

小鼠经角膜视网膜下腔注射的方法学研究

戚艳 戴旭锋 张华 何颖 庞继景

【摘要】 **背景** 小鼠是眼科基因治疗、干细胞移植和眼底病研究的常用动物模型,视网膜下腔注射是上述研究中常用的实验技术,该技术的操作流程对研究的结果产生较大影响,但是目前对具体的视网膜下腔注射操作方法的介绍鲜见报道。**目的** 观察小鼠经角膜视网膜下腔注射对视网膜形态和功能的影响。**方法** 2月龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠充分扩瞳后,在眼科专用手术显微镜下用 30^{1/2}G 一次性注射针头在角膜缘内侧穿刺小鼠右眼角膜,用带有 33G 平针头的微量进样器沿穿刺口进入并绕过晶状体后到达玻璃体,然后逐渐进针至视网膜下腔,缓慢推注 1 μl 质量分数 0.1% 荧光素钠生理盐水注射液。根据注射后注射液在视网膜下腔的分布范围不同将实验眼分为 80% ~ 100% 范围组和 50% ~ 70% 范围组,模拟操作组以相同的方向进针至视网膜下腔但不注射溶液,小鼠的对侧眼(右眼)作为正常对照组,每组 4 只眼。分别于注射后 1、2、3 d 及注射后 5 周光学相干断层扫描(OCT)法观察各组小鼠视网膜的形态结构变化;于注射后 5 周时记录各组小鼠的视网膜电图(ERG),然后制备小鼠视网膜石蜡切片,采用苏木精-伊红染色观察各组小鼠视网膜的组织病理学改变。**结果** 注射眼注射后视网膜绿色荧光范围 > 50% 且无明显并发症者为注射成功,成功率 > 70%。OCT 观察显示,注射后 1 d 可见注射区域视网膜神经层与视网膜色素上皮(RPE)层脱离,局部视网膜隆起,注射后 2 d 注射区域视网膜复位。注射后 5 周,模拟操作组、50% ~ 70% 范围组、80% ~ 100% 范围组和正常对照组小鼠 ERG b 波振幅分别为(386.25 ± 37.88)、(357.50 ± 41.03)、(324.25 ± 53.45)和(410.50 ± 14.88) μV,4 个组间总体比较差异有统计学意义($F=3.574, P=0.047$),正常对照组 ERG b 波振幅明显高于 80% ~ 100% 范围组(均 $P < 0.05$)。组织病理学检查显示,模拟操作组、50% ~ 70% 范围组和 80% ~ 100% 范围组小鼠神经层与 RPE 层分离,视网膜外核层细胞增生和移位,其中 50% ~ 70% 范围组和 80% ~ 100% 范围组小鼠注射点周围区域视网膜外节排列紊乱。各组小鼠未注射区域视网膜各层结构均正常。**结论** 经角膜视网膜下腔注射法是一种安全、可行的操作方法。

【关键词】 注射/方法学; 眼科手术技术/方法; 视网膜/病理; 体层摄影术/光学相干性; 视网膜电图; 近交系 C57BL 小鼠

Methodology of trans-corneally subretinal injection in mice Qi Yan, Dai Xufeng, Zhang Hua, He Ying, Pang Jijing. School of Optometry and Ophthalmology, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China
Corresponding author: Pang Jijing, Email: jpangoph@hotmail.com

[Abstract] **Background** Trans-corneally subretinal injection in rodent model is a useful method for genetic therapy, stem cell transplantation and the study on the ophthalmic research. Standardized operation process is critical for the successful treatment. However, there is no literature to report the detailed procedure and the influence of this technique on morphology and function of retina. **Objective** This study was to introduce a method of trans-corneally subretinal injection and evaluate its influence on the morphology and function of retina. **Methods** Trans-corneally subretinal injection was performed on the left eyes of 2-month-old SPF C57BL/6J mice after dilation of pupils. A 30^{1/2}G disposable needle was used to puncture the cornea within the pupil area near limbus and avoid touching the lens and irises under eye surgery microscope. Then, a 33G blunt needle was used to insert into the vitreous and toward subretinal space via corneal puncture. Normal saline with 0.1% fluorescein sodium of 1 μl was slowly injected into the space, and 2.5% hydroxypropyl methylcellulose was dropped on ocular surface for the observation of the fundus clearly. According to the percentage of the retina filled with subretinally injected solution, the experimental eyes were divided into 80% - 100% area group, 50% - 70% area group after injection, and the mice in the pseudo-injected

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.005

基金项目: 国家自然科学基金项目(81371060)

