

脾虚气弱对兔视网膜脱离复位后双极细胞及节细胞变化的影响

张妍春¹ 陈明霞² 毕春潮¹ 杨新光¹ 朱赛林³ 李亚芙⁴

【摘要】目的 观察脾气虚型兔视网膜脱离(RD)自动复位后双极细胞及节细胞超微结构的改变。**方法** 将 28 只健康成年新西兰灰兔随机分为 RD 自动复位组(A 组)、脾气虚型 RD 自动复位组(B 组)及对照组(C 组),采用耗气破气加饥饱失常法建立脾气虚证动物模型,在显微镜下行视网膜下注射透明质酸钠术建立视网膜脱离自动复位动物模型,用透射电镜分别观察 A 组及 B 组双极细胞及节细胞结构,比较术后 10 天、20 天、30 天双极细胞及节细胞超微结构变化。**结果** B 组双极细胞及节细胞超微结构改变较为严重且恢复缓慢。**结论** 脾气虚证对 RD 复位后内核层及节细胞结构的恢复有严重的不良影响,可影响视功能的提高。

【关键词】 脾气虚证;视网膜脱离;双极细胞及节细胞;透射电镜

中图分类号:R774.1*2;R285.5 文献标识码:A 文章编号:1002-4379(2009)06-0323-04

Changes of retinal bipolar cells and ganglion cells' ultrastructure in reattached retina of spleen-qi deficiency rabbit model ZHANG Yanchun, CHEN Mingxia, BI Chunchao, et al. Ophthalmology Department, No.4 Xi'an Hospital, Xi'an 710004, Shan'xi, China

【Abstract】OBJECTIVE To observe the changes of retinal bipolar cells and ganglion cells' ultrastructure in reattached retina of spleen-qi deficiency rabbit model. **METHODS** Twenty-eight rabbits were randomly divided into experimental groups and control group. The models of spleen-qi deficiency syndrome were induced by exhausting and breaking the spleen-qi with potent Chinese herbal drugs and abnormally starving and satisfying the rabbits. Then the rabbits' eyes were operated to produce the model of retinal detachment by infusion of sodium hyaluronate between the neurosensory retina and the pigment epithelium. Electron microscopy was used to observe the retinal bipolar cells and ganglion cells of reattached retina on the 10, 20 and 30 postoperative days. **RESULTS** There were serious pathologic changes and a slow recovery on the retinal bipolar cells and ganglion cells of spleen-qi deficiency group. **CONCLUSIONS** The pathological changes of spleen-qi deficiency syndrome aggravated the serious injury of retinal bipolar cells and ganglion cells on reattached retina, consequently badly infected visual function recovery.

【Key words】 the pathological state of spleen-qi deficiency; retinal detachment; retinal bipolar cells and ganglion cells; electron microscopy

中医传统观念认为脾气虚是引起视网膜脱离的一个重要因素,本研究采用“病证结合”的研究思路进行动物实验,用透射电镜观察脾气虚证对视网膜脱离自动复位后视网膜双极细胞及节细胞超微结构的影响。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组

基金项目:西安市科技计划项目资助(项目编号 GG05138)

作者单位:1 西安市第四医院眼科,西安 710004

2 西安交通大学医学院电镜室

3 西安古城眼科医院

4 西安市第四医院检验科

通讯作者:张妍春, E-mail: zhangyanchun1239@sohu.com

健康成年清洁级新西兰灰兔(2000~2500g)28 只,雌雄不拘,经裂隙灯、眼底镜检查眼前节及眼底均无异常,实验动物及实验室均由第四军医大学动物实验中心提供。将 28 只实验兔随机分为 3 组, RD 自动复位组(A 组)兔 12 只;脾气虚型 RD 自动复位组(B 组)兔 14 只(2 只实验过程中死亡)、空白对照组(C 组)兔 2 只。分别在建立 RD 自动复位模型手术后第 10 天、20 天、30 天,将 A、B 组兔处死并摘取眼球(每组兔各阶段处死 4 只);C 组兔 2 只在实验结束时处死取材。

