

结膜下注射庆大霉素对家兔视网膜的影响

李 炜¹, 宋建明², 田 洁³, 陈伽俐¹, 孔庆慧¹, 李 林¹, 窦晓燕¹, 司马晶¹

基金项目: 中国深圳市科技计划资助项目 (No. 200902037)
作者单位: (518035) 中国广东省深圳市第二人民医院¹眼科; ²病理科; ³药剂科
作者简介: 李炜, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。
通讯作者: 司马晶, 女, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障、青光眼、小儿眼科、视光学及眼表疾病. sima618@163. com
收稿日期: 2011-07-19 **修回日期:** 2011-08-11

Effects of subconjunctival gentamicin injection on rabbit retina

Wei Li¹, Jian-Ming Song², Jie Tian³, Jia-Li Chen¹, Qing-Hui Kong¹, Lin Li¹, Xiao-Yan Dou¹, Jing Sima¹

Foundation item: Shenzhen Municipal Science and Technology Plan Project, China (No. 200902037)
¹Department of Ophthalmology; ²Department of Pathology; ³Department of Pharmacy, the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China
Correspondence to: Jing Sima. Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China. sima618@163. com
Received: 2011-07-19 **Accepted:** 2011-08-11

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of subconjunctival gentamicin injection on rabbit retina.
• **METHODS:** Ten healthy rabbits weighted 2.0-2.5kg without binocular disorders were selected, and divided into 4 groups, 3 experimental group (3 rabbits 6 eyes of each group), 1 control group (1 rabbit 2 eyes). 3 experimental groups received binocular subconjunctival gentamicin injection 5000 μ , 10000 μ , 20000 μ respectively. Control group received binocular normal saline injection. Aqueous and vitreous fluid were extracted from these ten rabbits every day and measured the concentration with TDX/FLX. At the third day, retinas were taken to make light microscope samples in order to observe cytohistomorphology of retina, and using TUNEL to detect the apoptosis.
• **RESULTS:** The gentamicin concentration of rabbit aqueous and vitreous fluid increased as the subconjunctival injection dosage increased. Obvious pathological changes were observed in retina of experimental group. The number of apoptotic retina cells of the experimental group evidently increased than which in the control team.
• **CONCLUSION:** Subconjunctival injection of gentamicin should be prohibited in clinic for its obvious retinal toxicity.

• **KEYWORDS:** gentamicin; retina; pathology; apoptosis

Li W, Song JM, Tian J, et al. Effects of subconjunctival gentamicin injection on rabbit retina. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(10):1716-1718

摘要

目的: 观察结膜下注射庆大霉素对家兔视网膜的影响。
方法: 选择健康家兔 10 只, 体质量 2.0 ~ 2.5kg, 双眼无病变。分为 4 组, 实验组 3 组每组 3 只 6 眼, 对照组 1 只 2 眼, 对照组每天双眼结膜下注射生理盐水, 实验组 3 组分别每天双眼结膜下注射庆大霉素 5000U, 10000U 和 20000U, 实验组和对照组每天穿刺抽取房水及玻璃体, 用全自动血药浓度监测分析仪测量其浓度; 第 3d 取视网膜制作光镜标本, 观察视网膜细胞组织形态改变; 使用 TUNEL 组织凋亡检测试剂盒进行凋亡检测。
结果: 结膜下注射庆大霉素的 3 组家兔中, 前房及玻璃体内庆大霉素药物浓度随注射天数增加; 前房及玻璃体内药物浓度与结膜下注射之庆大霉素剂量正相关, 玻璃体内药物浓度远低于前房内药物浓度 ($P < 0.05$); 在光学显微镜下对比对照组, 实验组家兔视网膜出现视锥、视杆细胞层变薄, 溶解, 节细胞层空泡形成甚至溶解, 内外颗粒层细胞数变少等现象, 且随着给药剂量增加, 病理改变越明显; 免疫组织化学显示: 实验组内颗粒层凋亡细胞计数较对照组明显增加, 且给药浓度越高, 凋亡细胞计数越多。
结论: 研究显示, 结膜下注射氨基糖甙类抗生素可引起视网膜病理改变及细胞凋亡增加, 且其视网膜毒性与给药剂量正相关。
关键词: 庆大霉素; 视网膜; 病理; 凋亡
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.10.009