作者单位: 325027 温州医科大学眼视光学院

通信作者: 庞继景, Email: jpangoph@hotmail.com

group, in which injection procedure stopped just before the solution was pushed in to the subretinal space did not inject any solution after punctured. The right uninjected eyes of the mice served as normal control group. Four eyes were selected for each group. The structural changes were evaluated by optical coherence tomography (OCT) 1 day, 2 days, 3 days and 5 weeks after injection, and retinal function was assessed by the record of electroretinography (ERG) 5 weeks after injection. The retinal specimens were prepared to examine the morphological changes by hematoxylin and eosin staining. The use of care followed the *Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals of Zhejiang Province*. **Results** About 70% of the injected eyes showed that retinal blebs filled with injected green fluorescein solution occupied 50% or more retinal area with minimal damages. The focal detachment between neurosensory retinal layer and retinal pigment epithelium (RPE) was exhibited 1 day postinjection, and almost all the retinas detached 2 days after injection. In the fifth week after injection, the amplitudes of ERG b wave were (386.25 ± 37.88) , (357.50 ± 41.03) , (324.25 ± 53.45) and $(410.50 \pm 14.88) \mu\text{V}$ in the sham operation group, 50%–70% area group, 80%–100% area group and normal control group, respectively, showing a significant difference among the 4 groups ($F=3.574, P=0.047$), and the amplitudes of b wave in the normal control group were higher than those in the 80%–100% area group (all at $P<0.05$). The detachment between retinal neuroepithelium layer and RPE layer, cell proliferation and transposition in the outer nuclear layer were displayed under the light microscope in the sham operation group, 50%–70% area group and 80%–100% area group, and the disordered outer segment of photoreceptors at the injecting area was seen in the 50%–70% area and 80%–100% area groups at five weeks after injection. However, retinal structure and morphology were normal at the non-injection area. **Conclusions** Trans-corneally subretinal injection is an effective and safe way for subretinal injection.

[Key words] Injections/methods; Ophthalmologic surgical procedures/methods; Retina/pathology; Tomography, optical coherence; Electroretinography; Mice, inbred C57BL

近年来,越来越多的视网膜疾病相关的突变基因模型被发现^[1],为相关疾病的基因诊断和治疗奠定了基础。随着视网膜变性疾病基因治疗技术的发展,研究者已在小鼠眼中实施了大量的实验以开展人类遗传性视网膜疾病的临床前研究^[2-8]。研究发现,大多数视网膜变性疾病发生于感光细胞或视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞,因此相关的临床前试验需要经视网膜下腔注射途径注射治疗载体以治疗相邻的光感受器细胞和 RPE 细胞,其主要原因在于视网膜下腔具有高度的免疫赦免特性,是基因治疗的理想部位。目前所用的视网膜下腔注射有 2 种方法,即经角膜途径视网膜下腔注射和经巩膜途径视网膜下腔注射,均可用于视网膜眼底疾病小鼠模型的基因治疗等^[3-14],但 2 种方法各有优缺点。经巩膜途径注射不会损伤角膜,但注射后视网膜隆起范围较小,载体感染率低,且白内障发生率高,一般用于眼球较大但晶状体体积相对较小的实验动物和睑裂及眼球还没发育完成的新生小鼠,而经角膜途径的视网膜下腔注射主要用于啮齿类成熟动物,注射时针头可绕过晶状体,白内障发生率低^[9],且进针注射点在视网膜后极部,注射范围大。曾有报道大鼠经角膜途径视网膜下腔注射的应用^[9],小鼠作为视网膜变性疾病的常用研究模型,视网膜下腔注射的详细操作方法鲜有报道。经角膜视网膜下腔注射易导致视网膜脱离,小鼠角膜表面

做一穿刺口可致小鼠眼底形成自发性视网膜脱离,且视网膜结构和功能可自行恢复^[10]。目前经角膜视网膜下腔注射所致的大面积自发性视网膜脱离及注射液不同的脱离范围的分布对小鼠视功能的影响鲜有研究。本研究中拟探讨最优的视网膜下腔注射方法及其对视网膜形态和功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 2 月龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 12 只(购自上海斯莱克实验动物有限责任公司)饲养于温州医科大学实验动物中心,喂养环境 12 h 光照/12 h 黑暗,动物自由采食及饮水,小鼠均以左眼进行视网膜下腔注射,右眼为正常对照组。实验动物的喂养和使用符合浙江省实验动物管理的有关规定和条例。

