

2005 全国博士生学术论坛（眼科学）

2005 Doctoral Forum of China - Ophthalmology

“新挑战 新视角 新纪元”

论文汇编

2005 全国博士生学术论坛（眼科学）组委会

首都医科大学 中国 北京





2005 全国博士生学术论坛（眼科学）

2005 Doctoral Forum of China—Ophthalmology

2005 年 10 月 20—23 日 中国 北京

主办单位：国务院学位委员会办公室

教育部学位管理与研究生教育司

承办单位：首都医科大学（研究生院，附属北京同仁医院，北京眼科学院，北京同仁眼科中心）

协办单位：中华医学会眼科学分会

中山大学中山眼科中心（教育部重点学科）

北京大学眼科（教育部重点学科）

复旦大学眼科（教育部重点学科）

论坛网址：<http://www.cpums.edu.cn>；<http://www.trhos.com>

PL001: 缺氧低糖对体外视网膜内层屏障模型通透性影响

郭斌^{1*} 惠延年¹ 王莉² 叶盛开³ 郭爱林⁴ 王雨生¹ 王应利¹ 马吉献¹

¹西安第四军医大学西京医院全军眼科研究所

²南京第81医院全军肿瘤中心

³西安第四军医大学唐都医院血液内科

⁴广州中山大学医学院病理教研室

目的:大鼠视网膜微血管内皮细胞(RMEC)和Müller细胞共培养,模拟视网膜内层屏障(iBRB),观察缺氧低糖条件下iBRB通透性变化。
方法:免疫磁珠方法纯化培养RMEC,改良Reichenbach等方法培养Müller细胞。将RMEC(P5~6)与Müller细胞(P3~5)接种于Transwell小室滤膜的两侧,模拟iBRB结构,模型共培养约一周后,跨内皮阻抗(TEER) $>100 \Omega \text{ cm}^2$,进行下一步实验。预实验发现完全更换培养液48 h后,大约有50%以上葡萄糖被消耗掉,细胞处于低糖水平,所以模型培养48 h进一步实验。培养液中加入 CoCl_2 方法建立缺氧环境,每个处理组中加入 CoCl_2 使终浓度为 $125 \mu\text{M}$,再加入 $200 \mu\text{L}$ 胎牛血清,两种方法联合建立低糖缺氧环境(OGD)。测定在低糖、OGD和正常对照处理条件下,RMEC培养组和共培养组在6、12、24、48 h时RMEC单层的跨细胞通透性变化。处理结束后,加 $500 \mu\text{L}$ (1 mg/ml)的TRITC-白蛋白到顶室孵育,在顶室和底室分别取样 $100 \mu\text{L}$,检测荧光强度。内皮细胞单层对白蛋白通透性大小用通透系数 P 表示,按以下公式计算: $P = [A]/[tx]/[A \times v]/[L]$ 。首先测出无RMEC膜 P_t 和含RMEC膜 P_t ,代入公式 $1/P_e = 1/P_t + 1/P_f$ 获得RMEC单层的 P_e 。实验结果以 P_e 变化率表示, $P_e\% = (\text{处理}$

组 P_e 值/对照组 P_e 值) $\times 100$ 。测量TEER、抗紧密连接蛋白ZO-1免疫组织荧光化学和蛋白电泳分析ZO-1表达。**结果:**低糖和OGD处理不同时间共培养组和RMEC组 $P_e\%$ 变化情况(见表)。其中低糖和OGD条件下,6h和12h各组变化无明显差异($P > 0.01$)。OGD处理24h和48h,共培养组通透性变化要明显高于RMEC组($P < 0.01$),而低糖处理48h,共培养组通透性变化要明显高于RMEC组($P < 0.01$)。24h前各组,正常对照、低糖和OGD处理后各组之间TEER值没有明显差异。48h组,OGD ($(63.3 \pm 17.6) \Omega \text{ cm}^2$) $<$ 低糖组 ($(81.2 \pm 9.5) \Omega \text{ cm}^2$) $<$ 对照 ($(127.5 \pm 25.3) \Omega \text{ cm}^2$) ($P < 0.01$)。ZO-1免疫荧光组化未发现各组有明显差异以及细胞间有明显的间隙出现,蛋白电泳各组之间无明显差异。

结论:低糖和OGD可以造成RMEC单层通透性增加,iBRB形成早期Müller细胞诱导RMEC更好的分化,所以在共培养模型早期RMEC单层通透性增加程度小,晚期Müller细胞自身活性降低,可能分泌一些因子促进了RMEC单层通透性增加,这些主要作用在跨细胞途径上。TEER值的降低也说明细胞旁途径也受到影响,而ZO-1变化较小,可能还有其它紧密连接蛋白表达受到影响。

表 缺氧和OGD处理不同时间共培养组和RMEC组 $P_e\%$ 变化情况

处理时间 (h)	共培养组		RMEC 组	
	低糖	OGD	低糖	OGD
6	120.5 $\pm$ 7.9	124.7 $\pm$ 15.2	135.4 $\pm$ 8.8	131.4 $\pm$ 20.1
12	118.4 $\pm$ 23.6	137.6 $\pm$ 31.4	129.6 $\pm$ 12.3	154.3 $\pm$ 10.5
24	163.2 $\pm$ 29.5	206.4 $\pm$ 20.7	141.6 $\pm$ 23.7	186.1 $\pm$ 13.3
48	290.7 $\pm$ 30.1	371.4 $\pm$ 40.5	254.1 $\pm$ 27.6	267.9 $\pm$ 35.8

PL 002: 板层角膜移植术治疗真菌性角膜炎术后复发的危险因素分析

胡建章* 谢立信

山东省眼科研究所 青岛眼科医院

目的: 分析板层角膜移植术(LKP)治疗真菌性角膜炎术后复发的危险因素。**方法:** 收集1998年1月至2005年5月在青岛眼科医院和山东省眼科医院经手术治疗确诊的真菌性角膜炎患者844例(844只眼),其中行LKP治疗206例(206只眼),术后17例真菌复发,比较在不同病程、菌属及术前是否经糖皮质激素/免疫抑制剂治疗、是否前房积脓/内皮斑等因素存在下行LKP治疗术后真菌未复发或复发病例的分布情况。**结果:** (1)随着病程发展,LKP术后未复发病例占同期总手术病例的百分比逐渐降低($P=0.000$),LKP术后复发率则逐

渐升高($P=0.0001$);(2)镰刀菌性角膜炎行LKP术后未复发病例占总手术病例的百分比高于曲霉菌属($p=0.035$),曲霉菌属LKP术后复发率则高于镰刀菌属($P=0.047$);(3)术前应用皮质激素/免疫抑制剂治疗的病例行LKP术后复发率较高($P=0.006$);(4)术前后房积脓/内皮斑的病例行LKP术后复发率较高($P=0.004$)。**结论:** 病程长、曲霉菌属、术前经糖皮质激素/免疫抑制剂治疗及前房积脓/内皮斑等是真菌性角膜炎选择LKP治疗术后复发的危险因素。

PL 003: 前表面磷脂修饰的硅凝胶人工晶状体表面特性及生物相容性研究

黄晓丹¹ 姚克¹ 曲超² 黄小军³ 徐志康³

浙江大学附属第二医院眼科中心¹ 四川省人民医院眼科² 浙江大学材化学院高分子科学研究所³

通讯作者: 姚克

E-mail: xlren@zju.edu.cn

目的: 提高硅凝胶人工晶状体前表面的生物相容性以减少术后炎症反应,且保持硅凝胶人工晶状体后表面疏水特性抑制后囊膜混浊,设计并研制一种前表面亲水后表面疏水的新型人工晶状体。**方法:** 本实验采用低温等离子体表面改性的方法将2-甲基丙烯酰氧乙基-2'-三(三甲基)乙基磷酸酯(简称为MPC)接枝聚合于硅凝胶人工晶状体前表面。用X-射线光电子能谱(XPS)、接触角、电镜进行其表面特性分析;用国家标准进行表面光学、力学性能检测;表面血小板和巨噬细胞黏附实验检测其生物相容性。**结果:** 表面电子能谱元素分析证实人工晶状体前表面成功接枝磷脂;接触角检测显示前表面磷脂修饰的硅凝胶人工晶状体具有前表面亲水

