

· 实验研究 ·

不同眼内灌注液对视网膜组织学及功能的影响

朱莉 苗恒 胡钦瑞 刘志明 白玉婧 虞有智 傅亚飞 夏会卡 黄旅珍 齐赞 邓洵
李岩 黎晓新

北京大学人民医院眼科 眼视光中心 眼病与视光医学研究所 视网膜脉络膜疾病诊治研究
北京市重点实验室 北京大学医学部眼视光学院 100044

通信作者:黎晓新,Email:drlixiaoxin@163.com

【摘要】 目的 比较不同眼内灌注液对视网膜组织学及功能的影响。方法 取人角膜内皮细胞(HCEC)、人视网膜色素上皮(HRPE)细胞和大鼠视网膜神经节细胞(RGC),分为正常对照组、平衡盐灌注液(BSS)组和复方电解质眼内灌注液(CEIS)组,分别在含体积分数 10% DMEM/F12 培养基、BSS 和 CEIS 中培养 12、24、48 h,采用细胞计数试剂盒 8(CCK8)法测定培养细胞的增生 A 值;采用细胞免疫荧光染色法检测培养细胞中凋亡相关蛋白表达;采用流式细胞术测定细胞凋亡率和细胞周期;采用乳酸脱氢酶(LDH)和琥珀酸脱氢酶(SDH)定量检测试剂盒检测细胞线粒体损伤。选用新西兰大耳白兔 15 只,采用抽签法随机分为对照组 3 只、BSS 组 6 只和 CEIS 组 6 只,均取左眼行玻璃体切割术,术中根据分组方法分别采用不同的眼内灌注液。分别于术前和术后 24 h 采用闪光视网膜电图(ERG)测定术眼视网膜功能,采用光相干断层扫描(OCT)检测实验眼视网膜各层结构变化。收集各时间点术眼眼球,采用 TUNEL 染色法检测视网膜各层细胞的早期凋亡情况;采用免疫组织化学染色法检测视网膜组织中细胞色素 C 和 bax 蛋白表达情况;透射电子显微镜下观察实验眼视网膜超微结构变化。结果 BSS 组和 CEIS 组 3 种培养细胞均有不同程度的损伤,随培养时间延长,细胞增生减少,凋亡细胞数量增加;与 BSS 组相比,CEIS 组培养细胞排列致密整齐,细胞形态和大小均一。BSS 组 HRPE 细胞和 RGC 的细胞凋亡率分别为(37.157±6.918)%和(29.993±12.330)%,明显高于 CEIS 组的(4.163±1.310)%和(6.337±1.903)%,差异均有统计学意义($P=0.003, 0.045$)。正常对照组、BSS 组和 CEIS 组间 HCEC 和 HRPE 细胞的 G0/G1+S 期比例总体比较,差异均无统计学意义(HCEC: $F=2.226, P=0.189$;HRPE: $F=2.634, P=0.151$);BSS 组 RGC 的 G2/M 分裂阻滞期比例高于正常对照组和 CEIS 组,差异均有统计学意义($P=0.047, 0.024$)。各培养时间点 CEIS 组 HCEC、HRPE 细胞和 RGC 的增生 A 值均明显高于 BSS 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。BSS 组各细胞中细胞色素 C、bax、caspase-3 和 caspase-9 荧光强度强于正常对照组和 CEIS 组,bcl-2 荧光强度弱于 CEIS 组,闭锁小带蛋白(ZO-1)荧光强度弱于正常对照组和 CEIS 组。不同时间点 BSS 组各细胞 LDH 释放水平均明显高于 CEIS 组(均 $P<0.001$);培养 48 h 时,BSS 组各细胞 SDH 释放水平高于 CEIS 组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。2 个组兔眼玻璃体切割术后 OCT 检查均未见视网膜组织学异常,但透射电子显微镜检查显示 2 个组术后均出现不同程度的视网膜感光层细胞排列疏松、光感受器外节膜盘大量脱落、空泡变性等,以 BSS 组更为严重。TUNEL 染色显示术后凋亡细胞主要位于视网膜内核层和 RGC 层,BSS 组视网膜细胞凋亡数为(135.2±22.8)个/高倍视野,明显高于 CEIS 组的(81.3±17.7)个/高倍视野,差异有统计学意义($t=4.175, P=0.002$)。全视野闪光 ERG 检查显示,CEIS 组术眼术后 24 h 暗视 3.0 ERG a 波、b 波振幅较术前有所下降,但差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),BSS 组术眼术后 24 h 暗视 3.0 ERG a 波、b 波振幅较术前显著下降,差异均有统计学意义($P=0.026, 0.010$)。结论 与 BSS 比较,玻璃体切割术中眼内灌注 CEIS 在体内、体外实验中对视网膜组织和功能损伤均较小。

【关键词】 玻璃体切割术;灌注液;细胞活性;视网膜功能;细胞凋亡;氧化应激

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2011CB510200);国家自然科学基金项目(81670870)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200810-00575

Comparison of the effects of different intraocular infusion solutions on histology and function of retina

Zhu Li, Miao Heng, Hu Qinrui, Liu Zhiming, Bai Yujing, Yu Youzhi, Fu Yafei, Xia Huika, Huang Lvzhen, Qi Yun, Deng

Xun, Li Yan, Li Xiaoxin

Department of Ophthalmology, Peking University People's Hospital, Eye Diseases and Optometry Institute, Beijing Key Laboratory of Diagnosis and Therapy of Retinal and Choroid Diseases, College of Optometry, Peking University Health Science Center, Beijing 100044, China

Corresponding author: Li Xiaoxin, Email: drlixiaoxin@163.com.

[Abstract] Objective To compare the effects of different intraocular infusion solutions on histology and function of retina. **Methods** Human corneal endothelial cells (HCEC), human retinal pigment epithelium (HRPE) cells and rat retinal ganglion cells (RGC) were divided into normal control group, balanced saline solution (BSS) group and compound electrolyte intraocular irrigating solution (CEIS) group, and the cells were cultured in 10% DMEM/F12 medium, BSS and CEIS for 12, 24 and 48 hours, respectively, according to grouping. The proliferation absorbance value of cultured cells was measured by cell counting kit-8 (CCK8) method. The expression of apoptosis related proteins in cultured cells was detected by cellular immunofluorescence staining. The cell apoptosis rate and cell cycle were measured by flow cytometry. The mitochondrial damage was detected by lactate dehydrogenase (LDH) and succinate dehydrogenase (SDH) quantitative detection kit. Fifteen New Zealand white rabbits were randomly divided into control group ($n=3$), BSS group ($n=6$) and CEIS group ($n=6$). The left eyes were taken for vitrectomy and different intraocular perfusion fluids were used during vitrectomy according to grouping. The retinal function of operative eyes was measured by flash electroretinogram (ERG) before operation and 24 hours after operation, and the structural changes of each layer of retina were detected by optical coherence tomography (OCT). The early apoptosis of retinal cells was detected by TUNEL staining. The expressions of cytochrome C and bax protein in retina were detected by immunohistochemical staining. The ultrastructural changes of retina were observed under a transmission electron microscope. The use and care of animals complied with the ARVO statement. This study protocol was approved by an Ethics Committee of Peking University People's Hospital (No. 2019PHE059). **Results** The three kinds of cultured cells in BSS and CEIS groups were damaged in various degrees. With the extension of culture time, proliferated cells were decreased and the number of apoptotic cells was increased. Compared with the BSS group, cultured cells in the CEIS group were dense and in orderly arrangement with uniform morphology and size. The apoptosis rates of HRPE cells and RGC in the BSS group were $(37.157 \pm 6.918)\%$ and $(29.993 \pm 12.330)\%$, respectively, which were significantly higher than $(4.163 \pm 1.310)\%$ and $(6.337 \pm 1.903)\%$ in the CEIS group ($P=0.003, 0.045$). There was no significant difference in G0/G1+S phase ratio of HCEC and HRPE cells among the normal control group, BSS group and CEIS group (HCEC: $F=2.226, P=0.189$; HRPE: $F=2.634, P=0.151$), and the proportion of G2/M division arrest phase of RGC in the BSS group was significantly higher than that in the normal control group and CEIS group ($P=0.047, 0.024$). The proliferation absorbance values of HCEC, HRPE cells and RGC in the CEIS group were significantly higher than those in the BSS group at each culture time point (all at $P<0.05$). The fluorescence intensity of cytochrome C, bax, caspase-3 and caspase-9 proteins in the BSS group was stronger than that in the normal control group and CEIS group, and the fluorescence intensity of bcl-2 was weaker than that in the CEIS group, and the fluorescence intensity of zonula occluden-1 (ZO-1) was weaker than that in the normal control group and CEIS group. The release level of LDH in the BSS group was significantly higher than that in the CEIS group at different time points (all at $P<0.001$). After 48 hours of culture, the release level of SDH in the BSS group was significantly higher than that in the CEIS group ($P<0.05$). No retinal histological abnormalities was found through OCT examination of rabbit eyes after vitrectomy in the two groups, but transmission electron microscopy showed that there were different degrees of loose arrangement of retinal photoreceptor cells, a large number of photoreceptor outer membrane discs falling off and vacuolar degeneration in the two groups, especially in the BSS group. TUNEL staining showed that the apoptotic cells were mainly located in the inner nuclear layer and RGC layer. The number of apoptotic retinal cells was (135.2 ± 22.8) /high-power field of vision in the BSS group, which was significantly higher than (81.3 ± 17.7) /high-power field of vision in the CEIS group ($t=4.175, P=0.002$). Full field flash ERG showed that the amplitudes of scotopic 3.0 ERG a- and b-wave in the CEIS group after operation were significantly lower than those before operation, but the differences were not statistically significant (all at $P>0.05$). The amplitudes of scotopic 3.0 ERG a- and b-wave in the BSS group after operation were significantly lower