1.1.2 主要试剂及仪器 生理盐水(浙江天瑞药业有限公司);质量分数 1% 阿托品滴眼液、荧光素钠(美国 Alcon 公司);复方托吡卡胺滴眼液(沈阳兴齐眼药股份有限公司);盐酸四环素氯化可的松眼膏(南京白敬宇制药有限责任公司)。30^{1/2}G 一次性注射针头(美国 BD 公司);眼科实验手术显微镜(日本 Nikon 公司);眼科显微器械(苏州明仁医疗器械有限公司);微量进样器(美国 Hamilton 公司);KD-TS3 型自动组织脱水机(北京佳源兴业科技有限公司);Micron IV 视网

膜影像系统(美国 Phoenix Research Labs 公司);视觉电生理检测系统(德国 Roland 公司);明视野显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 经角膜视网膜下腔注射

注射前一天下午小鼠经 1% 阿托品滴眼液点眼 1 次,注射当日 8:00 ~ 12:00 使用 1% 阿托品滴眼液点眼,每小时 1 次,共 4 次,于 12:00 ~ 14:00 用复方托吡卡胺滴眼液点眼以快速扩瞳,每 30 分钟 1 次,共 4 次(对照眼术前准备相同)。扩瞳至能看见晶状体赤道部后,小鼠腹腔内注射氯胺酮(72 mg/kg)/甲苯噻嗪(4 mg/kg)行全身麻醉,用质量分数 0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液点眼以局部麻醉。剪去小鼠胡须,将小鼠倾斜放于一硬质纸板上,头部抬高,操作者用一手固定小鼠体位。在小鼠结膜囊点质量分数 2.5% 羟丙基甲基纤维素以观察眼底。微量进样器术前经体积分数 75% 乙醇消毒。解剖显微镜下在瞳孔缘内 1 mm 处用 30^{1/2}G 的一次性针头穿刺角膜,针头斜面向上垂直进入角膜全层的 80% 深度时,使针尖平行于晶状体前表面进入前房,避免伤及虹膜和晶状体。然后用带 33G 平针头微量进样器沿穿刺口平行于晶状体进入前房,针头绕过晶状体后至玻璃体,接触视网膜表面,继续进针至视网膜下腔。此时将微量进样器固定,试探性缓慢推动进样器活塞,将带有少量荧光素钠的生理盐水注射液注入视网膜下腔。如有绿色液体漏出,提示深度不够,需继续进针少许;如长时间未见视网膜隆起并伴有巩膜绿染,提示可能进针太深。约 45 s 注入 1 μ l 溶液,然后针头缓慢撤回,避免损伤虹膜及晶状体。注射后小鼠用 2.5% 羟丙基甲基纤维素点入结膜囊以观察眼底情况及荧光染料在视网膜的分布范围。

1.2.2 实验动物分组及注射后处理

注射眼根据术后荧光染料分布范围分为 50% ~ 70% 范围组和 80% ~ 100% 范围组,模拟操作组以相同的方向进针至视网膜下腔但不注射溶液,然后直接退针,正常对照组不进行任何操作(图 1),每组 4 只眼。为避免感染并减轻因虹膜刺激而引起的渗出反应,避免虹膜粘连,注射眼用阿托品滴眼液及盐酸四环素醋酸可的松眼膏点眼,注射当日点眼 1 次,术后 1 ~ 3 d 每天点眼 2 次,术后 4 ~ 7 d 每天点眼 1 次,术后第 2 周给药 2 次,术后第 3 周给药 1 次。

1.2.3 小鼠眼底 OCT 检测及眼底照相

分别于视网膜下腔注射后 1、2、3 d 使用 Micron IV 视网膜影像系统进行光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)检查。检查前小鼠用复方托吡卡胺滴眼液点眼

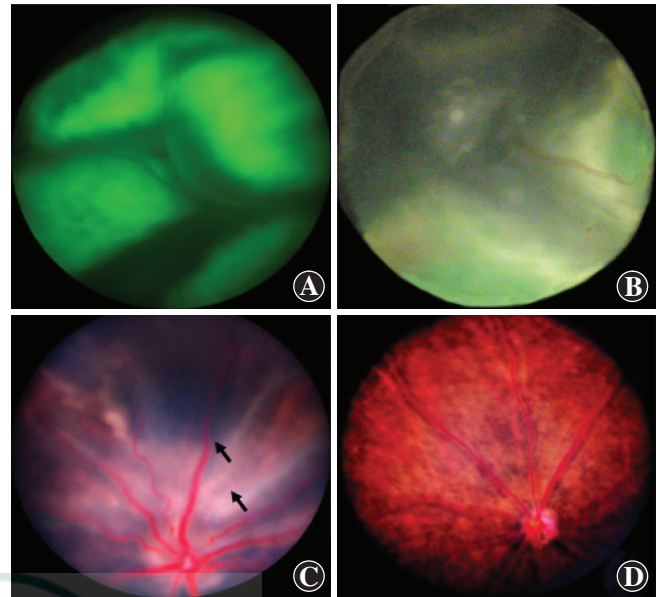


图 1 小鼠注射后眼底图像 A:注射后视网膜全层视网膜脱离,可见荧光染料弥漫分布于视网膜,绿色荧光处可见视网膜血管 B:注射后视网膜隆起范围为 50%,局部呈绿色荧光,可见视网膜血管 C:模拟视网膜下腔注射后眼底图像,眼底出现部分视网膜脱离(黑箭头) D:未注射对照小鼠眼底图像