后表面疏水的特性;电镜检测显示表面光滑无损伤;光学、力学检测证实人工晶状体光焦度、像质、透过率、抗疲劳强度符合国家表标准。血小板和细胞粘附性测试结果表明磷脂接枝的亲水前表面能降低血小板和巨噬细胞的粘附。**结论:** 采用等离子体进行硅凝胶人工晶状体前表面的磷脂修饰是可行的。修饰后亲水的前表面能减少血小板和巨噬细胞黏附,而保持疏水特性的后表面能抑制后发障的形成。这种前表面亲水后表面疏水的新型人工晶状体具有更好的生物相容性。

关键词: 人工晶状体 磷脂 表面修饰 细胞黏附 生物相容性

PL 004: Dynamic Morphology of Corneal Neovascularization Induced By

Alkali-Burn Is related with Inflammation

Aihua Jiang, Zuguo Liu*

Zhongshan Ophthalmic Center, Zhongshan Ocular Surface Center, Sun Yat-sen University,

Email: zuguol@yahoo.com

Introduction and purpose: Corneal neovascularization (CNV) is a serious problem requiring further studies. Previous research focus on the quantity of CNV. Area of CNV as the only standard for evaluating CNV cannot reflect the complicated process of angiogenesis. In the field of tumor angiogenesis, quality of new blood vessel, including permeability, maturation and morphology has become the new hot point. Cornea is the best tissue to observe the morphology of new blood vessel. Here we observe the dynamic morphology of inflammatory CNV induced by alkali-burn and evaluate the effect of inflammation on the dynamic morphology of CNV. **Methods:** CNV was induced by alkali-burn for 30 sec or 15 sec, treated with NS or 0.1% dexamethasone. CNV morphology, area, inflammatory index were observed and scored on the 1st, 2nd, 3rd, 5th, and 7th day after cauterization. CNV morphology was recorded by the simple Chinese Ink perfusion method. Endothelial cells and inflammatory cells invasion in the cornea were counted by cell count on paraffin-embedded corneal sections. IL-1b and VEGF expression on cornea were quantified by ELISA. **Results:** Inflammatory CNV growth induced

by alkali-burn has regular dynamic morphological changes and was related with severity of inflammation. On the first day, inflammatory cell invasion was high, with only loops could be observed. On the second day, inflammatory index, IL-1b and VEGF expression on cornea reached peak, when morphologically, sprouts grew from the loops and continued to grow into trunks with open ending. Then new sprouts grew from the end of trunks. On the fifth day, inflammatory index and VEGF expression reaches another peak when sprouts from the end of trunks grew into thick branches. When inflammatory index and VEGF expression decreased on the 7th day, branches connected with each other and formed loops again. 0.1% dexamethasone effectively inhibited inflammatory index, inflammatory cell invasion, IL-1b expression and VEGF expression. At the same time block the CNV develop from loops to trunks. **Conclusion:** Dynamic morphological changes of CNV can be divided into four stages: loop, trunk, branche and reloop. The onset of each stage is related with inflammation, which is reflected by inflammatory index, inflammatory cell invasion, as well as the expression of IL-1 b and VEGF on cornea.

PL 005: 人角膜缘上皮细胞建系的深入研究

刘敬波 王智崇* 葛坚* 黄冰 宋革 刘炳乾 胥莹 马宁 熊翠菊 魏雁涛 江儒章

中山眼科中心

E-mail: wzc001@hotmail.com

目的: 探讨人角膜缘上皮细胞建系过程中, 细胞生物学特性, 蛋白表达, 生长动力学, 染色体,

致瘤性等特征变化。**方法:** 采用消化培养法, 组织块培养法, 饲养层培养法体外培养人角膜缘上皮细

胞, 连续传代, 纯化后建立细胞系。培养过程中采用免疫细胞组化, Western blot 方法鉴定细胞中上皮细胞特异性蛋白-角质蛋白 3 (CK3), 增殖细胞核抗原 (PCNA), 转录因子 P63 的表达; 细胞传代培养 4h, 6h, 8h 分别收集未贴壁细胞, 计算细胞贴壁率; 用 MTT 法描绘细胞生长曲线, 计算细胞倍增时间; 进行细胞染色体分析; 用 Transwell 培养板形成气液界面进行上皮细胞复层形成实验; 采用裸鼠颈背部皮下接种第 30 代上皮细胞的方法检测细胞致瘤性。**结果:** 人角膜缘上皮细胞在体外已经成功传代 60 代, 细胞成多边形, 表达 CK3, PCNA,

第 5 代前细胞有 P63 表达, 5 代后细胞渐无表达; 40 代细胞的 4h, 6h, 8h 贴壁率分别为 40.7%, 62.5%, 81.8%; P1, P15, P20, P40 代细胞的倍增时间分别为 31.5h, 24.4h, 26.4h, 25.8h; 染色体分析结果表明细胞为多倍体, 异倍体核形; 细胞在气液界面条件下可以形成 2-3 层角膜上皮; 裸鼠体内接种 80 天未观察有肿瘤的生长。**结论:** 建立的人角膜上皮细胞系具备上皮细胞的基本特征, 为角膜病在细胞水平的研究和组织工程化角膜的构建提供了细胞来源。

PL 006: *Pax6* Over-expression Suppresses Cell Proliferation and Retards the Cell

Cycle in Corneal Epithelial Cells

Jie Ouyang* and M. Elizabeth Fini

Bascom Palmer Eye Institute and Graduate Program in Physiology and Biophysics, University of Miami Miller School of Medicine

E-mail: jouyang@newssun.med.miami.edu

Purpose: To determine the effect of expression level of *Pax6* transcription factor in controlling proliferation, cell cycle progression and apoptosis in corneal epithelial cells. **Methods:** The full-length mouse *Pax6* (*mPax*) or truncated *mPax6*Δ286 transgene was inserted into a tetracycline-based (Tet-on) inducible gene expression vector. A rabbit corneal epithelial cell line SIRC was used to establish stable transformants carrying the inducible *mPax6* or *mPax6*Δ286. Induction of *Pax6* protein or truncated *Pax6*Δ286 protein by doxycycline (DOX) was examined by western blot and immunocytochemistry. Cell proliferation index, cell growth curve and cell cycle assay were compared in induced and non-induced *mPax6* or *mPax6* Δ286 transformed SIRC cells. Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) assay was performed to detect apoptotic cells. Recombinant

adenovirus carrying *mPax6* or *mPax6* Δ286 transgene was used to transiently transduce primary rabbit corneal epithelium cells and the cell cycle progression was studied. **Results:** DOX inducible system was fully functioning and the level of *Pax6* was tightly regulated by DOX. *mPax6* over-expression retarded cell proliferation by prolonging G0/G1 phase. The *mPax6*Δ286 had no effects on cell proliferation. Over-expression of *Pax6* induced caspase-3 independent apoptosis. Recombinant *mPax6* adenovirus transduced primary cultured rabbit corneal epithelium cells also resulted in prolonging G0/G1 phase. **Conclusions:** The feature of cell cycle retardation in *Pax6* over-expressing cells is consistent with the notion that *Pax6* plays a pivotal role in the maintenance of corneal epithelial cell homeostasis in adult and corneal re-epithelialization during wound healing.