than those before operation ($P = 0.026, 0.010$). **Conclusions** *In vivo* and *in vitro* research results show that compared with BSS, there were few apoptotic cells in retinal tissue after vitrectomy perfused by CEHS.

[Key words] Vitrectomy; Infusion solutions; Cell viability; Retinal function; Apoptosis; Oxidative stress

Fund program: National Basic Research Program of China (2011CB510200); National Natural Science Foundation of China (81670870)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200810-00575

玻璃体切割术中改进眼内灌注液可以更好地保护视网膜组织结构并改善视网膜功能^[1-3],减少对视网膜色素上皮细胞和角膜内皮细胞的损伤。眼组织的新陈代谢有赖于眼内液体成分及其作用,如 O_2 、pH 和渗透压等。将无菌平衡盐灌洗液(balanced saline solution, BSS)与改良无菌 BSS(必施佳)对眼组织的影响进行比较发现,兔眼玻璃体切割术中应用乳酸林格液对术后视网膜电图(electroretinogram, ERG)的 a 波、b 波振幅低于正常值所持续的时间比 BSS 和改良 BSS 更长^[4],推测乳酸林格液的低 pH、高乳酸水平和低渗透压可能对视网膜细胞产生永久性的损伤。还有研究发现,玻璃体切割术后早期病变主要发生在视网膜内,包括视网膜的各层缺损或脱离、视神经纤维层外露、内丛状层水肿和层厚增加等^[5-7],因此术眼术后视力恢复可能与术中灌注液介导的细胞内环境变化有关。葡萄糖是眼内灌注液中的重要组成成分,是维持视网膜正常功能的必要元素。复方电解质眼内灌注液(compound electrolyte intraocular irrigating solution, CEHS)中硫酸镁、碳酸氢钠和葡萄糖的成分与 BSS 稍有不同(表 1),更符合眼组织细胞代谢的生理需求,但目前鲜见 BSS 与 CEHS 对眼组织细胞功能和结构影响的比较。本研究拟观察这 2 种眼内灌注液对体外培养的人角膜内皮细胞(human corneal endothelial cells, HCEC)、人视网膜色素上皮(human retinal pigment epithelium, HRPE)细胞和大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)生存的影响,并比较 2 种眼内灌注液对兔玻璃体切割术后视网膜功能和结构恢复的影响,为临床玻璃体切割手术中眼内灌注液的选择提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞及动物 HRPE 细胞系(CRL2302)(美国 ATTC 细胞库);HCEC 系(ACC647)(德国微生物菌种保藏中心);大鼠 RGC(武汉普诺赛生命科技有限公司)。HRPE 细胞系和 HCEC 系均由天津科美生物科技有限公司进行 STR 分析;采用免疫荧光染色法测定神经节细胞标志蛋白 Rbpms 和 Brn3a 在 RGC 中的表达。3~4 月龄新西兰大耳白兔 16 只,雌雄各半,体质量 2.0~2.5 kg,由北京科宇动物养殖中心提供。实验动物的喂养和使用遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的 ARVO 声明。本研究方案经北京大学人民医院伦理委员会审批通过(批文号:2019PHE059)。

1.1.2 主要试剂及仪器 BSS(美国 Alcon 公司);CEHS(沈阳兴齐制药有限公司);DMEM/F12 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Thermo 公司);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司);蛋白质定量检测试剂盒(BCA 法)、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(上海碧云天生物技术有限公司);Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、细胞周期检测试剂盒(美国 BD Biosciences 公司);小鼠抗 bax(89477)、小鼠抗 bcl-2(15071)、小鼠抗 caspase-3(9668)、小鼠抗 caspase-9(9508)多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);Alexa-647-结合山羊抗兔二抗(ab150083)、Alexa-488-结合山羊抗小鼠二抗(ab150113)、Alexa-647-结合驴抗山羊二抗(ab150135)、兔抗细胞色素 C 抗体(ab90529)、兔抗闭锁小带蛋白(zonula occluden-1, ZO-1)抗体(ab221547)(英国 Abcam 公司);TUNEL 试剂盒(QIA33)(美国 Sigma 公司)。23G 玻璃体切割系统(Constellation Vision System, 美国 Alcon 公司);全视野闪光 ERG 记录系统(RETiport, 德国罗兰公

表 1 BSS 和 CEHS 组成成分比较
Table 1 Comparison of components between BSS and CEHS

灌注液	相同成分	不同成分
BSS	NaCl, KCl, CaCl ₂ · 2H ₂ O	MgCl ₂ · 6H ₂ O, C ₂ H ₃ NaO ₂ · 3H ₂ O, C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O
CEHS	NaCl, KCl, CaCl ₂ · 2H ₂ O	MgSO ₄ , NaHCO ₃ , C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O

注: BSS:平衡盐灌洗液;CEHS:复方电解质眼内灌注液

Note: BSS: balanced saline solution; CEHS: compound electrolyte intraocular irrigating solution



司);离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);流式细胞仪(FACSCanto II,美国 BD 公司);酶标仪(Imark,美国 Bio-Rad 公司);荧光倒置显微镜(IX53,日本 Olympus 公司);眼科超显微成像系统(4D-ISOCT,英国 Optoprobe 公司);超薄切片机(LEICA EM UC6,德国 Leica 公司);透射电子显微镜(Titan,美国 FEI 公司);光相干断层扫描仪(SPECTRALIS,德国海德堡公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及培养 取 HRPE 细胞、HCEC 和大鼠 RGC,常规培养 3 d 后,细胞达到 70%以上融合时,将细胞分为正常对照组、BSS 组和 CEHS 组。正常对照组 HRPE 细胞和 HCEC 培养于含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 中,大鼠 RGC 培养于含体积分数 20% FBS 的 DMEM/F12 中,BSS 组和 CEHS 组各细胞分别培养于 BSS 或 CEHS 眼内灌注液中,在 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度空气培养箱中培养。

1.2.2 实验动物分组 采用抽签法将 15 只实验兔分为对照组 3 只、BSS 组 6 只和 CEHS 组 6 只,均取左眼为实验眼,根据分组在玻璃体切割术中分别采用 BSS 和 CEHS 眼内灌注液,对照组实验兔不进行手术。

1.2.3 实验动物玻璃体切割手术 采用肌肉注射氟胺酮(35 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)混合物行实验兔全身麻醉,手术期间以同样注射方法追加氟胺酮 18 mg/kg 和甲苯噻嗪 5 mg/kg;术前双眼用左氧氟沙星滴眼液各点眼 3 滴,托吡卡胺滴眼液点术眼扩瞳;动物麻醉后用庆大霉素注射液反复冲洗结膜囊,采用盐酸丁卡因滴眼液点眼行表面麻醉。采用 23G 玻璃体切割系统进行玻璃体切割术,操作如下:切开球结膜,做标准 3 个巩膜切口,将填充头、玻璃体切割头和光纤经角膜缘后 1 mm 处进入玻璃体腔;术中选择标准化溶液瓶高度以行玻璃体腔灌注,除保留靠近视网膜的玻璃体以外,对其他部分玻璃体进行切割。术中冲洗液维持 60 min,总手术时间不到 1.5 h,用 7-0 缝合线缝合切口;术后用地塞米松滴眼液点眼。所有动物实验手术皆由同一人完成。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期 将细胞接种于培养皿中并进行分组处理,培养 24 h,采用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,1 000 × g 离心 5 min,收集沉淀;用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤 3 次,将细胞重悬于含 annexin V-FITC 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)的结合缓冲液中,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,计算细胞凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。将细胞重悬于含有 PI 和 RNase 的结合缓冲液中,采用流式细胞仪对细胞