扩瞳,全身麻醉后剪去胡须,放置在设备配套的动物台上。用 2.5% 羟丙基甲基纤维素湿润角膜,同时开启 OCT 检查系统和眼底照相系统,调节动物实验台,使角膜与镜头接触,获取眼底图像,参考眼底图像对全视网膜区域进行线性水平扫描,获取清晰的 OCT 图像。开启眼底照相系统对小鼠进行眼底照相,具体操作同上。

1.2.4 小鼠视网膜电图的检测

于注射后 5 周行小鼠视网膜电图(electroretinogram, ERG)检测。检查前小鼠暗适应过夜,ERG 检测均设在下午时段,检查在暗室内的暗红光($\lambda > 650$ nm)下操作。小鼠置于 37 $^{\circ}$ C 恒温台上,用复方托吡卡胺滴眼液点眼,全身麻醉下剪去胡须。将参考电极和地电极分别插入头部和尾根部皮下,用金制环形电极放置在角膜表面,用少量 0.5% 羟甲基纤维素滴眼液点眼保护角膜并减少干扰。记录 $-1.850 \log \text{cd}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ 和 $0 \log \text{cd}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ 光照度下的全视野暗适应 ERG,然后小鼠在亮度为 $30 \text{cd}/\text{m}^2$ 的背景光中明适应 10 min,再记录 $0.65 \log \text{cd}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ 光强度下的明适应 ERG。

1.2.5 小鼠视网膜组织病理学检查

ERG 检测后用颈椎脱臼法处死小鼠,充分暴露眼球,使用显微细线镊夹住眼球底部向上提起,剪去眼球周围的结膜和肌肉组织,完整取出眼球,置于体积分数 10% 甲醛中固定 24 h,剪去角膜、虹膜和晶状体,制备眼杯标本。将眼杯置于自动组织脱水机上脱水,浸蜡 24 h 制蜡块。使用石蜡切片机 5 μ m 厚切片,行苏木精-伊红染色,用

明视野显微镜观察视网膜结构变化并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 W 检验接近正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,组间均数经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组 4 水平实验设计,正常对照组、模拟操作组、50% ~ 70% 范围组和 80% ~ 100% 范围组间小鼠 ERG b 波振幅的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜的 OCT 表现