1.2 造模方法

1.2.1 脾气虚动物模型的制备: 本实验使用陈小野

提出的耗气破气加饥饱失常脾气虚证动物模型制备方式^[1],共造模 42 天。

1.2.2 RD 自动复位动物模型的制备:于脾气虚证动物模型造模第 22 天制备。使用先前的方法造 RD 自动复位动物模型^[2]。

1.3 观察指标及测试方法

1.3.1 宏观指标及检测方法:在造模和恢复过程中观测兔子的精神、体重、肛温、食量、大便及小便、舌象等宏观体征指标。

1.3.2 血清 D-木糖监测方法:分别在手术前,手术后 10、20、30 天于清晨喂食颗粒饲料 30g/kg 体重后 2 小时自耳源静脉抽取静脉血约 3ml,3500r/min 高速离心 10 分钟后取血清当天进行检测;血清 D-木糖的测定采用间苯三酚法。

1.3.3 眼底检查:造模后用直接检眼镜于术后每天观察并记录眼底视网膜脱离的范围、视网膜隆起的高度、裂孔大小、自动复位时间、视网膜出血情况和玻璃体反应等情况。

1.3.4 电镜样品的制作:在预定的实验期满后,采用耳缘静脉注射过量 3%戊巴比妥钠处死实验兔,即刻摘取眼球,快速全周剪除角膜,将左眼置于 2.5%戊二醛固定液中 4℃固定 24 小时后,取出眼球沿视神经水平切开,再沿矢状轴经视神经鼻侧 2mm 处切开,切取鼻下方近后极部视网膜约 2×3mm³ 条形组织,经 0.1M 磷酸缓冲液浸洗后,1%四氧化锇固定液 4℃后固定,0.1M 磷酸缓冲液浸洗,乙醇梯度脱水,环氧树脂 Epon812 浸透、包埋,聚合后做半超薄切片 1~2μm,美兰染色后光镜下定位,选择视网膜结构完整的包埋块,经瑞典 LKB-V 型超薄机切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色后,日本日立 H-600 透射式电子显微镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 宏观指标检测结果

制备脾气虚证模型过程中,造模开始后 1 周实验兔出现纳食量减少、精神萎靡、蜷缩嗜卧、拱背、受惊时无神、软便、体重减轻、毛色枯黄等脾气虚证一般症状体征,10 天后出现耳尾色白、体温升高、舌质淡嫩、少苔,2 只兔便溏剧烈,于第 11 天死亡。停止脾气虚造模因素后观察到该组兔软便持续存在,毛色灰白、体重减轻、精神倦怠等脾气虚证一般症状体征持续至实验结束。术前脾气虚组 D-木糖值均明显降低,术后仍维持在较低水平,停止造气虚模型后有所恢复,但仍低于 RD 组($P<0.01$)。

2.2 眼部检查情况

2.2.1 手术过程中见:手术过程中有 4 只眼在视网膜上造孔时发生视网膜表面少量出血平铺于视网膜前,未进入玻璃体;1 只眼眼压暂时升高,角膜水肿,术后 1 小时消失。

2.2.2 手术后观察:术后第 1 天观察所有实验眼角膜均透明、前房清亮、晶体透明,2 只眼玻璃体内可见少量絮状混浊,其余玻璃体无混浊,直接检眼镜下视网膜均呈灰白色隆起 4~5D,范围达 50%~60%,裂孔约 1~2PD 大小,均位于鼻下方近赤道部。视网膜前积血吸收较快,3~4 天完全吸收。大部分模型眼 RD 维持 6~10 天后视网膜自动复位,平均 8.7 天。通过眼底彩照、B 超、OCT 检查均证实 RD 存在且脱离发生的组织解剖结构与临床一致。

2.3 透射电镜检查结果

2.3.1 正常对照组:电镜下视网膜由外向内可见色素上皮细胞层、视细胞层、双极细胞层和神经节细胞层。双极细胞的双极细胞核呈圆形,核内染色质分布均匀,核仁明显,核周有少量的细胞质成分,细胞质内可见到线粒体、粗面内质网、核糖体及高尔基体等结构,双极细胞间可见到形状不规则的 Müller's cell,其突起较长(图 1);神经节细胞体积较大,细胞核为圆形或多角形,核仁明显,细胞质内含有丰富的粗面内质网,线粒体数量较多,核糖体分散在细胞质中,高尔基体发达^[3](图 2)。