周期进行分析。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞活性 将细胞接种于 96 孔板并进行分组处理,于培养 12、24 和 48 h 向每孔添加 10 μl CCK-8 溶液,37 °C 条件下继续培养 1 h,用酶标仪测定每孔波长 450 nm 处吸光度(A)值。

1.2.6 免疫荧光法测定细胞中凋亡相关蛋白表达 细胞接种在 96 孔板中,培养 24 h 后用预冷 PBS 洗涤 2 次,加入质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min,用预冷 PBS 洗涤 3 次,加入 5% 牛血清白蛋白室温下封闭 1 h;分别置于小鼠抗 bax 抗体(1:1 000)、兔抗细胞色素 C 抗体(1:1 000)、小鼠抗 bcl-2 抗体(1:1 000)、小鼠抗 caspase-3 抗体(1:1 000)、小鼠抗 caspase-9 抗体(1:1 000)和兔抗 ZO-1 抗体(1:1 000)4 °C 下孵育过夜,PBS 洗涤 3 次;用 Alexa-647 结合山羊抗兔二抗(1:2 000)、Alexa-488 结合山羊抗小鼠二抗(1:2 000)和 Alexa-647 结合驴抗山羊二抗(1:2 000)室温下避光孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次;置于 DAPI 中室温下孵育 5 min,PBS 洗涤 3 次;荧光倒置显微镜下观察培养细胞和视网膜中相应蛋白表达的荧光强度。

1.2.7 各组细胞线粒体氧化应激损伤测定 按照 SDH 和 LDH 检测试剂盒说明书的步骤,提前将细胞铺于 96 孔板中,每孔 1×10⁶ 细胞,分别于 12、24、48 h 每孔加入预冷 100 μl 分析缓冲液,冰上裂解 10 min,10 000 × g 离心 5 min,取上清,向每孔加入 50 μl 裂解上清,每个样品设置 2 个复孔,再加入 50 μl 反应混合物(分析缓冲液 46 μl+基底混合物 2 μl+探针 2 μl);将 96 孔板于 25 °C 下孵育,每 5 min 测 1 次;用酶标仪测定每孔 600 nm 处 A 值,总孵育时间不超过 30 min。阳性对照由试剂盒提供。

1.2.8 TUNEL 染色法检测视网膜各层细胞的早期凋亡情况 采用肌肉注射行全身麻醉,摘取对照组和实验组术后 24 h 各 3 只兔左眼球,浸入眼球固定液中,空气栓塞法处死实验兔;眼球固定 10 min 后,用 1 ml 注射器针头于角膜正中央穿刺以利于固定液进入眼球,继续固定过夜;标本经过固定和冲洗后在脱水机中梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,行石蜡包埋;沿视神经与眼轴平行的平面进行石蜡切片,切片厚度为 5 μm,60 °C 烤片 10 h,备用。按照 TUNEL 试剂盒说明书步骤,取切片用蛋白酶 K 于 37 °C 条件下孵育 30 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min;用体积分数 3% H₂O₂ 封闭液室温封闭 10 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min;滴加 30 μl 新鲜配置的 TUNEL 混合液,于 37 °C 条件下孵育 60 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min;滴加 50 μl Streptavidin-HRP 工作液,室温孵育 30 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min;

滴加 200 μl DAB 显色液, 室温孵育 15 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 用苏木素染色液染核, 清洗 3 次后封片直接观察。取各组眼球各 3 张切片用于 TUNEL 染色, 计算 100 倍显微镜视野下 TUNEL 阳性细胞数。

1.2.9 免疫组织化学染色法测定兔视网膜组织中凋亡相关蛋白表达 取各组眼球石蜡切片, 脱蜡, 抗原修复 20 min, 自然冷却至室温; 用 3% H_2O_2 封闭液室温孵育 10 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 滴加小鼠抗 bax 抗体 (1:500)、兔抗细胞色素 C 抗体 (1:500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 滴加反应增强液, 室温孵育 20 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 滴加增强酶聚合物, 室温孵育 20 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 加入新鲜配制的 DAB 显色液, 室温孵育 5~8 min; 自来水冲洗, 苏木素染色液孵育 20 s, 封片后于显微镜下观察并拍照。

1.2.10 全视野闪光 ERG 检查术眼视网膜功能 分别于术前和术后 24 h, 采用全视野闪光 ERG 记录系统对实验兔左眼进行闪光 ERG 检查, 检查过程遵循国际临床视觉电生理学会的记录标准。在绝对暗室的红光照明下 (波长 $>650\text{ nm}$) 进行 ERG 记录; 采用托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳, 采用盐酸丁卡因滴眼液点眼表面麻醉; 动物在暗室中暗适应 1 h, 记录暗适应 ERG、振荡电位 (oscillatory potential, OPs) 和明适应 ERG; 检查时将金属环状电极对准角膜中央, 参考针状电极插入实验兔颊部皮下, 尽可能远离心脏, 地电极插入尾部皮下; 按照设定程序参数开始进行闪光 ERG 刺激, 记录 a 波、b 波的振幅。

1.2.11 OCT 检查术眼视网膜各层结构变化 分别于术前和术后 24 h, 采用光相干断层扫描仪对全身麻醉状态下实验兔术眼视网膜视盘部位进行检测, 观察

各组实验兔视网膜各层结构变化。

1.2.12 透射电子显微镜下观察术眼超微结构变化 取对照组和实验组术后 24 h 实验兔各 3 只, 采用肌内注射全身麻醉, 摘取左眼眼球, 用体积分数 3% 戊二醛固定 3 h, 用 0.1 mol/L PBS 溶液 (pH7.2) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下洗涤 2 次, 每次 10 min; 用质量分数 1% 锇酸于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下固定 1 h, 直至样品变黑; 将固定过的眼球用 0.1 mol/L PBS 溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下洗涤 2 次, 每次 10 min; 依次用体积分数 50%、70%、90% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下各脱水 10 min, 然后用 100% 乙醇室温下脱水 3 次, 每次 10 min; 采用 100% 乙醇与环氧丙烷等比例混合溶液室温下渗透 10 min, 环氧丙烷室温下渗透 10 min; Epon812 与环氧丙烷等比例混合溶液浸透 30 min, 真空干燥仪 (0.2~0.4 kg/cm^2) 室温条件下干燥 2 h 以上; 使用 Epon812 包埋, 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下聚合 2 h, 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下聚合 4 h, 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下聚合 10 h; 沿视神经与眼轴平行的平面进行半薄切片, 切片厚度为 1 000 nm, 甲苯胺蓝染色 1 min, 确定视网膜的位置及结构, 再行超薄切片, 切片厚度为 70 nm; 醋酸铀和柠檬酸铅染色液室温下染色 10 min, 漂洗后透射电子显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。计量数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实接近正态分布, 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 经 Levene 检验证实方差齐。各组间测量指标总体差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时间点培养细胞的形态学变化

倒置显微镜下观察可见, 随培养时间的延长, BSS

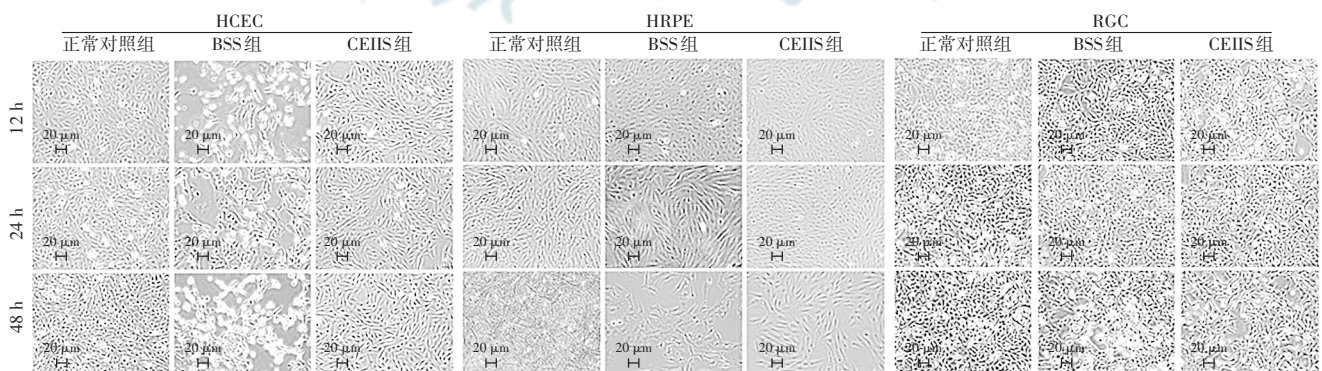


图 1 各组不同时间点 3 种细胞的形态学变化 ($\times 200$, 标尺 = 20 μm) 随培养时间延长, BSS 组和 CEIIS 组细胞数量逐渐减少, 正常对照组细胞数逐渐增多 HCEC: 人角膜内皮细胞; HRPE: 人视网膜色素上皮; RGC: 视网膜神经节细胞; BSS: 平衡盐灌洗液; CEIIS: 复方电解质眼内灌注液