李炜, 宋建明, 田洁, 等. 结膜下注射庆大霉素对家兔视网膜的影响. 国际眼科杂志 2011;11(10):1716-1718

0 引言

氨基糖甙类抗生素为临床常用抗生素, 在眼科广泛用于眼表细菌感染性疾病的治疗和眼科手术后预防感染的发生。虽然氨基糖甙类抗生素具有视神经、视网膜毒性, 其不能用于玻璃体内给药, 此在国际上目前已达成共识, 尽管国内大多数地区许多的眼科医生并没有意识到其潜在的危害性, 但是氨基糖甙类抗生素结膜下注射仍广泛应用于临床。国内毕颖文等^[1]开展过球周注射对视网膜毒性的研究, 目前还没有人对结膜下注射氨基糖甙类抗生素的视网膜视神经毒性进行过系统的研究, 且结膜下注射氨基糖甙类抗生素的剂量与视网膜视神经毒性反应的关系尚不明确。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔 10 只, 体质量 2.0 ~ 2.5kg, 普通

表 1 前房及玻璃体内庆大霉素平均药物浓度 ($\bar{x} \pm s$, mg/L)

| 组别 | | 第 1d | 第 2d | 第 3d |
|----------|-----|--------------|--------------|--------------|
| 20000U 组 | 前房 | 12.77 ± 1.79 | 20.32 ± 1.44 | 49.68 ± 7.67 |
| | 玻璃体 | 2.46 ± 0.26 | 3.68 ± 0.49 | 4.24 ± 0.20 |
| 10000U 组 | 前房 | 4.97 ± 0.22 | 8.08 ± 0.19 | 8.32 ± 0.10 |
| | 玻璃体 | 0.65 ± 0.53 | 1.08 ± 0.80 | 2.12 ± 0.07 |
| 5000U 组 | 前房 | 3.77 ± 0.17 | 4.24 ± 0.09 | 4.72 ± 0.10 |
| | 玻璃体 | 0.36 ± 0.04 | 0.40 ± 0.04 | 0.76 ± 0.76 |
| 对照组 | 前房 | 0 | 0 | 0 |
| | 玻璃体 | 0 | 0 | 0 |

级环境 22℃ ~ 25℃ 下分笼饲养,购自广东省动物实验中心。快速血药浓度分析仪 (TDxFL, 美国雅培), 庆大霉素检测试剂盒 (批号 84312Q100), 庆大霉素标准品 (批号 82086Q100), 庆大霉素质控 (批号 84311Q100), 光学显微镜, 原位细胞凋亡检测 (TUNEL) 试剂盒 (产品编号: 1/684817910)。