PL 007: 三氧化二砷抑制人眼脉络膜黑色素瘤细胞生长的体外研究

王春芳 李彬 张海燕 李卫红

首都医科大学北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所

通讯作者: 李彬

Email: libin43_99@Yahoo.com

目的: 三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO) 治疗急性早幼粒细胞性白血病在我国首次获得成功以后, 其抗癌功能日益受到临床重视。目前该药已推广应用于消化道肿瘤、肝癌等疾病的临床治疗。本实验通过观察 ATO 对体外人眼脉络膜黑色素瘤 (choroidal melanoma, CM) 细胞系 OCM-1 细胞生长的抑制作用, 探讨 ATO 杀伤人眼肿瘤细胞的机制, 旨在为今后眼科临床研究全身和局部给药途径奠定理论和实验基础。**方法:** OCM-1 细胞与不同浓度 ATO (0.75 $\mu\text{mol/L}$ 、1.50 $\mu\text{mol/L}$ 、3.00 $\mu\text{mol/L}$ 、6.00 $\mu\text{mol/L}$ 、9.00 $\mu\text{mol/L}$ 、12.00 $\mu\text{mol/L}$ 、24.00 $\mu\text{mol/L}$) 孵育一定时间后, 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法测定细胞的生长状况; 采用流式细胞 (FCM) 技术观察细胞发生坏死和凋亡的比率; 使用透射电镜观察细胞的形态改变, 并测定细胞内谷胱甘肽过氧化物酶的活性; 使用激光共聚焦显微镜检测细胞线粒体膜的电位变化。**结果:** 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO 对 OCM-1

细胞的生长没有抑制作用, 其余 6 个实验组 OCM-1 细胞的生长受到不同程度的抑制; 其生长抑制率随 ATO 浓度的增加和 ATO 作用时间的延长而逐渐增加, 具有时间和浓度依赖性 ($P < 0.05$)。24 h 内 ATO 对 OCM-1 细胞的半数抑制率 (IC_{50}) 为 16.8 $\mu\text{mol/L}$ 。相同 ATO 浓度下, OCM-1 细胞的坏死率高于细胞凋亡率; 且细胞坏死率和凋亡率随 ATO 浓度的增加而升高。透射电镜下可见 OCM-1 细胞出现坏死和凋亡的形态改变 (图 1、2)。ATO 作用后细胞内谷胱甘肽过氧化物酶的活性降低 ($P < 0.05$); 同时细胞线粒体膜电位也下降, 且与作用时间和 ATO 浓度有关 ($P < 0.01$)。

结论: ATO 可以抑制 OCM-1 细胞生长, 其主要机制为降低细胞内谷胱甘肽过氧化物酶的活性, 使细胞线粒体膜电位下降, 造成能量合成障碍, 最终导致细胞坏死和凋亡。

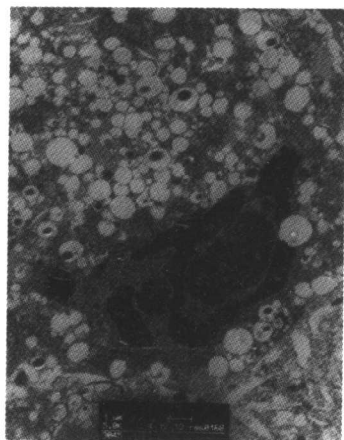


图 1 透射电镜下观察 ATO 作用 24 h 后的 OCM-1 细胞出现明显坏死改变, 细胞内可见大量大小不等的空泡, 细胞核染色质凝聚成块状, 核膜消失 $\times 5000$

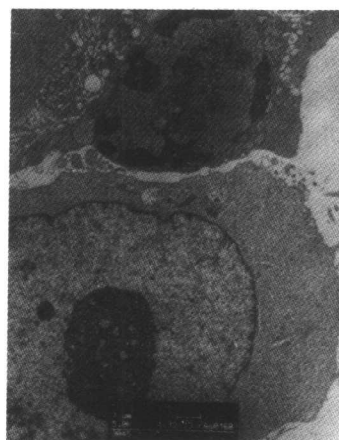


图 2 透射电镜下观察 ATO 作用 24 h 后的 OCM-1 细胞出现早期凋亡表现 (箭头), 细胞表面的微绒毛消失, 染色质呈小块状向核膜边集; 还可见存活细胞 (三角) $\times 5000$

PL 008: 体外培养人眼脉络膜黑色素细胞中基质金属蛋白酶及其抑制剂的表达

王玲^{1,2}, 卢清君¹, 王宁利¹

首都医科大学附属北京同仁医院, 北京同仁眼科中心¹, 青岛大学医学部²

目的: 观察体外培养人眼脉络膜黑色素细胞基质金属蛋白酶及其抑制剂的表达, 探讨脉络膜黑色

素细胞的生理功能。**方法**: 采用 Western 印迹法从蛋白表达水平定量检测脉络膜黑色素细胞的基质金属蛋白酶及其抑制剂的表达, 并用免疫荧光组化技术进行定位。**结果**: 使用等量总蛋白进行 Western 印迹法分析, 用基质金属蛋白酶及其抑制剂的特异性抗体检测发现: 体外培养的人眼脉络膜黑色素细胞可表达基质金属蛋白酶-1; 低水平表达基质金属蛋白酶-2; 未见基质金属蛋白酶-3、9 及组织金属蛋

白酶抑制剂-1、2 的表达。免疫荧光组化显示基质金属蛋白酶反应产物位于细胞浆, 且细胞核周围密集。**结论**: 体外培养的人眼脉络膜黑色素细胞可表达部分类型的基质金属蛋白酶, 不表达组织金属蛋白酶抑制剂。

关键词: 细胞培养; 脉络膜; 黑色素细胞; 基质金属蛋白酶; 组织金属蛋白酶抑制剂

PL 009: 兔眼 LASIK 和 epi-LASIK 术后角膜神经损伤与修复的对比研究

吴莹 褚仁远* 戴锦晖 周行涛

复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科

Email: churen yuan@hotmail.com

目的: 比较 LASIK 和 epi-LASIK 两种术式对角膜神经的损伤程度与术后的修复过程。**方法**: 健康新西兰白兔 40 只, 2 只正常对照。随机选择一眼行 LASIK, 而另一眼行 epi-LASIK。两种手术预定切削方案相同: -5.0Ds, 光学区直径 6mm。观察指标: 1、术前、术后 3d、7d、1m、3m、6m 采用 Cochet-Bonnet 敏感度测量仪测量角膜触觉。2、正常对照以及术后 1d、3d、7d、1m、3m、6m 取角膜行 AuCL 染色, 观察角膜神经形态。**结果**: AuCL 染色结果: epi-LASIK 组术后 1 天, 兔眼角膜切削区浅层神经消失, 神经断端清晰可见, 在切削区中央和周边均可观察到由神经断端发出的再生神经, 其形态特点为较短而细, 切削区周边神经的再生较中央更明显; 术后 3 天, 切削区再生神经较更多, 走行更长, 分布到上皮下, 形成上皮下神经, 但数量较术前明显少, 神经再生以切削区周边较中央更明显; 术后 1 周, 切削区中央再生神经走行长, 部分相互间形成联系, 再生的上皮下神经很常见, 有明显的串珠样结构, 但走行较短; 术后 1 月, 切削