Figure 1 The morphological findings of HCEC, HRPE and RGC cells under different culture conditions at various time points ($\times 200$, bar = 20 μm) With the extension of culture time, the number of cells in the BSS group and CEIIS group was decreased gradually, and the number of cells in the normal control group was increased gradually HCEC: human corneal endothelial cells; HRPE: human retinal pigment epithelium; RGC: retinal ganglion cells; BSS: balanced salt solution; CEIIS: compound electrolyte intraocular irrigating solution

组和 CEIS 组细胞数量逐渐减少,正常对照组细胞数逐渐增多。培养 48 h, BSS 组培养基中可见大量漂浮细胞,细胞排列紊乱,形态不均一;CEIS 组培养细胞排列致密整齐,细胞形态和大小均一。BSS 组和 CEIS 组细胞数量均少于正常对照组(图 1)。

2.2 各组细胞状态比较

正常对照组、BSS 组和 CEIS 组间 HRPE 细胞和 RGC 的细胞凋亡率总体比较差异均有统计学意义(HRPE: $F = 37.287, P < 0.001$; RGC: $F = 7.378, P = 0.024$), HCEC 细胞凋亡率总体比较差异无统计学意义($F = 3.919, P = 0.082$)。BSS 组 HRPE 细胞和 RGC 的细胞凋亡率分别为(37.157 ± 6.918)%和(29.993 ± 12.330)%,明显高于 CEIS 组的(4.163 ± 1.310)%和(6.337 ± 1.903)%,差异均有统计学意义($P = 0.003, 0.045$);BSS 组和 CEIS 组 HCEC 细胞凋亡率分别为(16.380 ± 8.969)%和(3.267 ± 0.265)%,组间比较差异无统计学意义($P = 0.107$)(图 2A)。

正常对照组、BSS 组和 CEIS 组间 HCEC 和 HRPE 细胞的 G0/G1+S 期比例总体比较差异均无统计学意义(HCEC: $F = 2.226, P = 0.189$; HRPE: $F = 2.634, P = 0.151$)。各组间 RGC 的 G2/M 期比例总体比较差异有统计学意义($F = 8.354, P = 0.018$);其中 BSS 组 RGC 的 G2/M 期比例高于 DMEM 组和 CEIS 组,差异均有统计学意义($P = 0.047, 0.024$)(图 2B)。各培养时间点 CEIS 组 HCEC、HRPE 细胞和 RGC 的增生 A 值均明显高于 BSS 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 2)。

2.3 各组不同细胞凋亡相关蛋白表达比较

细胞免疫荧光染色显示, BSS 组 HCEC、HRPE 细胞和 RGC 中细胞色素 C、bax、caspase-3 和 caspase-9 均呈强荧光表达,荧光强度强于正常对照组和 CEIS 组, bcl-2 荧光强度弱于 CEIS 组;BSS 组各细胞 ZO-1 呈弱荧光表达,荧光强度低于正常对照组和 CEIS 组(图 3)。

2.4 各组不同细胞中 LDH 和 SDH 释放量比较

培养 12、24、48 h 时 BSS 组 3 种细胞

中 LDH 释放水平均高于 CEIS 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);不同时间点 BSS 组 3 种细胞中 LDH 释放水平均高于相应时间点正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);培养 12 h 时, CEIS 组 HRPE 细胞、RGC 中 LDH 释放水平高于正常对照组, HCEC 细胞中 LDH 释放水平低于正常对照组,差异均有统计

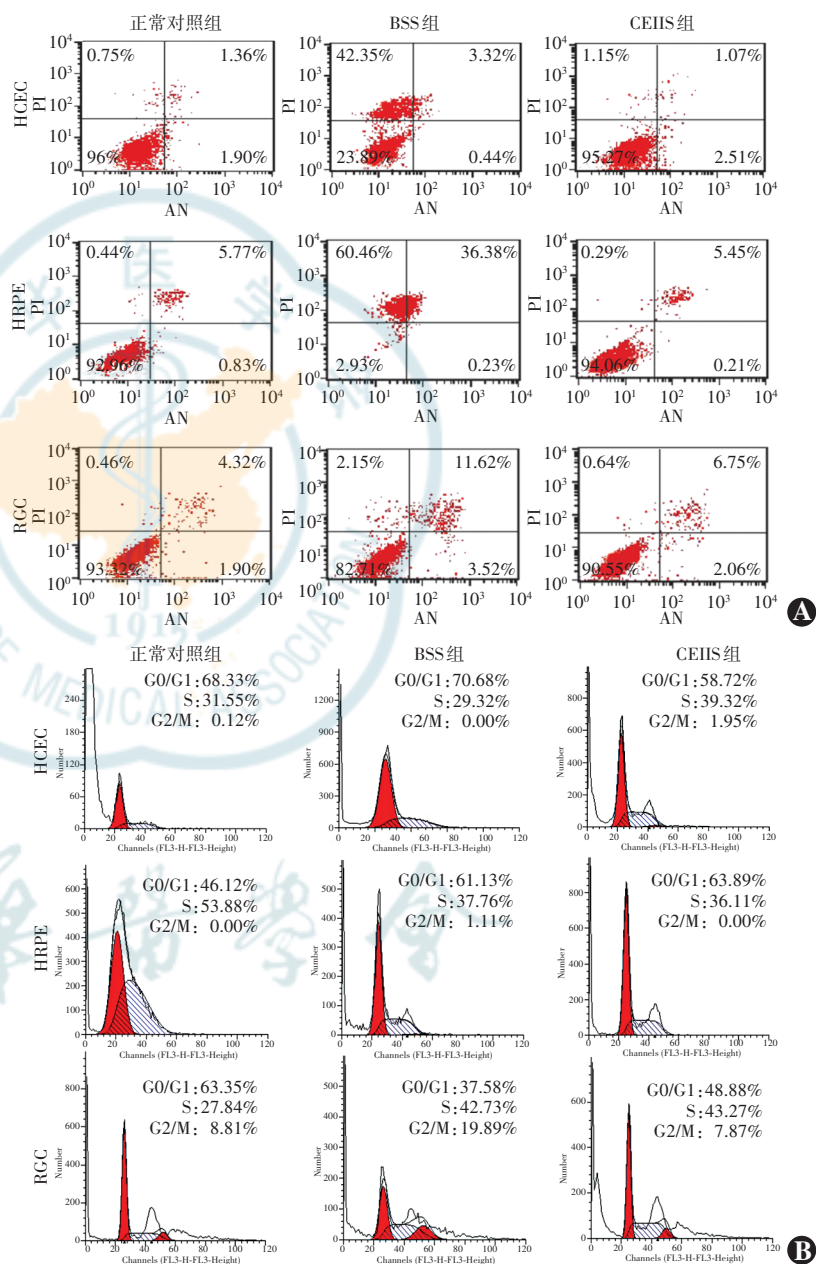


图 2 各组 3 种细胞的细胞凋亡和细胞周期流式细胞分析图 A: 细胞凋亡流式细胞分析图 B: 细胞周期流式细胞分析图 BSS: 平衡盐灌洗液; CEIS: 复方电解质眼内灌注液; HCEC: 人角膜内皮细胞; HRPE: 人视网膜色素上皮; RGC: 视网膜神经节细胞
Figure 2 Apoptosis and cell cycle of three kinds of cells in each group analyzed by flow cytometry A: Flow cytometric analysis of apoptosis B: Flow cytometric analysis of cell cycle BSS: balanced saline solution; CEIS: compound electrolyte intraocular irrigating solution; HCEC: human corneal endothelial cells; HRPE: human retinal pigment epithelium; RGC: retinal ganglion cells

