Ⅱ液代替Ⅰ与Ⅱ的混合液。切片采用计算机图象分析系统处理,测出TUNEL阳性细胞的面积比值(面密度,Area density)作为结果。

1.2.3 统计学分析 结果采用均数间方差分析。

2 结果

2.1 光镜观察

在激光视网膜损伤后6 h、1、3 d视网膜损伤斑最大直径处可见:病灶如丘状隆起,视网膜全层破裂,类似"火山口"样改变。视网膜内及视网膜下大量积血、内界膜破裂,视网膜破裂处见细胞灶性坏死。这与重度激光视网膜损伤的病理改变相符[4]。伤后7、14 d视网膜色素上皮层色素丛生,视网膜破裂处,有少量中性粒细胞浸润,附近视网膜未见炎细胞浸润。

2.2 激光损伤后视网膜神经元的细胞凋亡

激光损伤后6 h、1、3、7、14 d,在视网膜各细胞层(节细胞层、内核层、外核层)均可见TUNEL法标记的凋亡细胞。标记的凋亡细胞核呈棕色,核膜完整,核内断裂的DNA聚集于核膜下,使细胞核呈环形或新月形染色。另一些TUNEL阳性细胞核呈均匀的淡染色。视网膜各层凋亡细胞散在分布,未见炎细胞浸润,见图1。正常对照组,及阴性对照切片均未见TUNEL阳性细胞。

伤后一周内各时相组TUNEL阳性细胞数目相差不显著($P>0.05$)。伤后14 d,视网膜各层TUNEL阳性细胞数目明显减少($P<0.01$),见图2,同时外核层厚度变薄,见表1。

* 何春燕,女,31岁,主治医师,硕士
** 军事医学科学院放射医学研究所激光室 北京,100000

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

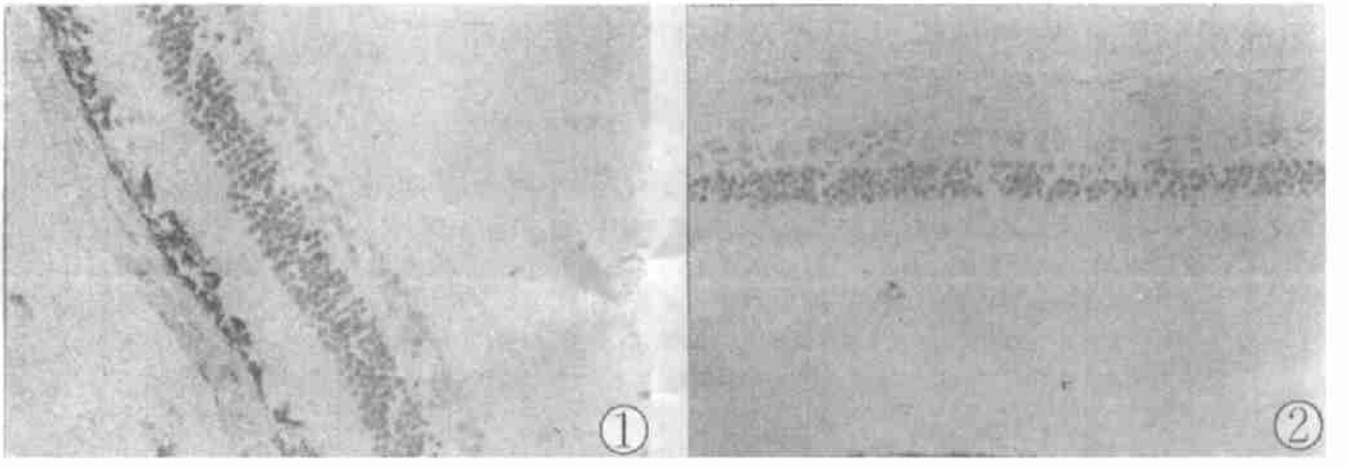


图1 伤后3 d，视网膜各层散在分布的TUNEL阳性细胞，以外核层多见，未见炎细胞浸润 (×400)

Fig 1 TUNEL positive cells located in all retinal layers, mostly in the out nuclear layer and no inflammatory cells were seen 3 d after injury (×400)

图2 伤后14 d，TUNEL阳性细胞减少，外核层厚度变薄 (×400)