区内中央再生神经更多, 上皮下神经走行长; 术后 3 月, 切削区基质神经有过度增生的表现; 术后 6 月, 切削区神经形态接近正常。**LASIK** 组术后 1 天, 角膜瓣内 (除蒂部外) 基质神经和上皮下 (间) 神经均消失, 无再生神经; 术后 3 天和 1 周, 切削区周边的神经断端有再生神经, 短而细, 未长入上皮下或上皮间, 切削区中央仍无神经再生。术后 1 月, 神经断端有再生神经发出, 切削区中央上皮下神经的数量较少; 术后 3 月, 切削区神经断端发出的再生神经明显增多; 术后 6 月, 切削区神经形态接近正常。角膜触觉结果: 术后 3 月内均是 epi-LASIK 组的角膜触觉更敏感, epi-LASIK 组术后 3 月时角膜触觉恢复, LASIK 组至少 6 月。**结论**: 与 LASIK 相比, epi-LASIK 对角膜神经的损伤相对轻, 神经再生更早, 角膜触觉下降的程度相对轻, 恢复期短, 但 epi-LASIK 术后神经形态的恢复较触觉的恢复更长。

关键词: 角膜; 神经; 触觉; 准分子激光原位角膜磨镶术; 准分子激光上皮下磨镶术

PL 010: 彗星法分析紫外线诱导的人晶状体上皮细胞 DNA 的损伤和修复

吴志鸿¹ 张劲松¹ 濮伟²

中国医科大学附属第一医院眼科¹ 中国医科大学附属第二医院眼科²

通讯作者: 吴志鸿

Email: fswuzhihong@sina.com

目的: 探讨紫外线诱导的人晶状体上皮细胞 DNA 损伤修复机制。**方法**: 采用照射剂量为 0.0 (对

照组)及 2.5、5.0、7.5、10.0 mJ/cm² (实验 1~4 组)的紫外线照射人晶状体上皮细胞,采用硷性彗星法(Comet assay CA)分析人晶状体上皮细胞 DNA 单链断裂程度和人晶状体上皮细胞接受 10.0mJ/cm² 紫外线照射后的自身修复情况。采用照射剂量为 0.0(对照组)及 2.5、5.0、10.0 mJ/cm²(实验 1~3 组)的紫外线照射人晶状体上皮细胞,采用流式细胞仪观察细胞周期分布状况。**结果:**对照组与实验 1~4 组 DNA 单链断裂程度呈上升趋势(图 1),5 组比较差异有统计学意义(F=17.259 p<0.01); 10.0mJ/cm² 紫外线诱导的人晶状体上皮细胞 DNA 单链短裂后,其半修复时间为 60 分钟(图 2);紫外线辐射诱导的人晶状体上皮细胞阻滞在 G₁ 期,对

照组和实验组 G₁ 期细胞的百分比紫外线照射后 0h 为 51.5%、52.9%、52.5%、50.0%; 2h 为 43.7%、45.8%、50.0%、51.1%; 4h 为 38.7%、43.1%、47.1%, 50.8%; 8h 为 29.80%、39.8%、48.5%、50.4%; 24h 为 56.6%、48.0%、30.0%、26.3%。**结论:**硷性彗星分析法能确切反映人晶状体上皮细胞 DNA 的定量损伤程度与紫外线剂量的关系,并能确切反映紫外线损伤后晶状体上皮细胞 DNA 自身修复能力在受测时间中的定量变化情况。紫外线诱导人晶状体上皮细胞发生 G₁ 期阻滞, G₁ 期阻滞的程度与紫外线呈剂量依赖性。

关键词:晶体; 上皮细胞; 紫外线; DNA 损伤; DNA 修复; 彗星分析法

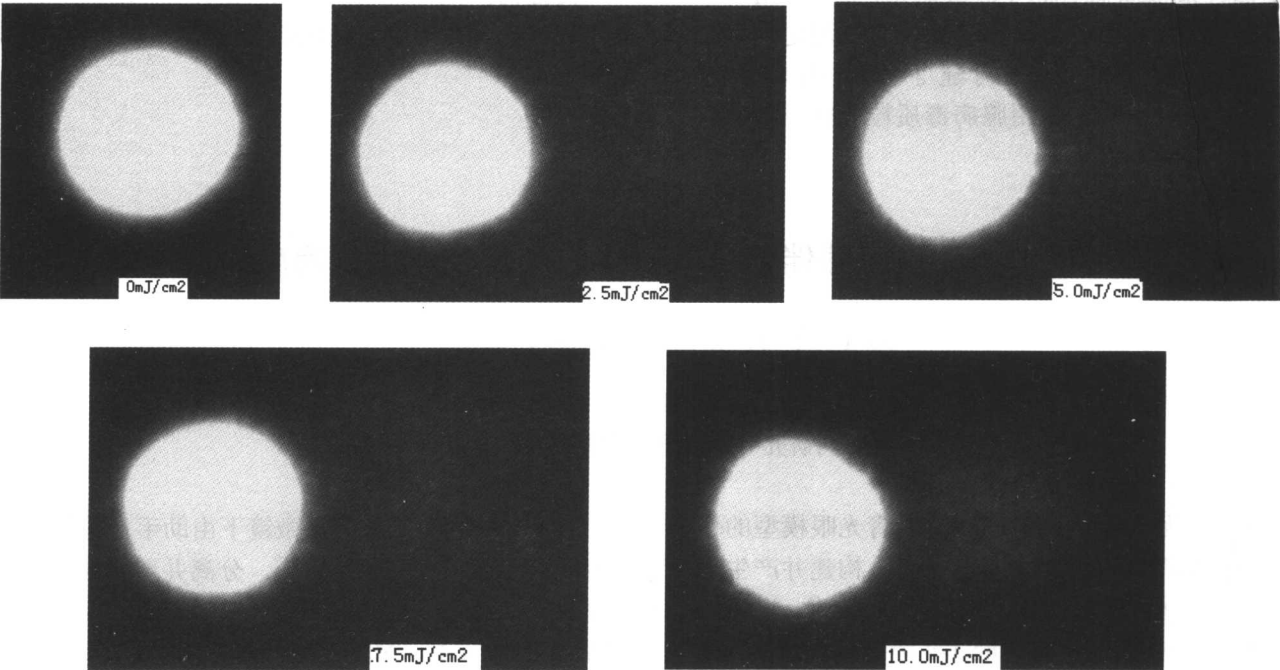


图 1 接受 0.0、2.5、5.0、7.5 和 10.0mJ/cm² 紫外线照射“彗星”尾部变化情况

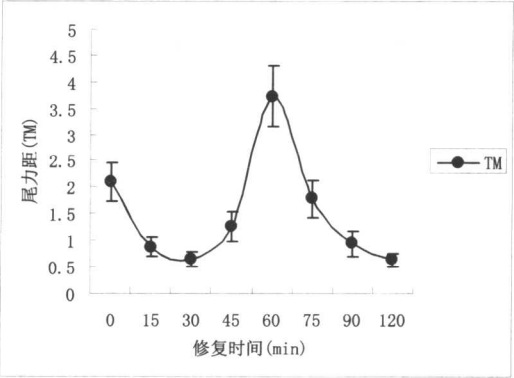


图 2 10.0 mJ/cm² 紫外线诱导的人 LEC DNA 损伤修复动力学变化曲线

PL 011: 人神经营养素-4 基因重组腺伴随病毒载体的构建、产生和滴度测定

张华 赵家良

中国协和医科大学 中国医学科学院 北京协和医院眼科

目的: 为了研究人神经营养素-4 (hNT-4) 导入青光眼模型的治疗作用, 构建并产生重组腺伴随病毒载体。**方法:** 将 hNT-4 目的基因插入载体质粒 pSSHGCMV 的 EcoR I 和 BamH I 位点之间, 构建重组腺伴随病毒载体质粒。用腺病毒辅助质粒 pFG140 代替野生型腺病毒, 包装质粒 pAAV/Ad 及已构建重组腺伴随病毒载体质粒, 三质粒磷酸钙共沉淀法转染 80% 融合的 143 细胞系, 包装 rAAV。经蔗糖梯度离心法纯化、斑点杂交方法测定重组病毒滴度。**结果:** 成功构建了重组病毒质粒 pSSHGCMV/ hNT-4。用腺病毒质粒代替野生型腺