表 2 各组不同时间点 3 种细胞增生 A 值比较 (mean±SD)

Table 2 Comparison of proliferation absorbance value of HCEC, HRPE cells and RGC among different groups at various time points (mean±SD, A value)

组别	样本量	培养 12 h 不同细胞 A 值			培养 24 h 不同细胞 A 值			培养 48 h 不同细胞 A 值		
		HCEC	HRPE	RGC	HCEC	HRPE	RGC	HCEC	HRPE	RGC
正常对照组	3	0.350±0.036	0.736±0.086	0.647±0.079	0.435±0.044	1.524±0.061	1.317±0.037	0.648±0.076	0.939±0.100	0.925±0.027
BSS 组	3	0.122±0.015	0.067±0.003	0.188±0.004	0.056±0.003	0.079±0.020	0.197±0.035	0.060±0.004	0.112±0.015	0.266±0.042
CEIS 组	3	0.315±0.017 ^b	0.849±0.081 ^b	0.382±0.028 ^{ab}	0.225±0.020 ^{ab}	1.385±0.171 ^b	0.529±0.110 ^{ab}	0.120±0.005 ^{ab}	0.724±0.083 ^{ab}	0.870±0.109 ^b
F 值		76.588	114.745	67.304	138.130	170.512	216.855	161.449	96.376	83.633
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a*P*<0.05;与 BSS 组比较,^b*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) HCEC:人角膜内皮细胞;HRPE:人视网膜色素上皮;RGC:视网膜神经节细胞;BSS:平衡盐溶液;CEIS:复方电解质眼内灌注液

Note:Compared with the normal control group,^a*P*<0.05;compared with the BSS group,^b*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test) HCEC:human corneal endothelial cells;HRPE:human retinal pigment epithelium;RGC:retinal ganglion cells;BSS:balanced saline solution;CEIS:compound electrolyte intraocular irrigating solution

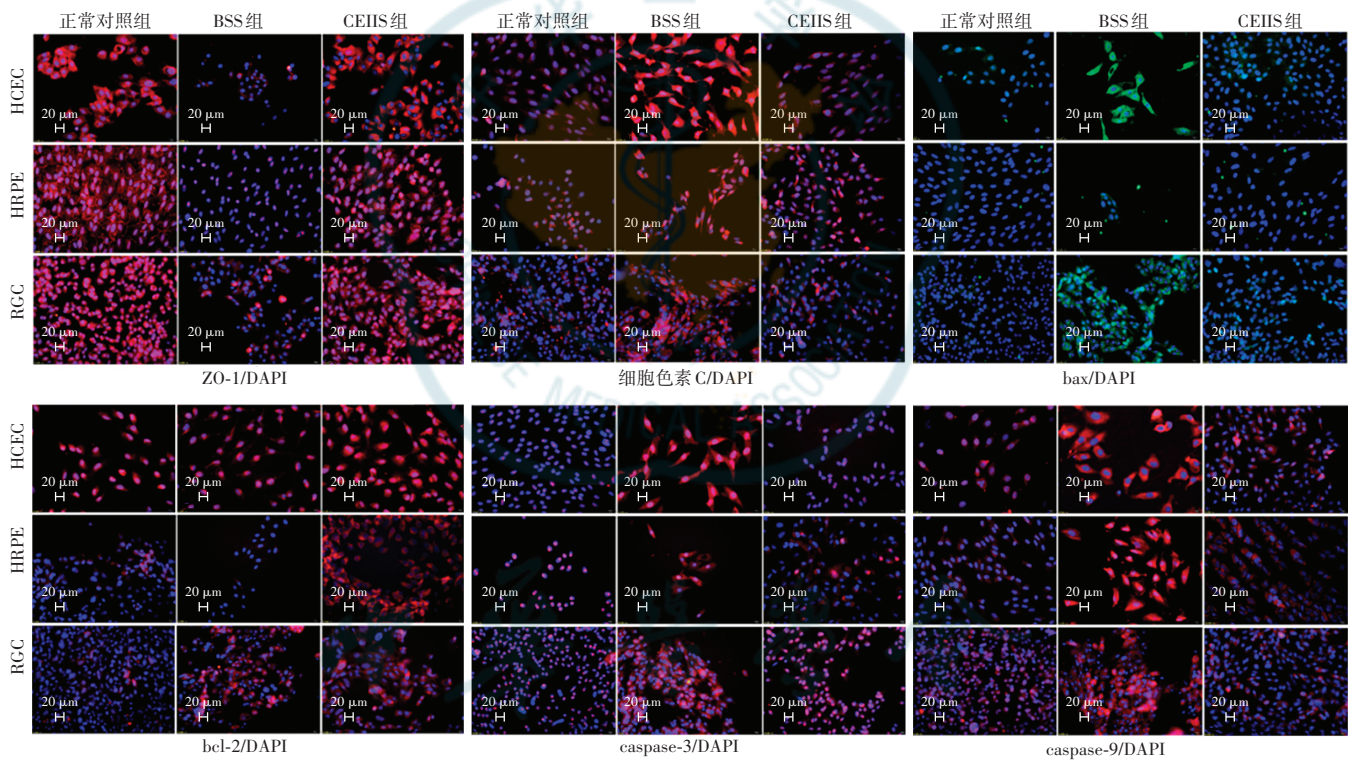


图 3 各组 3 种细胞 ZO-1、bax、bcl-2、细胞色素 C、caspase-3 和 caspase-9 免疫荧光染色图 (×200, 标尺 = 20 μm) BSS 组各细胞中细胞色素 C、bax、caspase-3 和 caspase-9 蛋白荧光强度强于正常对照组和 CEIS 组, bcl-2 蛋白荧光强度弱于 CEIS 组, ZO-1 蛋白荧光强度弱于正常对照组和 CEIS 组 BSS:平衡盐灌注液;CEIS:复方电解质眼内灌注液;HCEC:人角膜内皮细胞;HRPE:人视网膜色素上皮;RGC:视网膜神经节细胞

Figure 3 Immunofluorescence staining of three cells for ZO-1, bax, bcl-2, cytochrome c, caspase-3 and caspase-9 in each group (×200, bar = 20 μm) The fluorescence intensity of cytochrome C, bax, caspase-3 and caspase-9 proteins in the BSS group was stronger than that in the normal control group and CEIS group. The fluorescence intensity of bcl-2 protein in CEIS group was stronger than that in the BSS group. The fluorescence intensity of ZO-1 protein in the BSS group was weaker than that in the normal control group and CEIS group BSS:balanced saline solution;CEIS:compound electrolyte intraocular irrigating solution;HCEC:human corneal endothelial cells;HRPE:human retinal pigment epithelium;RGC:retinal ganglion cells

学意义(均 *P*<0.001);培养 24 h 时,CEIS 组 3 种细胞 LDH 释放水平均高于相应时间点正常对照组,差异均有统计学意义(均 *P*<0.001);培养 48 h 时,CEIS 组 HCEC、HRPE 细胞 LDH 释放水平高于正常对照组,

RGC 的 LDH 释放水平低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 *P*<0.001)(表 3)。

培养 12 h 时,BSS 组 HCEC 和 RGC 的 SDH 释放水平均高于 CEIS 组,差异均有统计学意义(均 *P*<

0.05), BSS 组 HRPE 细胞 SDH 释放水平与 CEIS 组比较差异无统计学意义 ($P=0.359$); 培养 24 h 时, BSS 组 HCEC 与 HRPE 细胞 SDH 释放水平高于 CEIS 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 培养 48 h 时, BSS 组 3 种细胞 SDH 释放水平均高于 CEIS 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 4)。

2.5 各组实验兔手术前后视网膜细胞凋亡情况及凋亡相关蛋白表达变化

术前 BSS 组和 CEIS 组术眼视网膜细胞凋亡数分别为 (15.8 ± 10.4) 个/高倍视野和 (19.8 ± 9.1) 个/高倍视野, 2 个组比较差异无统计学意义 ($P=0.531$); BSS 组和 CEIS 组中 bax 和细胞色素 C 蛋白呈弱表达。玻璃体切割术后 24 h, 视网膜凋亡细胞主要位于视网膜内核层和 RGC 层; 细胞色素 C 主要表达于光感受器层。BSS 组细胞色素 C 表达强于 CEIS 组; bax 蛋白主要表达于视网膜外核层, 2 个组间视网膜 bax 蛋白表达强度无明显差别; 术后 BSS 组视网膜细胞凋亡数为