2.3.2 术后 10 天:A 组:部分双极细胞核形状不规则,体积缩小,核内染色质团块状凝集;细胞质内细胞器肿胀、部分胞质缺失,Müller's cell 突起基本完好(图 3);神经节细胞肿胀,细胞质内粗面内质网池样扩张,线粒体肿胀成空泡状,细胞核染色质缺失,电子密度降低(图 4)。B 组:双极细胞肿胀较 A 组明显,核内染色质呈块状凝集,细胞质成分溶解,大部分细胞器消失,Müller's cell 电子密度增加(图 5);节细胞也有明显肿胀,细胞核电子密度降低,细胞质内细胞器减少,粗面内质网呈池样扩张,且有脱颗粒现象,线粒体肿胀、嵴消失,形成空泡样结构(图 6)。

2.3.3 术后 20 天:A 组:双极细胞层细胞数量较少,部分双极细胞仍呈肿胀状,细胞核内染色质轻度凝集,细胞器数量较少,部分细胞可见核周间隙增大,Müller's cell 数量不多(图 7);部分神经节细胞肿胀,细胞质内粗面内质网轻度扩张,线粒体轻度肿胀。B 组:双极细胞体积较大,数量不多,细胞轻度肿胀,细胞质内可见灶状空白区,细胞核内染色质轻度凝集,Müller's cell 略多,电子密度较高(图 8);节细

胞肿胀明显, 细胞器减少, 多数线粒体肿胀成空泡状, 粗面内质网扩张; 细胞核内染色质稀疏, 电子密度较低, 细胞结构较 A 组差。

2.3.4 术后 30 天:A 组: 少部分双极细胞仍肿胀, 细胞质内可见到肿胀的线粒体; 大部分节细胞结构正常, 细胞器丰富, 细胞核内染色质分布均匀, 部分节细胞内线粒体肿胀呈空泡状(图 9)。B 组: 双极细胞

仍有部分肿胀, Müller's cell 数量增多; 节细胞内细胞器较 A 组增多, 细胞质内仍有肿胀的线粒体, 粗面内质网轻度扩张, 细胞核内染色质分布均匀(图 10)。