病毒不影响重组病毒的产生和滴度, 而且可以减少野生型腺病毒的污染。用蔗糖梯度离心法离心获得 rAAV, 使用斑点杂交方法测定重组病毒滴度, 杂交结果与已知浓度重组质粒杂交结果比较, 获得了较高滴度的重组病毒。**结论:** 成功制备了人神经营养素-4 基因重组腺伴随病毒 rAAV/ hNT-4, 为青光眼基因治疗实验奠定了基础。

关键词: 人神经营养素-4 (hNT-4) 基因; 人神经营养素-4 重组腺伴随病毒 (rAAV/ hNT-4); 滴度测定

PL 012: GFP 重组腺伴随病毒载体的构建、产生、滴度测定

及 GFP 在大鼠视网膜上表达

张华 赵家良

中国医学科学院眼科研究中心 中国协和医科大学北京协和医院眼科

目的: 为了研究 GFP 基因导入青光眼模型的作用, 观察 GFP 在大鼠视网膜上表达, 构建并产生重组腺伴随病毒载体。**方法:** 应用 PCR 技术, 以质粒 pGFP-N2 为模板, 扩增出 hNT-4 编码基因。将所得基因片段重组于 pGEM-T Easy 质粒, 筛选得到含 hNT-4 基因的克隆。将 GFP 目的基因插入载体质粒 pSSHGCMV 的 EcoR I - BamH I 位点之间, 构建重组腺伴随病毒载体质粒。用腺病毒辅助质粒 pFG140 代替野生型腺病毒, 包装质粒 pAAV/Ad 及已构建重组腺伴随病毒载体质粒, 三质粒磷酸钙共沉淀法转染 80% 融合的 143 细胞系, 包装 rAAV。经蔗糖梯度离心法纯化、斑点杂交方法测定重组病毒滴度。取 SD 大鼠 14 只, 3% 戊巴比妥钠溶液 40mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 距角巩膜缘 2mm 巩膜处, 用 10 μ l 显微注射针向大鼠玻璃体腔内注射 5 μ l 重组腺相关病毒 pSSHGCMV/GFP。在有乙醚的干燥器皿中, 处死大鼠 2 只。于治疗后 1 天、2 天、3 天、4

天、5 天、6 天和 7 天, 显微镜下由助手打开大鼠眼睑, 沿角巩膜缘剪开球结膜, 分离并剪断眼肌、筋膜及视神经, 取出大鼠眼球。将 SD 鼠视网膜 1/2 铺在盖玻片上, 另 1/2 视网膜快速冰冻, 切片。在荧光显微镜下观察。**结果:** 成功构建了重组病毒质粒 pSSHGCMV/ GFP。用腺病毒质粒代替野生型腺病毒不影响重组病毒的产生和滴度, 而且可以减少野生型腺病毒的污染。用蔗糖梯度离心法离心获得 rAAV, 使用斑点杂交方法测定重组病毒滴度, 杂交结果与已知浓度重组质粒杂交结果比较, 获得了较高滴度的重组病毒。荧光显微镜观察结果: 结果发现在 GFP 重组腺伴随病毒 pSSCMV-GFP 感染组中, 在感染后 24h 几乎看不到有荧光, 48h 荧光较弱, 此后荧光明显增强, 72h 时荧光较强, 至 120h (5d) 时荧光更加集中且很强。当表达量高时, 在细胞中聚集成团块状、颗粒装。在转染空载体 pSSHGCMV 的阴性对照组中, 视网膜中始终无绿

色荧光出现。视网膜铺片荧光显微镜观察结果：结果发现在 GFP 重组腺伴随病毒 pSSCMV-GFP 感染组中，在感染后 120h (5d) 时荧光较强，视网膜中央荧光更加集中且很强，视网膜周围荧光逐渐减弱。视网膜切片荧光显微镜观察结果：结果发现在 GFP 重组腺伴随病毒 pSSCMV-GFP 感染组中，在感染后 120h (5d) 时，可见视网膜色素上皮细胞层

荧光强，视网膜神经节细胞层可见荧光。**结论：**成功制备了重组腺伴随病毒 rAAV/GFP，为青光眼基因治疗实验奠定了基础。

关键词：重组腺伴随病毒 (rAAV)； GFP 重组腺伴随病毒 (rAAV/GFP)；斑点杂交；滴度测定；视网膜/大鼠

RE001: The expression of TNF- α , VEGF, β FGF, TGF β 2 and IFN- γ in retinal pigment epithelial cells under different concentration of fetal bovine serum with insulin-transferrin-sodium selenite media supplement

Lina Hao,¹ Volker Enzmann,¹ Louisa Maria Franco,¹ Nalini S Bora and Henry J Kaplan^{1*}
Kentucky Lions Eye Institute, University of Louisville
Email: nsbora01@gwise.louisville.edu, Hank.Kaplan@louisville.edu

PURPOSE: To observe if there are the expression of growth factors for tumor necrosis factor(TNF- α), vascular endothelial growth factor(VEGF), β fibroblast growth factor (β FGF), transforming growth factor β 2 (TGF β 2) and interferon- γ (IFN- γ) in RPE cells under different concentration of fetal bovine serum with ITS supplement and to explore the idea cell culture medium that supports the normal growth of retinal pigment epithelial cells. **METHODS:** Primary retinal pigment epithelial (RPE) cells from forty C57 BL/6 mice eyes were cultured in standard Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10%, 4%, 2% fetal bovine serum (FBS) and 1% insulin-transferrin-sodium selenite media supplement (ITS) respectively. Immunohisto- chemical staining was used to verify the growth of RPE cells. The

expression of TNF- α , VEGF, β FGF, TGF β 2 and IFN- γ were determined by cells and supernatant from passage-3 to -4 primary RPE cell cultures with RT-PCR and ELISA method. **RESULTS:** The primary cultures of RPE cells were successfully established. TNF- α , VEGF, β FGF, TGF β 2 (but no IFN- γ) were present in RPE cells and supernatants. With the increased concentration of FBS, the expression of which showed a progressive increasing ($P<0.001$). **CONCLUSIONS:** TNF- α , VEGF, β FGF and TGF β 2 were expressed in RPE cells and supernatants. The production of which can be reduced greatly with the medium containing 2% FBS and 1% ITS in DMEM. Therefore, the medium containing 2% FBS and 1% ITS in DMEM is the idea cell culture medium that supports the normal growth of retinal pigment epithelial cells.