Fig 2 TUNEL positive cells reduced and the thickness of out nuclear layer decreased 14 d after injury (×400)

表1 激光视网膜损伤组不同时相点TUNEL阳性细胞变化($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Tab 1 Changes of TUNEL positive cells in different time after laser injury group($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

	Time after injury				
	6 h	1 d	3 d	7 d	14 d
Area density ($\times10^{-2}$)	5.78±1.12**	7.13±1.73**	7.03±1.27**	6.25±1.25**	2.67±0.55
Thickness of out nuclear layer(μm)	5.14±0.26**	5.59±0.52**	5.75±0.67**	4.48±0.51*	3.52±0.39

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 14 d after injury

伤后给予bFGF治疗的视网膜各层见散在分布的TUNEL阳性细胞，以外核层多见，见图3。与同时相损伤组及治疗对照组相比，TUNEL阳性细胞数目明显减少($P<0.01$)，相差非常显著，而外核层厚度无明显改变($P>0.05$)。治疗对照组TUNEL阳性细胞与损伤组相差不显著($P>0.05$)，见表2。

表2 伤后3 d各组TUNEL阳性细胞变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 2 Changes of TUNEL positive cells in different groups 3 d after injury($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

	Injury	Control	Treatment
Area density($\times10^{-2}$)	6.87±1.05**	5.92±1.60**	1.35±0.97
Thickness of out nuclear layer(μm)	5.61±0.59	5.67±0.56	6.34±0.42

**: $P<0.01$ *vs* treatment group

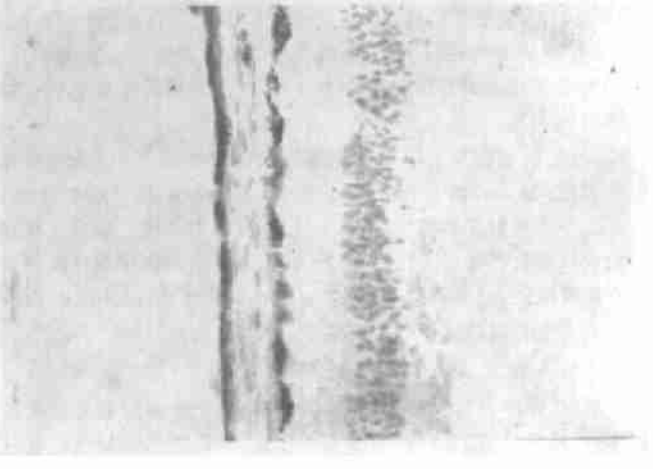


图3 伤后5 d，治疗组视网膜可见少量的TUNEL阳性细胞 (×400)

Fig 3 Few TUNEL positive cells may be found in the retina of treatment group 3 d after injury (×400)

2.3 电镜分析

伤后3 d，电镜见视网膜外核层有大量染色质浓缩凝集的光感受器细胞。其细胞膜完整，胞浆结构不清，个别光感受器细胞核染色质分散成块状边集，核膜皱缩有切迹，见图4。一些光感受器细胞内节消失，内节线粒体发生肿胀，呈空泡样变性。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

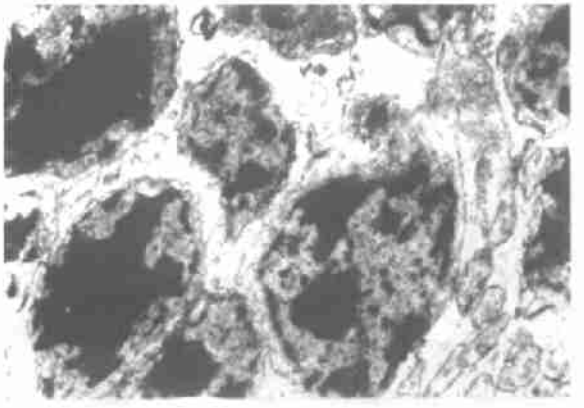


图 4　伤后 3 d 视网膜外核层可见大量核固缩的细胞核　(EM×800)

Fig 4　Many condensed nuclei may be found in the out nuclear layer of retina　(EM×800)