(135.2 ± 22.8) 个/高倍视野, 高于 CEIS 组的 (81.3 ± 17.7) 个/高倍视野, 差异有统计学意义 ($t=4.175, P=0.002$) (图 4)。

2.6 各组实验兔视网膜各层结构变化

BSS 组术前和术后神经节细胞层+内丛状层+内核层厚度分别为 $(131.67 \pm 4.50) \mu\text{m}$ 和 $(132.00 \pm 4.90) \mu\text{m}$, 外丛状层+外核层厚度分别为 $(111.67 \pm 15.92) \mu\text{m}$ 和 $(112.33 \pm 14.97) \mu\text{m}$, 术前与术后各厚度值比较, 差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$); CEIS 组术前和术后神经节细胞层+内丛状层+内核层厚度分别为 $(130.67 \pm 3.40) \mu\text{m}$ 和 $(134.67 \pm 2.05) \mu\text{m}$, 外丛状层+外核层厚度分别为 $(144.33 \pm 20.53) \mu\text{m}$ 和 $(145 \pm 15.25) \mu\text{m}$, 术前与术后各厚度值比较, 差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。术后未见视网膜脱离发生 (图 5)。

2.7 实验兔视网膜超微结构变化

透射电子显微镜检查显示, 实验兔非手术眼视网膜组织结构层次清楚, 细胞排列致密, 外核层细胞核排

表 3 各组不同时间点 3 种细胞 LDH 释放量比较 [mean±SD, nmol/(min·ml)]
Table 3 Comparison of LDH releasing level among three kinds of cells among different groups at various time points [mean±SD, nmol/(min·ml)]

组别	样本量	培养 12 h 不同细胞释放量			培养 24 h 不同细胞释放量			培养 48 h 不同细胞释放量		
		HCEC	HRPE	RGC	HCEC	HRPE	RGC	HCEC	HRPE	RGC
正常对照组	3	148.55±0.57	79.28±0.52	95.36±0.37	207.54±0.77	51.74±0.48	219.13±0.25	141.45±0.58	91.88±0.96	273.91±0.16
BSS 组	3	160.29±0.15 ^a	249.28±0.40 ^a	157.97±0.36 ^a	253.48±0.19 ^a	564.78±0.94 ^a	375.78±0.52 ^a	492.75±0.31 ^a	490.87±0.34 ^a	307.52±0.76 ^a
CEIS 组	3	85.68±0.22 ^b	117.39±0.94 ^b	178.84±0.30 ^b	228.41±0.15 ^b	125.36±0.57 ^b	299.13±0.23 ^b	392.90±0.16 ^b	141.88±0.47 ^b	265.80±0.59 ^b
F 值		45 925.389	52 918.354	40 453.963	8 330.496	449 701.470	133 857.058	620 803.838	307 350.046	4 370.138
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与 BSS 组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) LDH: 乳酸脱氢酶; BSS: 平衡盐灌洗液; CEIS: 复方电解质眼内灌注液; HCEC: 人角膜内皮细胞; HRPE: 人视网膜色素上皮; RGC: 视网膜神经节细胞

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the BSS group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) LDH: lactate dehydrogenase; BSS: balanced saline solution; CEIS: compound electrolyte intraocular irrigating solution; HCEC: human corneal endothelial cells; HRPE: human retinal pigment epithelium; RGC: retinal ganglion cells

表 4 各组不同时间点 3 种细胞 SDH 释放量比较 [mean±SD, nmol/(min·ml)]
Table 4 Comparison of SDH releasing level among three kinds of cells among different groups at various time points [mean±SD, nmol/(min·ml)]

组别	样本量	培养 12 h 不同细胞释放量			培养 24 h 不同细胞释放量			培养 48 h 不同细胞释放量		
		HCEC	HRPE	RGC	HCEC	HRPE	RGC	HCEC	HRPE	RGC
正常对照组	3	-0.061±0.003	-0.273±0.025	-0.032±0.004	-0.051±0.003	-0.372±0.008	-0.020±0.007	-0.049±0.003	-0.143±0.025	-0.020±0.003
BSS 组	3	-0.030±0.003	-0.157±0.021	-0.010±0.003	-0.030±0.003	-0.127±0.010	-0.021±0.009	-0.030±0.005	-0.117±0.021	-0.005±0.005
CEIS 组	3	-0.041±0.003 ^a	-0.187±0.055	-0.031±0.003 ^a	-0.051±0.003 ^a	-0.220±0.072 ^a	-0.032±0.009	-0.041±0.003 ^a	-0.573±0.275 ^a	-0.051±0.003 ^a
F 值		82.333	8.057	47.855	52.551	25.632	1.938	25.716	7.708	119.533
P 值		<0.001	0.020	<0.001	<0.001	0.001	0.224	0.001	0.022	<0.001

注: 与 BSS 组比较, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) SDH: 琥珀酸脱氢酶; BSS: 平衡盐灌洗液; CEIS: 复方电解质眼内灌注液; HCEC: 人角膜内皮细胞; HRPE: 人视网膜色素上皮; RGC: 视网膜神经节细胞

Note: Compared with the BSS group, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) SDH: succinate dehydrogenase; BSS: balanced saline solution; CEIS: compound electrolyte intraocular irrigating solution; HCEC: human corneal endothelial cells; HRPE: human retinal pigment epithelium; RGC: retinal ganglion cells

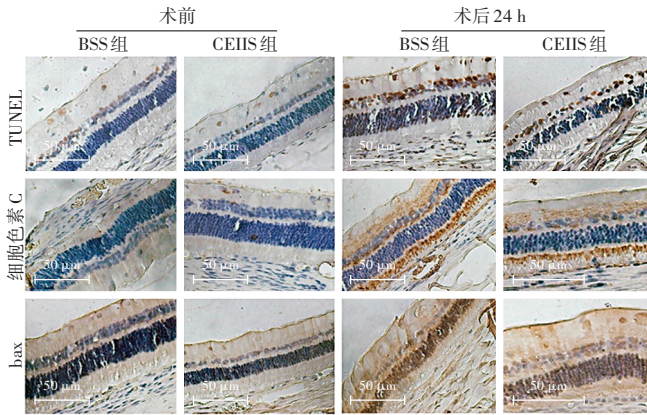


图 4 各组术前及术后 24 h 术眼视网膜细胞凋亡、细胞色素 C 及 bax 免疫组织化学染色图 (DAB ×400, 标尺 = 50 μm) 术前 BSS 组和 CEIIS 组术眼视网膜中 TUNEL 阳性细胞凋亡数均较低, 术后 BSS 组视网膜中 TUNEL 阳性细胞染色明显强于 CEIIS 组, 主要位于视网膜内核层和 RGC 层。术前 BSS 和 CEIIS 组术眼视网膜中细胞色素 C 蛋白呈弱表达, 术后 BSS 组细胞色素 C 表达强于 CEIIS 组, 主要表达在光感受器层。术前 BSS 和 CEIIS 组术眼视网膜中 bax 蛋白呈弱表达, 术后 BSS 组和 CEIIS 组视网膜中 bax 蛋白表达均增强, 且 2 个组间无明显差别 BSS: 平衡盐灌洗液; CEIIS: 复方电解质眼内灌注液

Figure 4 Immunohistochemical staining of retinal cell apoptosis, cytochrome C and bax in various groups before and 24 hours after surgery (DAB ×400, bar = 50 μm) The number of apoptotic TUNEL-positive cells in the retina of the BSS group and CEIIS group were lower before operation. After operation, the TUNEL-positive cell staining in the retina of the BSS group was obviously stronger than that of the CEIIS group, which was mainly located in the inner nuclear layer and RGC layer. Before operation, cytochrome C protein was weakly expressed in the retina of BSS and CEIIS groups. After operation, the expression of cytochrome C in the BSS group was stronger than that in the CEIIS group, which mainly expressed in the photoreceptor layer. Weak expression of bax protein was found in the retina of BSS and CEIIS groups before operation, and the expression of bax protein was increased in the retina of BSS and CEIIS groups after operation, and there was no significant difference between the two groups BSS: balanced saline solution; CEIIS: compound electrolyte intraocular irrigating solution

列规则; BSS 组和 CEIIS 组术后术眼视网膜感光层细胞排列疏松, 视网膜光感受器外节膜盘大量脱落, 出现叠状结构解离和空泡变性, 部分细胞核皱缩, RPE 细胞色素颗粒减少, 线粒体肿胀, 内膜嵴消失, 出现空泡, 以 BSS 组更为严重 (图 6)。