RE002: In vitro primary culture of human retinal pigment epithelium

Xu Guoxing, Hu jianzhang, Xie maoshong, Guo jian Yang Juan, Sun Tangsheng,
The first affiliated hospital of Fujian Medical University,
Fujian institute of Ophthalmology

Object: To establish the primary culture of human retinal pigment epithelium(hRPE) cells and study the effects of lysophosphatidic acid(LPA) on cultured hRPE cells proliferation and DNA synthesis in vitro. **Methods:** Adult human RPE cells were harvested as intact sheets from volunteers' eyes, using the enzyme disperse. The primary cultured RPE cells was observed by scanning and transmission electron microscopy and passaged in vitro. Human RPE Cells were fed with Dulbecco's Modified Eagle's medium supplemented with 10% serum MEM aminoacids and gentamicin. Proliferative responses to LPA, transforming growth factor β 2(TGF- β 2), and LPA plus TGF- β 2 were assessed either by counting stained cells or use of a hemacytometer. DNA synthesis was assessed by extracting the DNA and measuring DNA quantity with a spectrophotometer. **Results:** The just digested

hRPE cells occurred as round, and contained large amount of pigments, but those pigments in the RPE cells were getting decreased along with the cell division. The third passage of cultured RPE cells maintained lots of mitochondria and microvilli. lysophosphatidic acid (LPA 10 μ M) significantly enhanced RPE cell proliferation in both the presence and absence of 1% fetal bovine serum. Proliferative effects of LPA were inhibited by TGF- β 2 (2ng/ml). LPA (10 μ M) also significantly increased DNA synthesis in RPE cells. The increase in DNA synthesis was twice the increase in proliferation, suggesting that LPA also increased the amount of DNA/cell. **Conclusion:** LPA can stimulate the proliferation of hRPE in vitro. The third passage can maintain the same biological activities of cells as the primary passage. The proliferative effects of LPA

suggest that this serum lipid could play a role in stimulating RPE cell proliferation during normal

wound healing and the exaggerated proliferation which contributes to proliferative vitreoretinopathy.

RE003: RNAi 对人视网膜色素上皮细胞 VEGF 表达的抑制

蔡春梅 孙葆忱 刘旭阳 卢青君 王宁利

首都医科大学附属北京同仁医院眼科中心 北京市眼科研究所

Email:chunmeicai@163.com

目的: 由短发夹 RNA (shRNA) 介导的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术对能有效的特异性导致哺乳动物基因沉默。本研究目的证明针对人血管内皮生长因子 (VEGF) 的短发夹 RNA 体外抑制视网膜色素上皮 (RPE) 细胞 VEGF 的表达。**方法:** 用酶辅助显微分离法分离人 RPE 细胞, 并用细胞角蛋白和 S-100 进行免疫组化鉴定。设计针对人 VEGF 的短发夹 RNA (shRNAs, V1, V2), V3 为阴性对照即不含特异性 shRNA, 其表达载体为 pSilencer 4.1-CMV。并测序鉴定。提取的质粒用 EcoRI 和 SmaI 进行酶切鉴定。实验分五组, 第 1 组: 在 RPE 细胞中加 $100 \mu\text{M}$ CoCl_2 含有 10%FBS 的 DMEM 培养基中培养 30 小时; 第 2 组: 在常规含有 10%FBS 的 DMEM 培养基中培养 30 小时; 第 3、4、5 组: 分别 V1、V2、V3 转染细胞 24 小时后在含有 $100 \mu\text{M}$ CoCl_2 的 10%FBS 的 DMEM 培养基中培养 30 小时; 用 Western blot 方法检测各组细

胞 VEGF 表达水平。**结果:** 培养的细胞用细胞角蛋白和 S-100 免疫组化染色阳性。提取的质粒经酶切后片断大小分别为 3.3kb 和 1.6kb, 说明质粒成功地提取和纯化。VEGF 表达水平组 1 明显高于组 2、组 3、组 4 ($*P<0.001$, $\Delta P<0.001$, $\triangle P<0.001$)。乏氧 (2 组与 1 组比) 可以明显增加 RPE 细胞中 VEGF 的表达。3、4 组 (V1 和 V2) 对 VEGF 表达抑制分别为 65.9% 和 52.4%。组 5 与组 1 比无显著性差异 ($\star P=0.147$)。各组间 β -actin 表达量无显著性差异。**结论:** 针对人 VEGF 的特异性 shRNA 可以明显降低人 RPE 细胞 VEGF 的表达, 为 RNA 干扰治疗新生血管性眼病, 尤其是脉络膜新生血管奠定了基础。

关键词: 短发夹 RNA (shRNA), 血管内皮生长因子 (VEGF), 视网膜色素上皮细胞 (RPE), 氯化钴 (CoCl_2)

RE004: 视网膜干细胞的特异性诱导分化及其电生理学特性检测

陈丽峰 阴正勤 王仕军 曾玉晓 翁传煌

第三军医大学西南眼科医院

通讯作者: 阴正勤

E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

目的: 探讨不同阶段大鼠视网膜混合细胞对视网膜干细胞的特异性诱导分化效应, 并分析其电生理学特性。**方法:** 利用 Transwell 系统, 构建视网膜干细胞与不同阶段大鼠视网膜混合细胞共培养模型, 观察不同阶段大鼠视网膜混合细胞对视网膜干细胞特异性诱导分化效应, 实验分为视网膜干细胞 10% 胎牛血清诱导分化组、新生鼠视网膜混合细胞共培养组以及成年大鼠视网膜混合细胞共培养; 利用膜片钳技术, 对干细胞及分化后的细胞进行全细胞记录检测其电生理特性。**结果:** 与血清诱导视网膜干细胞分化结果比较, 新生大鼠视网膜混合细胞共培养可以诱导视网膜感光细胞的特异性抗原

Opsin 高表达 ($P<0.05$); 而成熟大鼠视网膜混合细胞共培养组 Opsin 表达与血清组无统计学差异 ($P>0.05$); 在干细胞及其分化后的细胞记录到不同的电压门控性电流。**结论:** 新生大鼠视网膜混合细胞可能分泌某种物质, 可以提高视网膜干细胞向光感受细胞的分化比率, 而成熟大鼠视网膜混合细胞不具备此功能可能与该阶段细胞发育信号途径的关闭有关系; 干细胞发育的早期阶段与其分化阶段拥有不同的电生理学特性, 从细胞功能的水平阐述了该视网膜干细胞及其分化细胞的标志。

关键词: 视网膜干细胞; Transwell 系统; 共培养; 全细胞记录; 电生理学

RE005: 变性视网膜组织分泌物对视网膜干细胞影响研究

陈丽峰 阴正勤
第三军医大学西南眼科医院
通讯作者: 阴正勤
E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

目的: 观察变性视网膜组织分泌物对视网膜干细胞迁移、分化的影响。**方法:** 对胎龄17d Long Evans大鼠眼视网膜干细胞进行分离与体外培养。将培养的视网膜干细胞在Transwell系统中, 与视网膜变性大鼠RCS大鼠视网膜组织共培养, 按照共培养对象不同分为三组: A组: 视网膜干细胞单独培养; B组: 视网膜干细胞(上层)与正常大鼠视网膜组织(下层)共培养; C组: 视网膜干细胞(上层)与中期变性的RCS大鼠视网膜组织(下层)中共培养, 7天后, 胎盘蓝拒染法检测视网膜干细胞

活性, 扫描电镜检查干细胞的形态、迁移、分化情况。**结果:** 共培养7天后视网膜干细胞活性大于95%, 各组间无显著差异($P>0.05$), 扫描电镜检查发现与中期变性视网膜共培养的视网膜干细胞出现分化及趋向运动现象。**结论:** 变性视网膜上清液微环境对共培养的干细胞具有趋向诱导作用, 并能诱导视网膜干细胞进一步分化, 干细胞受到周围组织细胞及细胞外基质的作用和影响可趋向运动并诱导分化对于在体研究视网膜移植奠定了理论基础。

关键词: 视网膜干细胞; Transwell; 共培养;

RE006: 视网膜色素变性大鼠内源性干细胞分布、来源及增殖能力研究

陈丽峰 阴正勤 陈少军 李世迎 刘志敏
第三军医大学西南眼科医院
通讯作者: 阴正勤
E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