3 讨论

视网膜脱离的先兆症状为闪光幻视, 属中医学神光自现范畴, 脱离部位影响至后极部者, 可以骤然

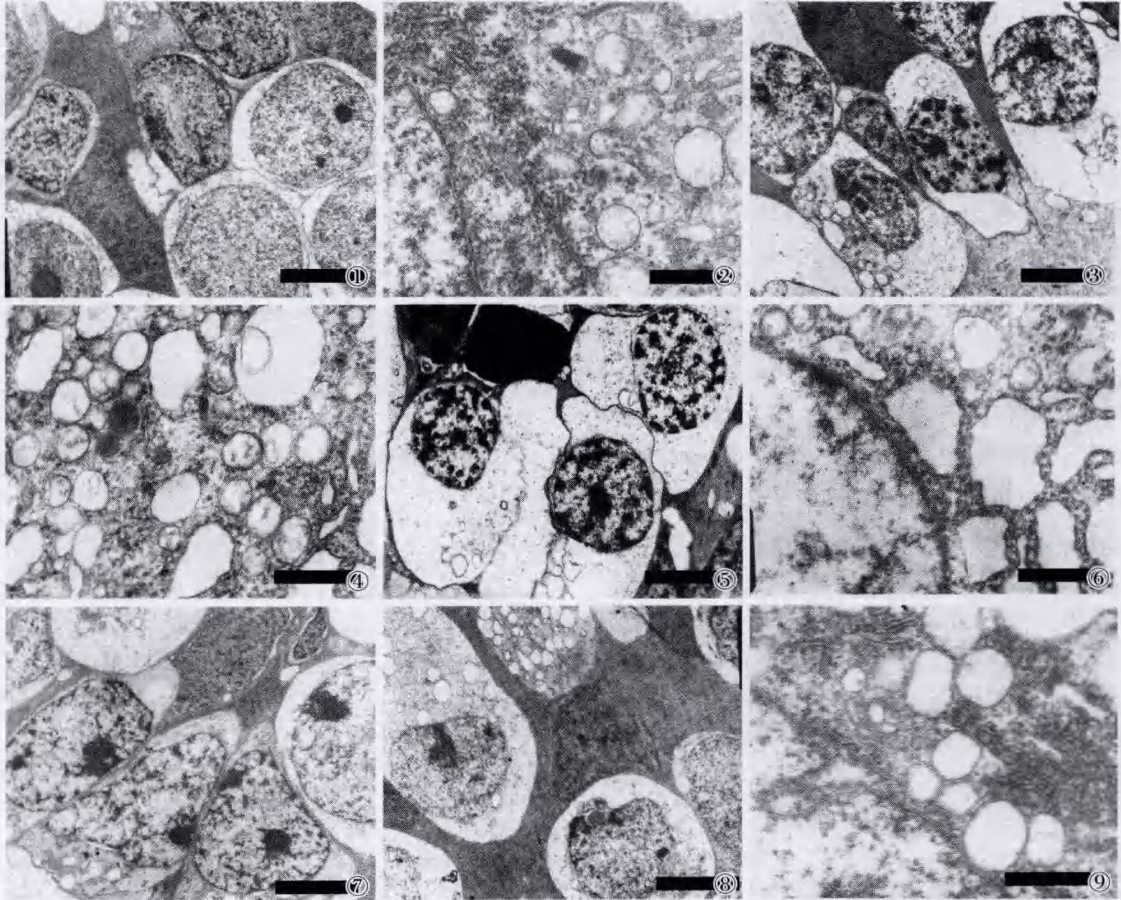


图 1 正常对照组: 双极细胞核内染色质分布均匀, 核仁明显, 核周有少量的细胞质成分, 细胞质内可见到线粒体、粗面内质网、核糖体及高尔基体等结构, 双极细胞间可见到形状不规则的 Müller's cell, 其突起较长。Bar=4 μ m。图 2 正常对照组: 神经节细胞体积较大, 细胞核为圆形或多角形, 核仁明显, 细胞质内含有丰富的粗面内质网, 线粒体数量较多, 核糖体分散在细胞质中, 高尔基体发达。Bar=1 μ m。图 3 RD 维持 6 天, 术后 10 天(6/10) A 组: 部分双极细胞核形状不规则, 体积缩小, 核内染色质团块状凝集; 细胞质内细胞器肿胀、部分胞质缺失, Müller's cell 突起基本完好。Bar=4 μ m。图 4 RD 维持 6 天, 术后 10 天(6/10) A 组: 神经节细胞肿胀, 细胞质内粗面内质网池样扩张, 线粒体肿胀成空泡状, 细胞核染色质缺失, 电子密度降低。Bar=1 μ m。图 5 RD 维持 4 天, 术后 10 天(4/10) B 组: 双极细胞肿胀明显, 核内染色质呈块状凝集, 细胞质成分溶解, 大部分细胞器消失, Müller's cell 电子密度增加。Bar=4 μ m。图 6 RD 维持 4 天, 术后 10 天(4/10) B 组: 节细胞明显肿胀, 细胞核电子密度降低, 细胞质内细胞器减少, 粗面内质网呈池样扩张, 且有脱颗粒现象, 线粒体肿胀、嵴消失, 形成空泡样结构。Bar=1 μ m。图 7 RD 维持 6 天, 术后 20 天(6/20) A 组: 双极细胞层细胞数量较少, 部分双极细胞仍呈肿胀状, 细胞核内染色质轻度凝集, 细胞器数量较少, 部分细胞可见核周间隙增大, Müller's cell 数量不多。Bar=4 μ m。图 8 RD 维持 8 天, 术后 20 天(8/20) B 组: 双极细胞体积较大, 数量不多, 细胞轻度肿胀, 细胞质内可见灶状空白区, 细胞核内染色质轻度凝集, Müller's cell 略多, 电子密度较高。Bar=4 μ m。图 9 RD 维持 8 天, 术后 30 天(8/30) A 组: 大部分节细胞结构正常, 细胞器丰富, 细胞核内染色质分布均匀, 部分节细胞内线粒体肿胀呈空泡状。Bar=1 μ m。图 10 RD 维持 8 天, 术后 30 天(8/30) B 组: 节细胞细胞质内仍有肿胀的线粒体, 粗面内质网轻度扩张, 细胞核内染色质分布均匀。Bar=1 μ m。

失明,属中医暴盲范围。多因肝肾亏虚、脾虚气弱、气阴两亏而目失所养,或脾肾两亏,水液失常,上犯目窍所致。对视网膜脱离的病机认识是因虚致实的虚实夹杂证,气血阴虚为本,血瘀、湿浊、火热、肝郁为标,病变涉及脾肝肾。视网膜脱离的病机复杂,诸病理因素互为因果^[4-8]。这一认识与现代医学认为视网膜脱离的发生与玻璃体及视网膜的退行性改变密切相关的观念有高度的一致性。金元以后,由于理论和实践的真正融合和统一,证候学说成为中医学的核心内容。通过证病结合的动物实验进行观察研究,可以帮助我们从中医学传统观念的角度分析“脾气虚证”这一病理状态对视网膜脱离自动复位后恢复的影响。