3　讨论

细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种细胞死亡形式，具有独特的形态学特征和生化特征。采用 TUNEL 技术，可特异地在细胞水平原位显示凋亡细胞断裂的 DNA 链，从而可在光镜下识别凋亡细胞[5]。实验中观察到 TUNEL 阳性细胞分布于激光损伤后的视网膜各层，以外核层最多。阳性细胞核内断裂的 DNA 呈环形或新月形棕色染色聚集于核膜下，部分阳性细胞核呈均匀的淡着色。细胞无肿胀现象，周围组织无炎症反应。电镜见视网膜各层大量的核固缩或染色质凝聚边集的细胞核。这些细胞形态、生化改变呈现出特异的凋亡细胞形态学特征。

研究表明，在同一病理因素下，组织细胞既可发生细胞坏死也可发生细胞凋亡改变。如中枢神经系统的缺血性损伤[6]、视网膜的缺血性损伤[7]都同时存在两种细胞死亡形式。细胞是发生凋亡还是坏死与损伤时间、强度和部位有关。体外将猪的 P-815 细胞加热到 43～44℃ 则引起细胞凋亡改变，而加热到 46～47℃，则引起大量细胞坏死[8]。本实验中视网膜破裂处可见局灶性细胞坏死，而附近的视网膜细胞主要发生凋亡，这可能与激光损伤中心能量密度最高而附近视网膜能量逐渐减低有关。激光损害视网膜的面积与能量的吸收有关[9]。本实验激光每次平均照射能量为 2.82 mJ，造成视网膜重度损害，光斑直径大小平均为 2 mm，而在出血斑附近 2～3 mm 的视网膜仍观察到有神经元细胞的凋亡，表明重度激光视网膜的损伤面积远大于光斑面积。如能减少损伤中心附近区域视网膜的神经元凋亡，则可缩小损伤面积，有效地保存视功能。

实验结果表明，伤后一周内各时相点观察到视网膜各层有较多的凋亡细胞，伤后 14 d 视网膜各层凋亡细胞数目均明显减少，同时外核层厚度减低。外核层细胞凋亡改变是导致光感受器细胞丢失的原因之一。

细胞凋亡被认为是基因指导的细胞死亡活动，一些基因及生长因子对细胞凋亡具有调控作用。bFGF 具有抑制细胞凋亡作用，有报道视网膜变性的鼠，经早期给予 bFGF，可减少其光感受器细胞的凋亡[10]。眼科研究表明：bFGF 广泛分布在眼组织中，利用分子原位杂交技术发现多种视网膜细胞具有编码 bFGF mRNA 功能[11]。并且 bFGF 参与维持视网膜色素上皮细胞的形状及分裂活性，缺乏 bFGF 可引起顺行性营养性神经细胞死亡[12]。因此，bFGF 可由视网膜多种细胞分泌并对维持眼组织正常生理功能起着重要作用。实验中伤后早期给予外源性 bFGF，伤后 3 d 观察到视网膜神经元的凋亡少于同时相损伤组及治疗对照组，而外核层厚度无明显改变，说明 bFGF 具有维持视网膜神经元细胞生存及阻止神经元细胞凋亡的作用，提示 bFGF 对激光视网膜损伤具有有效的治疗作用。

参考文献

1　Shahinfar S, Edward D P, Tso MO. A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury. Curr Eye Res, 1991, 10(1): 47

2　Smith S B, Bora N, Meeol D, *et al*. Photoreceptor cells in the vitiligo mouse die by apoptosis: TRPM-2/clusterin expression is increased in the neural retina and in the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(11): 2193

3　Cook B, Lewis G R, Fisher S K, *et al*. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(6): 990

4　蔡用舒 主编. 创伤眼科学. 北京：人民军医出版社，1988. 493～494

5　Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol, 1992, 119(3): 493

6　Yi L, Sharov V G, Jiang N, *et al*. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. Am J Pathol, 1995, 146(5): 1045

7　Buchi E R. Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischemia-reperfusion insult: an electron microscope study. Exp Eye Res, 1992, 55(4): 605

8　Harmon B V, Corder A M, Collins R J, *et al*. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42～47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. Int J Rad Biol, 1990, 58(5): 845

9　曲治华，王朝清 编著. 激光对人眼的有害作用和防治措施. 北京：人民卫生出版社，1985. 68～69

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

10 Rakoczy P E, Humphrey M F, Cavaney D M, *et al*. Expression of basic fibroblast growth factor and its recepor in the retina of Royal college surgeons rats: A comparative study. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(7): 1845
11 Noji S, Matsuo T, Koyama E, *et al*. Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. Biochem Biophys Res Commum, 1990, 168(1): 343
12 Peter W. 视网膜病中的生长因子. 国外医学眼科学分册, 1993, 17(1): 38