1.2 方法 选择健康家兔 10 只, 体质量 2.0 ~ 2.5kg, 双眼无病变。分为 4 组, 3 组实验组每组 3 只 6 眼, 1 组对照组 1 只 2 眼, 3 组实验组分别每天双眼结膜下注射庆大霉素 5000U, 10000U 和 20000U, 对照组双眼结膜下注射生理盐水, 每天观察眼底, 穿刺抽取房水及玻璃体各 100 μ L, 用全自动血药浓度监测分析仪测量庆大霉素浓度。第 3d 取后极部视网膜甲醛固定, 解剖显微镜下取视乳头下方 2mm 处眼球全层, 进行常规树脂定向包埋, 半薄切片行 10g/L 甲苯胺蓝染色进行光镜检查。TUNEL (DNA 切口末端标记) 法计数组织凋亡细胞: (1) 石蜡切片脱蜡, 梯度乙醇水化后, PBS 冲洗 2 × 3min; (2) 蛋白酶 K (20mg/L, 10mmol/L Tris/HCl, pH = 7.4 ~ 8.0, 21℃ ~ 37℃ 消化, 15 ~ 30min) 或采用胃蛋白酶 (Pepsin, 0.25% ~ 0.5%, HCl, pH = 2, 37℃, 15 ~ 60min) 消化。PBS 冲洗 2 × 3min; (3) 擦干组织周围水分, 每片加 50 μ L 的 3mL/L H₂O₂ 甲醇溶液, 阻断内源性过氧化酶, PBS 冲洗 2 × 3min; (4) 擦干组织周围水分, 每片加 25 ~ 50 μ L 的 TUNEL 反应液。于孵育盒中 37℃, 60min。PBS 冲洗 3 × 3min; (5) 擦干组织周围水分, 每片加 20 ~ 50 μ L 的辣根过氧化酶抗体, 孵育盒中 37℃, 30min, PBS 冲洗 3 × 3min; (6) 擦干组织周围水分, 每片加一滴新鲜配制的 DAB 室温孵育 5 ~ 10min, PBS 冲洗 3 × 3min。苏木素复染, 乙醇脱水, 干燥; (7) 中性树胶封片。光镜观察, 细胞核棕色为阳性。

统计学分析: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.0 统计软件处理, 应用单因素方差分析, 两组间比较用 LSD-t 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前房及玻璃体内庆大霉素药物浓度 由检测结果可见, 前房及玻璃体内庆大霉素药物浓度随注射天数增加而逐渐升高, 玻璃体内庆大霉素浓度远低于前房内浓度, 结膜下注射庆大霉素剂量越大, 前房及玻璃体内庆大霉素浓度越高, 经统计学处理, 各组数据间有统计学差异 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 眼底镜下观察家兔视网膜变化 每天用直接眼底镜观察家兔眼底, 各实验组及对照组家兔视网膜并无明显变化, 视乳头边界清楚, 无明显充血、水肿, 视网膜血管比例正常, 视网膜未见明显充血、水肿、渗出灶, 黄斑区视网膜

未见明显水肿。

2.3 庆大霉素对家兔视网膜组织形态学的影响 实验组家兔视网膜出现视锥、视杆细胞层变薄, 溶解, 节细胞层空泡形成甚至溶解, 内外颗粒层细胞数变少等现象, 且随着给药剂量增加, 病理改变越明显 (图 1)。

2.4 庆大霉素对视网膜组织中凋亡细胞的影响 庆大霉素 20000U 组视网膜视锥、视杆细胞溶解, 内、外颗粒层变薄, 节细胞层内大量空泡形成、细胞形态不清; 庆大霉素 10000U 组视网膜视锥、视杆细胞层明显变薄, 形态尚可, 节细胞层内空泡形成; 庆大霉素 5000U 组视网膜内颗粒层细胞形态尚正常, 可见较多细胞核 (约 20/50) 棕色着色; 对照组视网膜内颗粒层细胞形态正常, 只有极个别 (约 2/50) 细胞核棕色着色。总之, 实验组内颗粒层凋亡细胞计数较对照组明显增加, 且给药浓度越高, 凋亡细胞计数越多 (图 2)。