2.8 各组实验眼视网膜功能比较

术前 BSS 组与 CEIIS 组术眼 a 波、b 波振幅值比较差异均无统计学意义 ($P = 0.374, 0.159$)。术后 24 h, BSS 组术眼暗适应 $0.01 (cd \cdot s/m^2)$ ERG b 波振幅较术前显著降低, 差异有统计学意义 ($P = 0.037$); CEIIS 组术眼手术前后 b 波振幅比较差异无统计学意义 ($P = 0.123$)。术后 24 h, BSS 组术眼暗适应 $3.0 (cd \cdot s/m^2)$ ERG a、b 波振幅较术前均明显下降, 差异均有统计学意义 ($P = 0.026, 0.010$); CEIIS 组兔眼术后 a、b 波振

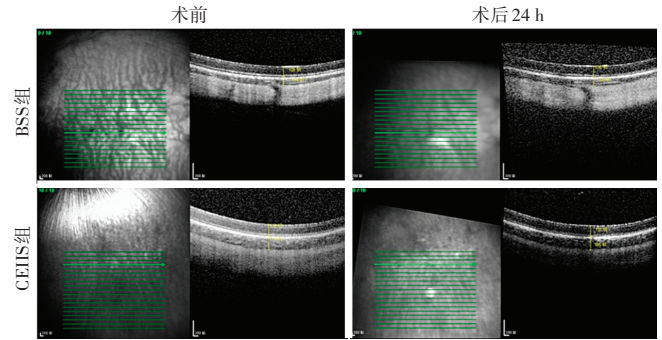


图 5 手术前后 BSS 组和 CEIIS 组术眼视网膜 OCT 图 术后 24 h 各组术眼视网膜结构和厚度与术前比较均无明显变化 BSS: 平衡盐灌洗液; CEIIS: 复方电解质眼内灌注液

Figure 5 Retinal OCT images of the BSS group and CEIIS group after operation There were no significant changes in retinal structure and thickness between before and 24 hours after operation BSS: balanced saline solution; CEIIS: compound electrolyte intraocular irrigating solution

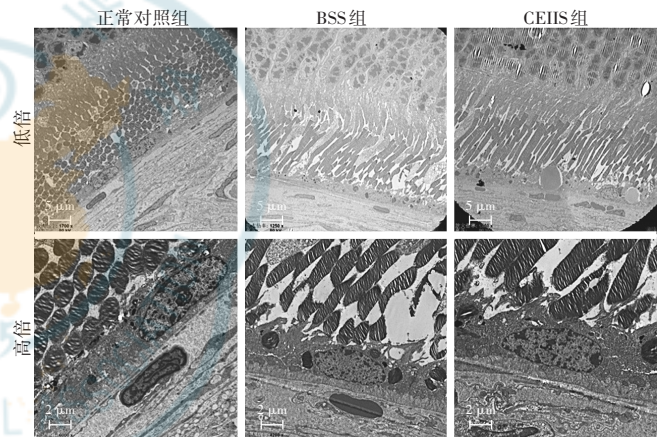


图 6 各组实验眼术后视网膜超微结构变化 透射电子显微镜检查结果证实 2 个组术后视网膜有轻微的组织学改变, 术后 24 h 细胞密度较术前稀疏, 光感受器外节膜盘大量脱落, 出现叠状结构解离和空泡变性, BSS 组比 CEIIS 组更严重 BSS: 平衡盐灌洗液; CEIIS: 复方电解质眼内灌注液

Figure 6 Retinal ultrastructural changes of experimental eyes in each group after operation Slight histological changes were found in the retina of BSS and CEIIS groups after operation with a transmission electron microscope. The cell density at 24 hours after operation was sparser compared with that before operation. A large number of membrane discs in photoreceptor outer segment fell off. Dissociation of overlapped structure and the vacuolar degeneration were observed in the two groups, which were more serious in BSS group than CEIIS group BSS: balanced saline solution; CEIIS: compound electrolyte intraocular irrigating solution

幅较术前均有所下降, 但差异均无统计学意义 ($P = 0.093, 0.159$)。BSS 组和 CEIIS 组术眼术后 OPs 波总振幅较术前均有所下降, 但差异均无统计学意义 ($P = 0.642, 0.258$)。BSS 组术眼术前 30Hz 闪烁光 ERG 振幅为 $(9.62 \pm 3.22) \mu V$, 术后降低至 $(1.79 \pm 1.04) \mu V$, 差异有统计学意义 ($t = 4.777, P = 0.002$), CEIIS 组术眼 30Hz 闪光 ERG 振幅从术前的 $(9.68 \pm 5.14) \mu V$ 降低至术后的 $(3.06 \pm 1.04) \mu V$, 差异无统计学意义 ($t =$

1. 785, $P=0.149$) (表 5~7)。

表 5 各组内术眼手术前后暗视 0.01 ERG b 波振幅比较 (mean±SD, μV)

Table 5 Comparison of preoperative and postoperative scotopic 0.01 ERG b-wave amplitude in each group (mean±SD, μV)

时间	样本量	BSS 组 b 波	CEHS 组 b 波
术前	3	38.97±17.92	88.97±51.78
术后	3	16.43± 4.32	17.15± 5.74
<i>t</i> 值		2.570	2.107
<i>P</i> 值		0.037	0.123

注: (配对 *t* 检验) ERG: 视网膜电图; BSS: 平衡盐灌洗液; CEHS: 复方电解质眼内灌注液

Note: (Paired *t*-test) ERG: electroretinogram; BSS: balanced saline solution; CEHS: compound electrolyte intraocular irrigating solution

表 6 各组内术眼手术前后暗视 3.0 ERG a、b 波振幅比较 (mean±SD, μV)

Table 6 Comparison of preoperative and postoperative scotopic 3.0 ERG a- and b-wave amplitudes in each group (mean±SD, μV)

时间	样本量	BSS 组		CEHS 组	
		a 波	b 波	a 波	b 波
术前	3	40.17±25.14	71.63±25.09	50.23±16.90	115.7±45.84
术后	3	6.51± 4.51	26.58± 7.99	23.90± 1.49	56.3±16.17
<i>t</i> 值		2.803	3.536	2.213	1.592
<i>P</i> 值		0.026	0.010	0.093	0.159

注: (配对 *t* 检验) ERG: 视网膜电图; BSS: 平衡盐灌洗液; CEHS: 复方电解质眼内灌注液

Note: (Paired *t*-test) ERG: electroretinogram; BSS: balanced saline solution; CEHS: compound electrolyte intraocular irrigating solution

表 7 各组内术眼手术前后明视 3.0 ERG a、b 波振幅比较 (mean±SD, μV)

Table 7 Comparison of preoperative and postoperative photopic 3.0 ERG a- and b-wave amplitudes in each group (mean±SD, μV)

时间	样本量	BSS 组		CEHS 组	
		a 波	b 波	a 波	b 波
术前	3	7.91±5.25	57.27±20.88	12.29±5.79	95.17±43.34
术后	3	6.01±2.35	20.83± 5.23	3.13±2.53	25.90± 4.68
<i>t</i> 值		0.658	1.887	2.051	2.247
<i>P</i> 值		0.532	0.157	0.110	0.088

注: (配对 *t* 检验) ERG: 视网膜电图; BSS: 平衡盐灌洗液; CEHS: 复方电解质眼内灌注液

Note: (Paired *t*-test) ERG: electroretinogram; BSS: balanced saline solution; CEHS: compound electrolyte intraocular irrigating solution

3 讨论

由于玻璃体切割术有导致眼内炎症的风险或对视

网膜功能的恢复产生影响,因此术中选择最佳的眼内灌注溶液对术眼视觉质量和患者生活质量的改善至关重要。0.9%氯化钠溶液、BSS、透明质酸盐和硅油等均可作为玻璃体切割术的眼内填充物^[8-10],但从理论上讲 CEHS 所含成分更接近视网膜及其他眼组织代谢所需组分。