在视网膜脱离和复位的研究中,光感受器-视网膜色素上皮界面一直是人们关注的。这是由视网膜脱离发生在神经上皮层与色素上皮层之间以及色素上皮细胞的重要生理功能所决定的。随着研究的深入,双极细胞及节细胞层的变化逐渐被人们所认识。发现视网膜脱离复位后伴随着视网膜上光感受器外节的不完全再生,三级神经元中的双极细胞、神经节细胞以及神经纤维层亦有不可逆的变化,从而影响视信息在传导通路上的传导及术后视功能的恢复^[9,10]。

本实验结果表明,与视网膜脱离自动复位组相比,脾气虚证型网脱复位组视网膜双极细胞层及节细胞层表现的病理改变更为严重且恢复缓慢,透射电镜下观察其细胞超微结构病理改变发现,气虚组早期双极细胞核内染色质团块致密,出现染色质凝集、核固缩,节细胞明显肿胀,细胞核电子密度降

低,细胞质内细胞器减少,粗面内质网呈池样扩张。至术后 30 天双极细胞仍有肿胀。表明在脾气虚证这一病理状态对视网膜脱离复位后视网膜内层细胞的恢复产生明显的不可逆影响,这将肯定不利于视功能的恢复。提示在研究中药对视网膜脱离术后视功能恢复作用的研究中,应注意机体整体因素的影响。

参考文献

- 1 陈小野.实用中医证候动物模型学[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993.184-189.
- 2 王卉芳,张妍春,朱赛林,等.实验性网脱复位后未脱离区域视网膜组织形态学观察[J].陕西医学杂志,2006,35(8):954-956.
- 3 钟慈声.细胞和组织的超微结构[M].北京:人民卫生出版社,1981.190-196.
- 4 俭 喧,邹菊生,和营清热,温阳利水法治疗视网膜脱离术后水肿不退[J].中西医结合眼科杂志,1997,15(2):101-102.
- 5 温暖荣.生麦散加味在视网膜脱离术后的应用 [J].江西中医药,1994,25(增刊):113.
- 6 黄 嵩.视网膜脱离的辨证治疗[J].辽宁中医杂志,2002,29(10):606.
- 7 胡月英.视网膜脱离术后中药治疗[J].中西医结合眼科杂志,1994,(3):176-177.
- 8 张仁俊.视网膜脱离手术配合中药治疗的疗效分析[J].中国中医眼科杂志,2000,10(3):164-165.
- 9 GP Lewis, DG Charteris, C S Sethi, et al. Animal models of retinal detachment and reattachment: identifying cellular events that may affect visual recovery[J].Eye,2002,16(4):375-387.
- 10 孙晓东,张 哲,俞 彰,等.实验性视网膜脱离复位后视网膜超微结构观察[J].眼科研究,2001,19(4):326-329.

(收稿日期:2009-08-24)

• 临床研究 •

自体角膜缘干细胞移植术联合中药治疗翼状胬肉疗效观察

彭 华 曹雪川

【摘要】目的 探讨自体角膜缘干细胞移植术联合中药治疗翼状胬肉的临床疗效。**方法** 将 60 例(75 眼)翼状胬肉患者随机分为研究组 30 例(38 眼)和对照组 30 例(37 眼),两组均采用自体角膜缘干细胞移植术治疗,研究组加服自拟中药 30 天,跟踪随访 6~24 个月,观察两组的疗效及中药对抑制胬肉生长的效果。**结果** 研究组总治愈率 96.7%,对照组总治愈率 76.7%,研究组临床疗效明显优于对照组,差异有统计学意义($\chi^2=5.19, P<0.05$)。**结论** 自体角膜缘干细胞移植术联合中药治疗翼状胬肉能明显提高临床疗效。

【关键词】翼状胬肉;干细胞移植;中药

中图分类号:R777.34 文献标识码:A 文章编号:1002-4379(2009)06-0326-03

作者单位:云南省中医医院,昆明 650200

通讯作者:彭华,E-mail:penghua17@126.com