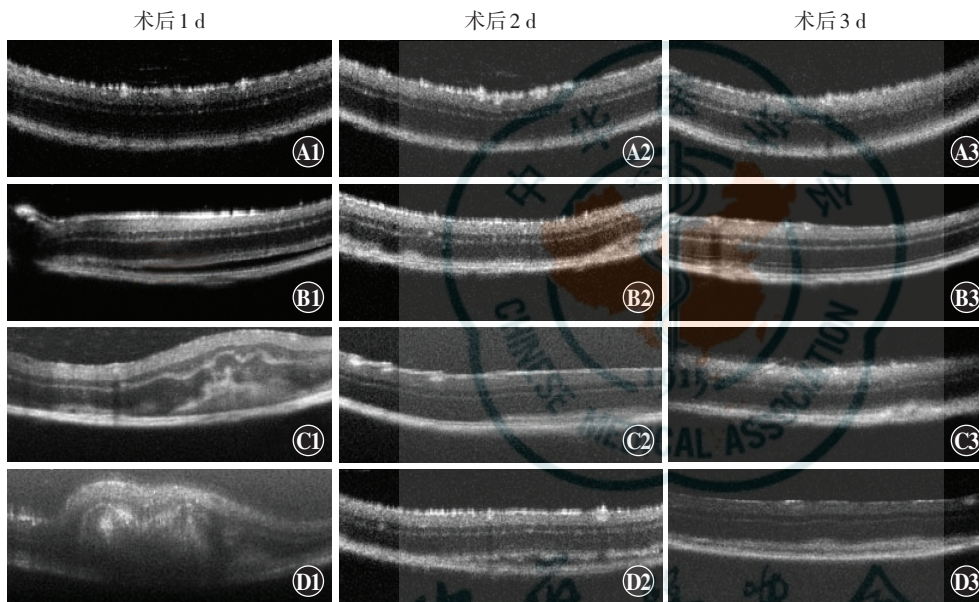


图 2 各组 C57BL/6J 小鼠视网膜下腔注射后 OCT 表现 A1 ~ A3: 2 月龄小鼠正常眼术后 1、2、3 d 视网膜厚度和结构均正常 B1: 模拟操作组术后 1 d 视网膜神经上皮层与 RPE 层轻度分离 B2: 模拟操作组术后 2 d 视网膜结构和 RPE 层与术后 1 d 比较趋于贴合 B3: 模拟操作组术后 3 d 视网膜完全复位 C1: 50% ~ 70% 范围组注射后 1 d 视网膜可见局部隆起 C2: 50% ~ 70% 范围组注射后 2 d 视网膜局部隆起较 1 d 时减轻, 神经视网膜层与 RPE 层贴合 C3: 注射后 3 d 50% ~ 70% 范围组视网膜复位 D1: 80% ~ 100% 范围组注射后 1 d 视网膜可见一较大范围的隆起 D2: 80% ~ 100% 范围组注射后 2 d 神经视网膜层与 RPE 层贴合紧密 D3: 80% ~ 100% 范围组注射后 3 d 视网膜复位

2.2 各组小鼠视网膜下腔注射后 5 周 ERG 变化

视网膜下腔注射后 5 周, 模拟操作组小鼠 ERG b 波振幅为 $(386.25 \pm 37.88) \mu V$, 50% ~ 70% 范围组为 $(357.50 \pm 41.03) \mu V$, 80% ~ 100% 范围组为 $(324.25 \pm 53.45) \mu V$, 而正常对照组为 $(410.50 \pm 14.88) \mu V$, 4 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 3.574, P = 0.047$)。模拟操作组及 50% ~ 70% 范围组比较 ERG b 波振幅较正常对照组均有所下降, 但差异均无统计学意义 ($t = 0.871, 1.904$, 均 $P > 0.05$), 80% ~ 100% 范围组 ERG b 波振幅明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t = 3.099, P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模拟操作组 ERG b 波振幅降低了 6%, 50% ~ 70% 范围组 b 波振幅降低了 13%, 而 80% ~ 100% 范围组 b 波振幅降低了 21% (图 3)。

2.3 各组小鼠视网膜下腔注射后 5 周视网膜的组织病理学变化

OCT 检查显示, 正常对照组小鼠视网膜结构完整, 与 RPE 层贴合紧密, 无视网膜脱离 (图 2A)。模拟操作组小鼠因角膜穿刺时房水外流、眼底负压形成而导致自发性视网膜脱离, 最大可达 100% 视网膜范围, 注射后 1 d 视网膜趋于平坦, 注射后 2 d 视网膜与 RPE 层贴附, 注射后 3 d 视网膜完全复位, 视网膜结构与 RPE 层贴合紧密 (图 2B)。50% ~ 70% 范围组注射后 1 d 可见注射区仍有小范围的局部隆起, 注射后 2 d 视网膜与 RPE 层贴附, 注射后 3 d 视网膜完全复位 (图 2C)。80% ~ 100% 范围组注射后 1 d 注射区内可见一较大范围的隆起, 注射后 2 d 视网膜基本复位, 注射后 3 d 明显复位 (图 2D)。

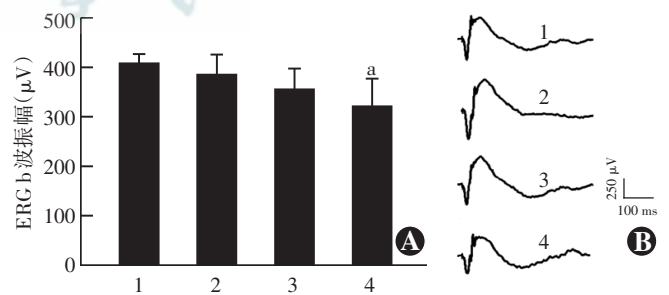


图 3 小鼠视网膜下腔注射后 5 周 ERG 的检测 A: 各组小鼠注射后 5 周视网膜最大混合反应 b 波振幅的量化比较 ($F = 3.574, P = 0.047$), 与正常对照组比较, $*P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验) ($n = 4$) B: 各组小鼠注射后 5 周视网膜最大混合反应波形 可见正常对照组、模拟操作组和 50% ~ 70% 视网膜脱离组小鼠 ERG b 波波幅接近, 而 80% ~ 100% 视网膜脱离组 b 波波幅下降 1: 正常对照组 2: 模拟操作组 3: 50% ~ 70% 范围组 4: 80% ~ 100% 范围组 ERG: 视网膜电图