3 讨论

国外 Hancock 等^[2] 及国内江伟等^[3] 研究发现玻璃体腔注射氨基糖甙类抗生素会引起视网膜出血、混浊、水肿、棉毛样梗塞、动脉狭窄、静脉弯曲, 进一步发展为新生血管性青光眼, 视网膜色素变性, 最终导致视神经萎缩; 光镜下表现为色素上皮弥散成簇状。视网膜核层明显破坏, 进而视网膜出血, 结构不清, 继而变性、衰竭、萎缩; 电镜观察, 视网膜内丛状层及内核层常显示有局灶性坏死区, 色素上皮细胞大部分消失, 视锥、杆细胞外段与之分离, 视网膜结构紊乱, 外段视网膜各层深部的细胞消失, 节细胞全部消失, 进而产生严重的视网膜坏死, 继之, 发生视网膜萎缩和神经胶质增多。凋亡是细胞的程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 过程, 是真核细胞的一种特殊的死亡形式。机体在一定生理、病理条件下为维持内环境稳定, 通过基因控制而使细胞主动有序地死亡, 表现一系列形态和生化方面的特征。氨基糖甙类抗生素引起视网膜、黄斑坏死可能会导致视网膜细胞的凋亡。许多文献已经对细胞凋亡的形态学变化以及超微结构变化进行了描述, 细胞凋亡早期随着细胞连接和一些特别的质膜结构的丧失, 核染色质发生浓聚, 聚集在核膜周围。然后是胞质浓缩、胞膜突起呈泡状。继而细胞核碎裂, 细胞膜将胞质和染色质断片包裹, 形成多个膜包裹的凋亡小体。

本实验通过对实验家兔结膜下注射庆大霉素来观察眼底镜、光学显微镜下氨基糖甙类抗生素的视网膜毒性反应, 并通过 TUNEL 法检测视网膜细胞亡的变化。实验采用美国雅培快速血药浓度分析仪及庆大霉素检测试剂盒检测前房及玻璃体内的庆大霉素药物浓度, 实验发现前房及玻璃体内庆大霉素药物浓度随注射天数增加而逐渐升高,

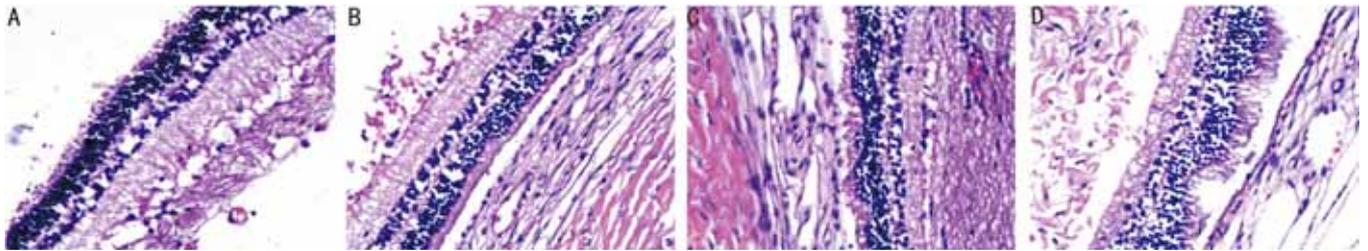


图1 庆大霉素对家兔视网膜组织形态学的影响(甲苯胺蓝染色×400) A:庆大霉素20000U组:视网膜视锥、视杆细胞溶解,内、外颗粒层变薄,节细胞层内大量空泡形成、细胞形态不清;B:庆大霉素10000U组:视网膜视锥、视杆细胞层明显变薄,形态尚可变,节细胞层内空泡形成;C:庆大霉素5000U组:视网膜视锥、视杆细胞层略变薄;D:对照组。

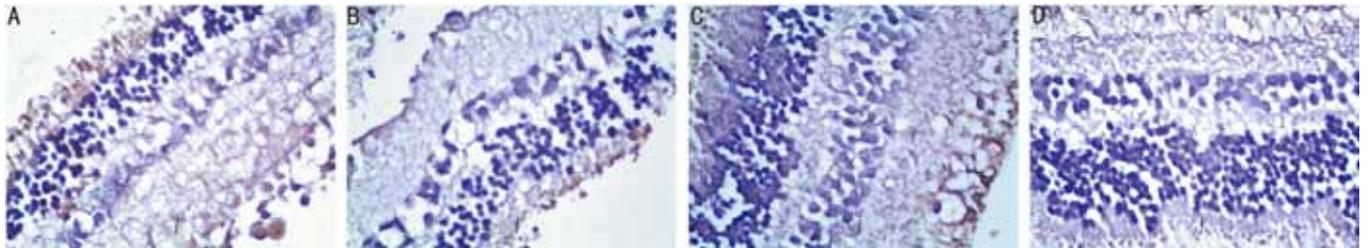


图2 庆大霉素对视网膜组织中凋亡细胞的影响(TUNEL法×400) A:庆大霉素20000U组;B:庆大霉素10000U组;C:庆大霉素5000U组;D:对照组。