HCEC、HRPE 细胞和 RGC 对玻璃体切割术后视觉功能的恢复至关重要。本研究采用 BSS 和 CEHS 对这些细胞进行体外培养,发现 BSS 和 CEHS 对这些细胞的增生活力均有一定的影响,但 CEHS 条件下的细胞活力优于 BSS。本研究采用免疫组织化学染色法证实 BSS 组细胞 ZO-1 的表达水平明显低于 CEHS 组,推测主要是由 BSS 中碳酸氢盐和葡萄糖成分缺失所致。此外,3 种细胞对葡萄糖成分的敏感性有所不同,HRPE 细胞反应最为敏感,推测 HRPE 细胞对碳酸氢盐和葡萄糖的依赖性可能高于其他细胞。研究发现,碳酸氢盐对维持正常视网膜功能是必不可少的,葡萄糖在维持细胞活力、减少凋亡、维持细胞周期、保持细胞间的正常连接和通讯、减少氧化还原介导的损伤及维持线粒体结构和功能等方面尤为重要,这可能是体外细胞实验中 CEHS 组细胞活性好、损伤小的主要原因^[11-13]。

为了验证离体实验的研究结果,本研究进行了相应的在体动物实验,结果显示玻璃体切割术后视网膜的 OCT 影像未见明显变化。然而,透射电子显微镜下观察可见术后视网膜超微结构发生轻微改变,本研究结果与孟自军等^[14]和 Hasumura 等^[15]的研究结果一致。Terasaki^[16]研究发现,玻璃体切割术中填充液释放到玻璃体中的化学介质可引起视网膜功能下降,OCT 检查结果也提示视网膜厚度的减少有助于其功能恢复。然而,本研究结果未发现手术前后视网膜厚度变化。

本研究采用闪光 ERG 检查评估实验眼视网膜功能,结果显示 BSS 组和 CEHS 组术眼均可见视网膜内层和外层损伤,表现为玻璃体切割术后 a 波和 b 波振幅明显降低。有研究报道,玻璃体切割术后皮质可能会对视网膜产生直接损害作用,尤其是神经纤维层,同时也会影响视盘的血液供应^[17],与本研究中离体细胞学实验结果相符。有研究发现,玻璃体切割术后视网膜早期的损伤,如内界膜脱落缺损或丢失、视神经纤维层外露、内丛状层和内核层水肿等主要发生于视网膜内层^[15-18]。此外,术后并发症,如暂时性视网膜水肿和暂时性视网膜代谢状态的紊乱最终导致 ERG 结果的改变。

本研究结果提示玻璃体切割术会对视网膜内层造成影响。研究发现 BSS 组实验眼暗适应 3.0 刺激下 a 波、b 波振幅低于 CEHS 组,既往用空气或硅油代替眼内介质以及在眼压急剧升高的时期也同样观察到了可逆的振幅降低^[19]。然而,ERG 结果显示,玻璃体切割术中不同成分的眼内介质时,术后视网膜的功能也会存在差异。Mizote 等^[20]和 Hirooka 等^[21]研究发现兔眼玻璃体切割术中压力引起的视网膜缺血后 7 d, RGC 数量减少,视网膜内丛状层厚度下降,而玻璃体切割术中用 D-allose 进行眼内冲洗可保护视网膜免受缺血损伤。本研究结果也显示,玻璃体切割术后用含有葡萄糖成分的 CEHS 进行眼内灌注后 ERG 各波振幅较不含葡萄糖成分的 BSS 更高,这可能是由于葡萄糖可为视网膜代谢提供能量,从而保护视网膜免受早期损伤所致。因此,在玻璃体切割术中使用含有葡萄糖成分的眼内灌注溶液有助于视网膜功能的恢复。

玻璃体切割术后视网膜功能和结构在较长时间内不会发生明显改变^[17-18]。本研究中离体细胞学实验结果显示,CEHS 和 BSS 眼内灌注液对眼组织细胞的影响有明显差异,而在体实验结果显示,术后短时间内视网膜功能和结构未见明显差异,表明在体内这种应激可能引发了更为复杂和有效的保护机制,值得进一步研究。

综上所述,本研究结果表明,玻璃体切割术中 CEHS 灌注液的应用对视网膜的保护作用优于 BSS 灌注液,灌注液中碳酸氢盐和葡萄糖成分可能在玻璃体切割术中起到重要作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Samuel MA, Desai UR, Strassman I, et al. Intraocular irrigating solutions. A clinical study of BSS plus and dextrose bicarbonate fortified BSS as an infusate during pars plana vitrectomy [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2003, 51(3) : 237-242.
- [2] Waltman SR, Carroll D, Schimmelpfenning W, et al. Intraocular irrigating solutions for clinical vitrectomy [J]. *Ophthalmic Surg*, 1975, 6(4) : 90-94.
- [3] Parel JM, Machemer R, Aumayr W. A new concept for vitreous surgery. 4. Improvements in instrumentation and illumination [J]. *Am J Ophthalmol*, 1974, 77(1) : 6-12.
- [4] AbdEl Dayem H, Hartzler M, Williams G, et al. The effect of vitrectomy infusion solutions on postoperative electroretinography and retina histology [J/OL]. *BMJ Open Ophthalmol*, 2017, 1(1) : e000004 [2020-12-03]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29354692>. DOI: 10.1136/bmjophth-2016-000004.
- [5] Hirata A, Yonemura N, Hasumura T, et al. Effect of infusion air pressure on visual field defects after macular hole surgery [J]. *Am J Ophthalmol*, 2000, 130(5) : 611-616. DOI: 10.1016/s0002-9394(00)00597-3.
- [6] Hu BJ, Du XL, Li WB, et al. Incomplete fluid-air exchange technique for idiopathic macular hole surgery [J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12(10) : 1582-1588. DOI: 10.18240/ijo.2019.10.10.
- [7] Scheerlinck LM, van der Valk R, van Leeuwen R. Predictive factors for postoperative visual acuity in idiopathic epiretinal membrane: a systematic review [J]. *Acta Ophthalmol*, 2015, 93(3) : 203-212. DOI: 10.1111/aos.12537.
- [8] Barth H, Crafoord S, Arnér K, et al. Inflammatory responses after vitrectomy with vitreous substitutes in a rabbit model [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2019, 257(4) : 769-783. DOI: 10.1007/s00417-019-04242-0.
- [9] Sesar A, Cavar I, Sesar AP, et al. Macular thickness after glaucoma filtration surgery [J]. *Coll Antropol*, 2013, 37(3) : 841-845.
- [10] Pritchard CD, Crafoord S, Andréasson S, et al. Evaluation of viscoelastic poly (ethylene glycol) sols as vitreous substitutes in an experimental vitrectomy model in rabbits [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(3) : 936-943. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.11.013.
- [11] Goyal MS, Raichle ME. Glucose requirements of the developing human brain [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2018, 66 Suppl 3 : S46-S49. DOI: 10.1097/MPG.0000000000001875.
- [12] Gao X, Lee K, Reid MA, et al. Serine availability influences mitochondrial dynamics and function through lipid metabolism [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(13) : 3507-3520. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.017.
- [13] Adeva-Andany M, López-Ojén M, Funcasta-Calderón R, et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health [J]. *Mitochondrion*, 2014, 17 : 76-100. DOI: 10.1016/j.mito.2014.05.007.
- [14] 孟自军, 祝磊. 玻璃体切除术中气体灌注对兔眼视网膜的损伤 [J]. *中华眼科杂志*, 2004, 40(11) : 760-764.
- [14] Meng ZJ, Zhu L. Study of retinal damage in rabbit eyes induced by air infusion during vitrectomy [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2004, 40(11) : 760-764.
- [15] Hasumura T, Yonemura N, Hirata A, et al. Retinal damage by air infusion during vitrectomy in rabbit eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(13) : 4300-4304.
- [16] Terasaki H. Relationship between vitrectomy and the morphology and function of the retina [J]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 2003, 107(12) : 836-864; discussion 865.
- [17] Cullinane AB, Cleary PE. Prevention of visual field defects after macular hole surgery [J]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 84(4) : 372-377. DOI: 10.1136/bjo.84.4.372.
- [18] Schanze T, Hesse L. Intraocular fluid-air exchange reduces retinal ganglion cell activity [J]. *Ophthalmologica*, 2007, 221(1) : 1-5. DOI: 10.1159/000096514.
- [19] Miyake Y, Horiguchi M. Electroretinographic alterations during vitrectomy in human eyes [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1998, 236(1) : 13-17. DOI: 10.1007/s004170050036.
- [20] Mizote M, Hirooka K, Fukuda K, et al. D-allose as ischemic retina injury inhibitor during rabbit vitrectomy [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2011, 55(3) : 294-300. DOI: 10.1007/s10384-011-0012-8.
- [21] Hirooka K, Miyamoto O, Jiming P, et al. Neuroprotective effects of D-allose against retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(4) : 1653-1657. DOI: 10.1167/iovs.05-1018.

(收稿日期:2021-04-06 修回日期:2021-10-06)

(本文编辑:张宇)