小鼠视网膜组织病理学检查显示, 各注射组注射区域视网膜神经上皮层与 RPE 层出现分离, 可见视网

膜局限性隆起,光学显微镜下可见视网膜外核层细胞增生和移位,其中 50% ~ 70% 范围组和 80% ~ 100% 范围组小鼠注射点周围区域视细胞外节排列不整齐,

80% ~ 100% 范围组视细胞外节稍变短,各组小鼠未注射区域视网膜各层结构均正常,视网膜各层细胞排列规则(图 4)。

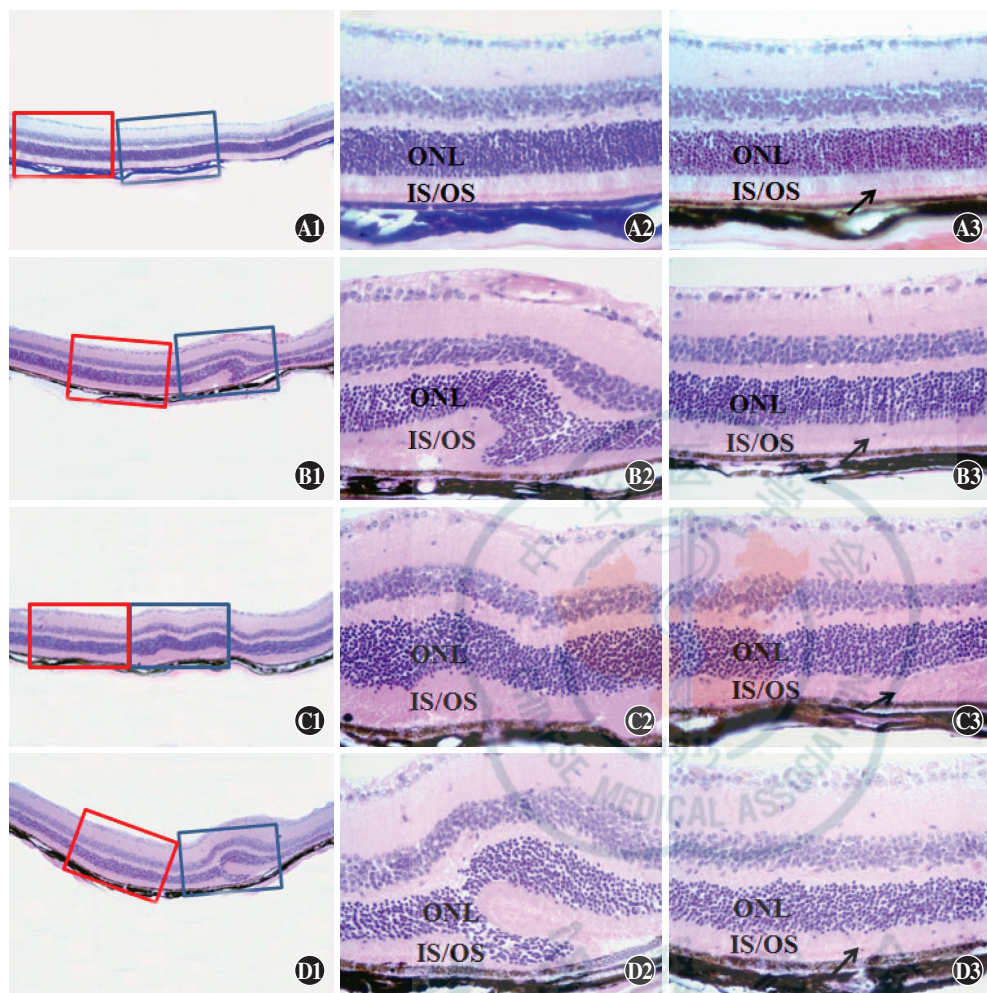


图 4 注射后 5 周小鼠视网膜组织病理学检查 A1:正常对照组小鼠视网膜各层组织结构正常(HE ×100) A2:图 A1 的蓝色标记区域视网膜各层结构正常(HE ×400) A3:图 A1 的红色标记区域视网膜各层结构正常(箭头)(HE ×400) B1:模拟操作组注射处可见视网膜外核层结构异常(HE ×100) B2:图 B1 蓝色标记区域可见视网膜厚度增加,视网膜外核层细胞移位(HE ×400) B3:图 B1 红色标记区域视网膜结构恢复正常(箭头)(HE ×400) C1:50% ~ 70% 范围组可见 2 个局限性视网膜隆起(HE ×100) C2:图 C1 蓝色标记区域视网膜外核层及视细胞外节均隆起(HE ×400) C3:图 C1 红色标记区域可见视网膜各层排列接近正常(箭头)(HE ×400) D1:80% ~ 100% 范围组注射区有较大范围的视网膜隆起(×100) D2:图 D1 蓝色标记区域可见视网膜外核层细胞减少,排列紊乱,视网膜感光细胞内节、外节隆起范围大(HE ×400) D3:图 D1 红色标记区域视网膜各层结构排列整齐,视网膜各层复位(箭头)(HE ×400) ONL:外核层 IS:内节 OS:外节

3 讨论

视网膜下腔注射的方法为视网膜变性疾病的基因治疗提供了具有可行性的操作途径^[11],是眼底遗传性疾病基础研究中常用的实验技术。既往研究表明,视网膜下腔注射介导的基因治疗技术可恢复视网膜变性小鼠的部分视功能^[2-8],但是视网膜下腔注射引起的视网膜脱离究竟对治疗后视细胞的形态和功能会产生怎样的影响,目前鲜有研究和报道,而眼后节 OCT 测量技术和 ERG 记录技术可为基因治疗后视网膜形态学和功能学的检查和评估提供依据,本研究主要介绍基因治疗相关的视网膜下腔注射操作方法,并确认注射后视网膜解剖复位的时间、术后形态和功能的变化。

小鼠眼行角膜穿刺后可致不同程度的自发性视网膜脱离^[10],本研究中根据注射后绿色注射液在视网膜