目的: 观察视网膜色素变性大鼠(Royal College of Surgeon's rat, RCS rat)变性不同时期视网膜内是否存在内源性视网膜干细胞及其来源分析。**方法:** 按RCS鼠出生后时间不同(15天、30天、90天), 实验分为A、B、C3组, 分别代表视网膜变性的早期、中期、晚期, 同时以正常Long-Evans鼠出生后相应时间点作正常对照, 每组3只(6眼), 分别行眼内注射BrdU, 标记增殖的细胞, 2天后, 取眼球, 常规固定切片, HE染色观察视网膜结构、分层变化, 采用免疫荧光双标(抗BrdU/抗GFAP和抗BrdU/抗Chx10)分别鉴定分裂增殖的细胞/müller细胞和分裂增殖的细胞/视网膜干细胞定位及分布情况。**结果:** A组RCS鼠视网膜光感受细胞层部

位抗BrdU/抗Chx10和抗BrdU/抗GFAP表达均为阴性, B、C组RCS鼠视网膜光感受细胞层部位抗BrdU/抗Chx10和抗BrdU/抗GFAP双标均为强阳性。正常对照组中, 视网膜光感受层部位抗BrdU/抗Chx10和抗BrdU/抗GFAP表达均为阴性。**结论:** 1、视网膜变性早期无内源性干细胞激活及müller细胞增殖; 中、晚期视网膜光感受细胞层部位, müller细胞在光感受层大量增殖, 且可逆分化为视网膜干细胞; 2、视网膜色素变性本身作为一种诱导因素, 可激活内源性干细胞, 该研究有助于从新的角度揭示移植后视网膜功能改善发生机制与调控环节。

关键词: 视网膜色素变性; 内源性干细胞; müller细胞; 逆分化

RE007: 光变性猪视网膜移植术后形态结构的研究

陈少军 阴正勤 李世迎 陈丽峰 刘丹宁
第三军医大学西南眼科医院
通讯作者: 阴正勤
E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

目的: 通过移植分化完成而发育不完全的新生猪神经上皮-色素上皮组织, 探讨此种供体对宿主的

安全性和视网膜神经上皮联合色素上皮移植的必要性。**方法:** 通过免疫组化、HE染色方法, 在光

镜或荧光显微镜下观察光变性猪视网膜移植术后新生猪神经上皮-色素上皮联合移植片在宿主视网膜下腔的发育、存活能力、与受体视网膜的整合方式以及存活形态与视网膜功能的关系。**结果:**大多数未发育成熟的新生猪视网膜在宿主视网膜下可继续发育至成熟,移植物与宿主视网膜发生了部分融合,融合的方式为两者相邻视网膜层之间神经元的整合。müller 细胞呈丝网状连接于移植物和宿主之间,但未观察到双极细胞、无长突细胞轴突末梢与它们产生的联系。移植物神经上皮层在宿主视网

膜下大多呈现拥有正确极性平行伸展的层状形态。同种异体分化完成的移植物在宿主眼内可以存活而没有排斥迹象至少 5 个月。**结论:**分化完成而发育不完全的新生猪视网膜能在宿主视网膜下能发育成熟、安全存活并有延伸进宿主视网膜寻找合适靶目标的能力,与宿主视网膜可以形成有限的整合。RPE 影响移植物感光细胞层的发育和生存,联合移植是必要的。

关键词: 微型猪; 光变性视网膜; 视网膜移植; RPE-神经上皮联合移植片; 免疫组化;

RE008: RCS 大鼠病变发展过程中视网膜神经节细胞电生理学特性变化

陈中山 阴正勤 Shan Chen, 王仕军, 曾玉晓

第三军医大学西南眼科医院

通讯作者: 阴正勤

E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

目的: 研究 RCS 大鼠视网膜变性过程中视网膜及神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)电生理学特性的改变。**方法:** 对出生后不同发育阶段的正常和视网膜变性大鼠 RCS 大鼠行闪光视网膜电图(F-ERG)检查,对 RGCs 进行视网膜切片膜片钳全细胞记录。**结果:** 随着视网膜变性的发展,RCS 大鼠 F-ERG a 波和 b 波振幅于出生 5 周后逐渐下降,7~8 周后呈熄灭状态; RCS 大鼠 RGCs 动作电位(action potential, AP)的类型随着发育发生显著性变

化,变性后期 7~8 周时 26.7%, 9~12 周时 63.2% 的 RGCs 不能诱发出 AP。**结论:** 随着 RCS 大鼠感光细胞变性的发展视网膜整体功能逐渐丧失,最终影响到 RGCs 的发放功能,损害了视觉信息向中枢的投射,而残余的部分 RGCs 保持较正常的发放能力,为治疗该类疾病提供了机会。

关键词: RCS 大鼠; 视网膜电图; 视网膜神经节细胞; 电生理学

RE009: RCS 大鼠病变发展过程中多焦视网膜电图特性变化

陈中山 阴正勤 翁传煌 王仕军 曾玉晓

第三军医大学西南眼科医院

通讯作者: 阴正勤

E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

目的: 探讨 RCS 大鼠视网膜变性过程中多焦视网膜电图(mfERG)的改变,与正常大鼠比较,分析其变化规律,为了解视网膜变性的病理变化机制和临床诊治提供线索。**方法:** 取有和无视网膜变性的 RCS 大鼠,根据睁眼后不同发育阶段分为出生后 3 周、4 周、6 周、8 周和 12 周共五组各 4 只,检查屈光间质清新,眼底无改变,予室温下 12h 明暗交替饲养。RETIscan 系统(Roland Consult, 德国),ELSA 彩色显示器(Sony),刺激图形为 103 个 6 边形白色闪光

阵列,刺激时亮度为 120cd/m,刷新频率为 60 Hz,放大器放大范围 ± 100 ,通频带为 5~300 Hz。分 12 个循环记录 mfERG,每个循环记录时间为 47 s。按照本实验室建立的方法在暗适应条件下记录 mfERG,并比较注视点改变和重复记录对结果的影响。为避免记录时间和麻醉药物的可能影响,每次记录间隔 3 d。记录时托品酰胺散瞳,速眠新麻醉,瞳孔散大约 7 mm 时将大鼠固定于可三维移动的动物实验台,采用卡因进行角膜表麻,滴加甲基纤维

素后安放电极。记录电极为环形金电极,固定于右眼角膜缘,不锈钢针制作的参考电极和地极分别置于尾部皮下和被检眼同侧耳下。通过检眼镜使大鼠注视点与屏幕刺激野中心重合,距离为20 cm,然后记录。**结果:**睁眼后3-4周视网膜变性RCS大鼠N1波、P1波的潜伏期和幅值与无视网膜变性大鼠相比无差异,尽管大鼠视网膜无黄斑,但三维密度图示黄斑样功能区。睁眼后6周组视网膜变性RCS大鼠N1波、P1波的潜伏期和幅值与无视网膜变性大鼠相比无差异显著,潜伏期延长,幅值降低,对不同环幅值和潜伏期进行分析,第4-6环幅值降低更明显。睁眼8周、12周,视网膜变性RCS大鼠mfERG

不能辨别出明显的波形,仅第1环可见低平的波形。**结论:**1、睁眼后随着视网膜变性的发展,变性RCS大鼠mfERG幅值显著降低,晚期不能辨别出明显的波形。提示随着感光细胞的变性死亡,变性RCS大鼠视网膜功能逐渐丧失2、变性RCS大鼠mfERG随感光细胞的变性死亡逐渐降低甚至消失,但视网膜不同区域改变的速度和程度不一致,周边视网膜电生理功能丧失早、程度中,后极部在晚期尚残留部分视功能。3、视网膜变性过程中视网膜电生理功能改变的进程以及不同视网膜区域的变化特征,为改病的治疗策略,如视网膜移植等提供了线索。