(收稿: 1998-09-15; 修回: 1999-05-12)
(编辑 冷怀明)

Study of the therapeutic effects of basic fibroblast growth factor on laser-induced apoptosis of retinal neurons in rabbits

He Chunyan, Xu Lijun, Wang Yi, Qian Huanwen (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To study the laser-induced apoptotic changes of retinal neurons and the therapeutic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the changes. **Methods**: A YAG laser was used to produce retina lesion in pigmented rabbits. Terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP and nick labelling (TUNEL) staining was used to identify the apoptotic neurons. **Results**: TUNEL positive apoptotic neurons were located in all the layers of retina in the 6th hour and on the 1st, 3rd, and 7th day after injury. Apoptotic cells reduced in number on the 14 th day after injury. The TUNEL positive cells were more densely located in the out nuclear layer. After the administration of bFGF, the apoptosis of retinal neurons was attenuated and their number reduced. **Conclusion**: Laser induces apoptosis of retinal neurons and reduces the number of photosensitive cells in the retina. bFGF can inhibit the laser-induced apoptosis of retinal neurons and sustain their viability.

Key words retina; laser injury; apoptosis; basic fibroblast growth factor

前路减压治疗胸腰椎骨折截瘫15例

Treatment of 15 cases of paralysis caused by thoraco-lumbar vertebral fracture with anterior depression

李永恒* 杜全印 (第三军医大学附属大坪医院骨科) 重庆, 400042

在脊柱损伤中, 胸腰椎骨折合并截瘫较为常见, 在治疗过程中, 恢复脊柱的解剖结构, 正常的生理曲线及椎管的容积, 牢固地稳定脊柱是主要问题[1~2]。1997~1998年, 我院对胸腰椎爆裂性骨折或骨折脱位合并有截瘫的15例患者采用前路减压, 椎体间植骨, Kaneda钉内固定治疗, 取得较好的临床效果, 报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

15例中, 男11例, 女4例。年龄最大44岁, 最小24岁。受伤方式: 高处坠下3例, 弯腰作业高处落物致伤8例, 交通事故4例。损伤节段: 胸$_{11}$ 2例, 胸$_{12}$ 3例, 腰$_1$ 7例, 腰$_2$ 3例。骨折类型: 爆裂性骨折8例, 屈曲压缩骨折并有碎片突向椎管内3例, 骨折脱位4例。15例均合并有脊髓损伤, 其中完全性瘫痪6例, 不完全性瘫痪9例。受伤至手术时间: 1周内12例, 2周内3例。

* 李永恒, 男, 36岁, 主治医师, 学士, 现在达川地区第二人民医院骨科 达川, 635000

1.2 手术方式

胸$_{12}$以上采取剖胸入路, 腰$_1$以下采取经胸廓内、胸膜外、腹膜后入路。病人全麻后90度侧卧位, 手术侧选椎体破坏较重的一侧, 或下肢瘫痪较重的一侧, 伤椎置腰桥部位并稍垫高。手术进入后切开肋膈角部膈肌, 显露伤椎, 分离并结扎伤椎及上下各一椎体的节段血管。以伤椎为中心切除上下之椎间盘组织, 由此尽可能迅速切除伤椎, 向后达横突, 显露椎间孔前缘, 并细心切除突向椎管内的骨碎片, 椎间盘等组织, 显露并见硬脊膜前方为止。对未破裂的此时可见明显搏动, 探查上下椎管, 并冲洗清除周围血肿。椎体对侧及前侧保留部分骨组织, 于伤椎上下之椎体中心部位开槽约1 cm以上, 整复椎体高度, 取一髂骨打磨成长条状嵌入椎间隙, 并用Kaneda钉固定伤椎间隙及上下椎, 创面止血后, 关闭切口。经胸入路保留闭式引流, 经胸廓内胸膜外, 腹膜后途径留橡皮管负压引流。

2 结果

2.1 重建稳定性

15例患者均行脊柱前路伤椎椎体, 上下椎间盘切除, 完整

(下转439页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net