下的分布范围,而不是单纯根据视网膜脱离的范围进行分组,对动物模型的治疗具有重要研究意义。研究显示视网膜下腔注射后 1 d,80% ~ 100% 范围组和 50% ~ 70% 范围组仍存在不同程度的视网膜小隆起,而 Nour 等^[13]研究发现术后 1 d 视网膜已复位,可能与本研究中视网膜脱离范围均超过 50% 有关。本研究中发现,50% ~ 70% 范围组和 80% ~ 100% 范围组小鼠注射后 2 d 神经视网膜层和 RPE 层贴合紧密,达到解剖学复位,而模拟操作组在术后 1 d 神经视网膜层即复位,而 80% ~ 100% 范围组和 50% ~ 70% 范围组视网膜下腔注射生理盐水荧光素钠后注射液的吸收也可影响视网膜完全复位的时间。本研究中视网膜功能学研究发现,各注射组小鼠 ERG 最大混合反应的 b 波振幅均不同程度下降,50% ~ 70% 范围组和 80% ~ 100% 范围组较模拟操作组下降更为明显,与 OCT 检

查的形态学研究结果相对应,同时 OCT 检查还显示模拟操作组小鼠视网膜形态学变化恢复较快。

本研究中对经角膜视网膜下腔注射的方法学及其注射本身对视网膜形态和功能的影响进行探讨和评估,并阐述了详细的操作流程及其可行性,但需指出的是,出生后不足 14 d 的未睁眼小鼠,特别是生后 1 周内的小鼠因眼球小,发育不完全,药物扩瞳不易,因此行经角膜视网膜下腔注射可能会导致小鼠角膜、虹膜、晶状体及视网膜损伤,应选择经巩膜视网膜下腔注射法,即在穿刺口直接进针,无需进针至对侧视网膜下腔,降低操作引起邻近组织损害的风险^[11]。既往研究认为,经角膜视网膜下腔注射法对视网膜结构及功能造成的影响可在注射后 5 周内修复^[14],因此本研究中选择注射后 3 d 及注射后 5 周的视网膜形态和功能进行观察,但未进行多个时间点的动态观察,因此缺乏注射后每周小鼠形态和功能变化规律的观察结果,这也是我们应进一步研究的内容。关于视网膜下腔注射技术,目前注射器械的设计也日渐合理,使用微细钝针头操作时对组织的损伤更少,此项技术也较为成熟。操作时仍需要注意:(1)术前应充分扩瞳^[15],角膜穿刺点靠近角巩缘处为好,以免形成角膜白斑而影响治疗,对动物的行为学测试,但穿刺点不能过于接近瞳孔缘,防止操作造成瞳孔缩小,不易看清眼底,降低注射成功率,此外瞳孔缩小也是造成术中虹膜出血或虹膜粘连的主要原因。(2)角膜穿刺时针头斜面向上,当垂直进入角膜全层的 80% 深度时,针尖方向应改为平行于晶状体前表面并缓慢进入前房,避免伤及虹膜和晶状体,以及因房水迅速流出后负压增大而导致视网膜隆起过大而和晶状体后囊膜粘连。针尖进入前房后 90° 转角绕过晶状体至视网膜下腔,可最大程度地避免损伤晶状体皮质。(3)注射液应缓慢推注至视网膜下腔,防止快速推注造成返流。(4)为防止术后发生虹膜角膜粘连,术后应用药物充分扩瞳。为降低术后出血的发生率,在微量进样针穿过角膜穿刺口进入视网膜下腔之前可在角膜表面点透明质酸钠滴眼液 1 滴,调节显微镜焦距,在可视眼底的情况下选择血管较少区域进行注射,防止针头刺破血管。