关键词: RCS 大鼠, 多焦视网膜电图

RE010: RCS 大鼠病变发展过程中视网膜神经节细胞形态学研究

张辰星 阴正勤 许红霞

第三军医大学西南眼科医院

通讯作者: 阴正勤

E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

目的: 本实验对出生后 RCS 大鼠病变发展过程中不同周龄的视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)进行分类计数比较并对 RGCs 细胞超微结构的改变进行了比较研究,初步探讨病变发展过程中其 RGCs 在形态学上的变化特性。**方法:** 取出生后 3 至 12 周龄 RCS 大鼠和对照组大鼠,每周龄各 3 只,剥离视网膜,行视网膜平铺片,甲酚紫染色,使用 LEICA DM TRET 显微镜及计数软件进行对比分析。按照节细胞层全部细胞,节细胞层中细胞横径 $\geq 12\mu\text{m}$,细胞横径 $\geq 9\mu\text{m}$ 三种标准,分别观察和计数 RCS 大鼠和对照组大鼠细胞密度上的变化。通过透射电镜观测分析生后 3、5、7、9、11 周龄 RCS 大鼠和对照组大鼠节细胞超微结构的改变,并对 RCS 大鼠和对照组大鼠节细胞中肿胀线粒体进行了计数和比较。**结果:** α 亚型及部分 β 和 γ 亚型的节细胞密度上, RCS 大鼠从生后 4 周龄后的各周龄都显著少于对照组,并在 7 周龄此差异更为明显。RCS 大鼠自身前后对照,从生后 7 周龄开始密度显著低于正常的细胞密度。透射电镜发现 RCS

大鼠在病变发展过程中 RGCs 细胞中的核仁和内质网系统保持正常的形态,在病变的发展过程中 RCS 大鼠的 RGCs 中线粒体肿胀程度呈现明显的增加趋势,线粒体肿胀程度从生后 5、7、9、11 周龄均显著高于对照组。RCS 大鼠自身前后对照可以发现,从生后 5 周龄后的各周龄其线粒体肿胀程度即显著高于正常。**结论:** RCS 大鼠 α 亚型及部分 β 和 γ 亚型的神经节细胞从睁眼后不久即开始出现细胞密度和细胞超微结构上的改变,并在生后 7 周龄时这个变化加剧。在视网膜色素变性过程中,神经节细胞形态学上的改变与功能上的变化相互吻合,形态学上的改变早于功能上的异常。通过实验发现随着病变进展,仍然有一定数量的节细胞存活下来,并且节细胞的核仁和内质网系统保持正常的形态,部分 RGCs 可能仍然保留正常功能,为治疗该类病变以及视网膜重建提供了机会。

关键词: RCS 大鼠, 视网膜, 神经节细胞, 视网膜平铺片, 视网膜色素变性, 形态学, 甲酚紫

RE011: 晶体蛋白对视神经损伤后大鼠视网膜神经节细胞保护作用的研究

王艳华 王一 刘康 刘志敏

第三军医大学西南眼科医院

E-mail: wangyi@yahoo.com.cn

目的:通过离体和在体实验研究晶体蛋白是否能促进 RGCs 存活和生长?探讨损伤晶状体促进 RGC 的存活和轴突再生的确切作用物质,为视神经损伤和再生的基础研究提供理论依据,为临床治疗视神经损伤探索可行方法。**方法:**1、分别用混合晶体蛋白、晶体蛋白或 DMEM 激活的巨噬细胞培养液及 DMEM 对 RGCs 进行培养,观察 RGCs 在体外存活时间,测量培养 1、3、5d 有突起 RGCs 数、最长突起长度及细胞活性,进行组间比较。2、分别于视神经横断伤后即刻、1 周、2 周,用混合晶体蛋白或生理盐水玻璃体腔注射,荧光金逆行标记法计数视神经横断伤后 1、2、3 周存活的 RGC 数。3、分离纯化 α 、 β 、 γ 晶体蛋白,并分别用三种晶体蛋白对 RGC 进行离体培养,测量培养 2、4、6、8d 有突起 RGCs 数、最长突起长度,进行组间比较**结果:**1、晶体蛋白组细胞能存活 12~14d,较其它三组显著延长($P<0.05$)。2、培养 1、3、5d,各实验组有突起的 RGCs 数均明显多于对照组($P<0.01$),晶体蛋白组与两组巨噬细胞培养液组比较有突起 RGCs 数明显增多($P<0.01$),两组巨噬细胞培养液组间比较无显著差异。3、培养 1、3d,各实验组 RGCs 最长突起长度均较对照组显著延长($P<0.01$)。培养 5d,各实验组 RGCs 最长突起长度

与对照组比较差异显著($P<0.05$),两组巨噬细胞培养液组间比较差异不显著,但晶体蛋白组与两组巨噬细胞培养液组比较差异非常显著($P<0.01$)。4、培养 1d 时,各实验组细胞活性与对照组无明显差异。培养 3d 和 5d 时,晶体蛋白组细胞活性显著高于对照组 ($P<0.01$),DMEM 激活的巨噬细胞培养液组与对照组比差异不显著。两组巨噬细胞培养液组间无显著差异。5、视神经横断伤后 1、2、3 周,玻璃体腔注射晶体蛋白组存活的 RGC 数较注射生理盐水组显著增多($P<0.05$)。6、各时间点, α 及 β -H 晶体蛋白组有突起的 RGCs 最长突起长度均显著长于对照组($P<0.05$), β -L、 γ 晶体蛋白组与对照组比较,无显著差异($P>0.05$)。各时间点, α 晶体蛋白组 RGC 最长突起长度均显著长于 β -H 晶体蛋白组($P<0.05$)。7、4、6d 时, α 、 β -H 晶体蛋白组 RGC 存活数与对照组比较,有显著差异($P<0.05$)。 α 晶体蛋白组与 β -H 晶体蛋白组间比较,2、4d 时,无显著性差异;6、8d 时,有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**1、晶体蛋白对神经损伤后 RGCs 存活和生长具有显著直接促进作用,其中以 α 晶状体蛋白的作用最为明显。2、晶体蛋白可能是晶状体损伤促进 RGC 存活和轴突再生的作用物质。

RE012: 人胚胎视网膜-70 度、深低温和中期保存液

保存不同时期的活性变化

李世迎 阴正勤 曾玉晓,王仕军,翁传煌

第三军医大学西南眼科医院

通讯作者:阴正勤

E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn

目的:观察-70 度、深低温和中期保存液保存不同时期人胚胎视网膜的活性变化。**方法:**取健康流产的孕 3—4 月人胚胎的视网膜,迅速采用-70 度低温冰箱、深低温二步法、角膜中期保存液进行保存,以台盼兰染色法和 MTT 法测定中期保存液保存 1、2、5d,-70 度保存 30d,深低温保存 30d 及对照组(流产时)视网膜活性,并观察视网膜组织结构改变。**结果:**对照组(流产时)视网膜活性为 94

$\pm 2\%$,-70 度保存 30d 视网膜活性为 69.63%,深低温保存 30d 的人胚视网膜活性为 61.67%。中期保存液保存不同时期(1、2、5d)视网膜活性分别为 $85 \pm 1\%$, $78 \pm 5\%$, $51.65 \pm 2\%$ 。MTT 法测定结果显示:中期保存液保存 1d 和对照组的人胚视网膜活性差异无显著性意义。中期保存液保存 2、6d、-70 度保存 30d 和深低温保存 30d 的人胚视网膜活性均低于对照组、差异有显著性意义。**结论:**中期