本研究中应用的经角膜视网膜下腔注射为今后进行眼部变性疾病的基因治疗和干细胞移植以及其他相关研究提供了方法学支持。

参考文献

[1] Stieger KK, Lorenz B. Gene therapy for vision loss-recent developments [J]. *Discov Med*, 2010, 10(54): 425-433.

- [2] Dai X, Han J, Qi Y, et al. AAV-mediated lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (Lpcat1) gene replacement therapy rescues retinal degeneration in rd11 mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(3): 1724-1734. doi:10.1167/iovs.13-13654.
- [3] Pang JJ, Deng WT, Dai X, et al. AAV-mediated cone rescue in a naturally occurring mouse model of CNGA3-achromatopsia [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35250 [2012-04-11]. <http://journals.plos.org/plosone/article?doi=10.1371/journal.pone.0035250>. doi: 10.1371/journal.pone.0035250.
- [4] Pang J, Boye SE, Lei B, et al. Self-complementary AAV-mediated gene therapy restores cone function and prevents cone degeneration in two models of Rpe65 deficiency [J]. *Gene Ther*, 2010, 17(7): 815-826. doi:10.1038/gt.2010.29.
- [5] Mao H, Gorbatyuk MS, Rossmiller B, et al. Long-term rescue of retinal structure and function by rhodopsin RNA replacement with a single adeno-associated viral vector in P23H RHO transgenic mice [J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(4): 356-366. doi:10.1089/hum.2011.213.
- [6] Pang JJ, Dai X, Boye SE, et al. Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(2): 234-242. doi:10.1038/mt.2010.273.
- [7] Li X, Li W, Dai X, et al. Gene therapy rescues cone structure and function in the 3-month-old rd12 mouse; a model for midcourse RPE65 leber congenital amaurosis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(1): 7-15. doi:10.1167/iovs.10-6138.
- [8] Pang JJ, Chang B, Kumar A, et al. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis [J]. *Mol Ther*, 2006, 13(3): 565-572. doi:10.1016/j.yjme.2005.09.001.
- [9] Timmers AM, Zhang H, Squitieri A, et al. Subretinal injections in rodent eyes: effects on electrophysiology and histology of rat retina [J]. *Mol Vis*, 2001, 7: 131-137.
- [10] Zeng R, Zhang Y, Shi F, et al. A novel experimental mouse model of retinal detachment: complete functional and histologic recovery of the retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(3): 1685-1695. doi: 10.1167/iovs.11-8241.
- [11] Wert KJ, Skeie JM, Davis RJ, et al. Subretinal injection of gene therapy vectors and stem cells in the perinatal mouse eye [J/OL]. *J Vis Exp*, 2012, (69): e4286 [2012-11-25]. <http://www.jove.com/video/4286/subretinal-injection-gene-therapy-vectors-stem-cells-perinatal-mouse>. doi:10.3791/4286.
- [12] Kong F, Li W, Li X, et al. Self-complementary AAV5 vector facilitates quicker transgene expression in photoreceptor and retinal pigment epithelial cells of normal mouse [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90(5): 546-554. doi:10.1016/j.exer.2010.01.011.
- [13] Nour M, Quiambao AB, Peterson WM, et al. P2Y(2) receptor agonist INS37217 enhances functional recovery after detachment caused by subretinal injection in normal and rds mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(10): 4505-4514.
- [14] Pang JJ, Lauramore A, Deng WT, et al. Comparative analysis of in vivo and in vitro AAV vector transduction in the neonatal mouse retina: effects of serotype and site of administration [J]. *Vision Res*, 2008, 48(3): 377-385. doi:10.1016/j.visres.2007.08.009.
- [15] Pang J, Cheng M, Haire SE, et al. Efficiency of lentiviral transduction during development in normal and rd mice [J]. *Mol Vis*, 2006, 12: 756-767.

(收稿日期:2015-04-13)

(本文编辑:尹卫靖)