玻璃体内庆大霉素浓度远低于前房内浓度,结膜下注射庆大霉素剂量越大,前房及玻璃体内庆大霉素浓度越高。有文献报道家兔玻璃体腔内注射庆大霉素引起的视网膜毒性反应在光镜下主要表现为:视网膜及脉络膜均有炎性细胞出现,锥杆细胞外段分解,视网膜色素上皮层紊乱加重,部分灶性坏死,脱落或堆积成束,感光细胞层变薄,外节脱落、消失。而本实验中应用常规树脂定向包埋,半薄切片行10g/L甲苯胺蓝染色的方法进行光镜检查,实验组家兔视网膜视锥、视杆细胞层变薄,溶解,节细胞层空泡形成甚至溶解,内、外颗粒层细胞数变少,且随着给药剂量增加,病理改变越明显。应用TUNEL(DNA切口末端标记)法计数组织凋亡细胞,实验组内颗粒层凋亡细胞计数较对照组明显增加,且给药浓度越高,凋亡细胞计数越多。

结膜下注射氨基糖苷类抗生素作为一种有效的对抗眼部感染的治疗措施曾在临床上长期使用,同时临床上也有结膜下注射氨基糖苷类抗生素引起视网膜毒性反应的报道,由于临床上氨基糖苷类抗生素结膜下注射多用于眼科手术术后或患角膜炎、巩膜炎者,在这些情况下(尤其是眼科内眼手术术后),眼球较正常薄弱,药物渗透性更强,玻璃体腔内的药物浓度会有明显升高,发生视网膜毒性反应的几率将相应增加。本研究表明,结膜下注射庆大霉素可引起视网膜毒性反应,且给药剂量越大,时间越长,毒性反应越明显。因此在临床上,应慎重采用结膜下注射氨基糖苷类抗生素作为治疗手段,而应用其它的方法代替,如频繁抗生素眼液滴眼等。这样在获得相应的治疗

效果的同时又能降低药物的副作用。

由于本实验是针对眼部健康的家兔进行的研究,故有一定的局限性。希望以后能有机会建立眼科手术后的动物模型,进一步研究氨基糖苷类抗生素对病理状况下的视网膜毒性作用。另外,以往的研究表明庆大霉素对视网膜的毒性主要作用于视网膜血管,表现为视网膜血管栓塞、无灌注区,血管通透性增加、渗漏、出血,即血-视网膜屏障的破坏。而我科司马晶等^[4]既往的研究表明,血-视网膜屏障的破坏和血管通透性增加主要是因为血管内皮生长因子(VEGF)在视网膜中的过量表达所致,血管抑素则是血纤维蛋白溶酶原的一个蛋白水解片断,能有效阻断新生血管形成,特异性地抑制血管内皮细胞的增殖并诱导其凋亡。希望在下一步的研究中,我们能进一步揭示氨基糖苷类抗生素的视网膜毒性与血管内皮生长因子及血管抑素的关系。

参考文献

- 1 毕颖文,徐格致. 球周注药对视网膜毒性的实验性研究. 眼科研究 2006;24(1):65-69
- 2 Hancock HA, Guidry C, Russell W, et al. Acute aminoglycoside retinal toxicity *in vivo* and *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(12):4804-4808
- 3 江伟,王志强,李庆生,等. 庆大霉素玻璃体腔注射对兔视网膜血管的影响. 国际眼科杂志 2006;6(3):599-602
- 4 司马晶,郭疆,罗司思,等. 血管抑素降低ROP幼鼠视网膜及虹膜血管渗漏性的作用机制研究. 国际眼科杂志 2008;8(12):2364-2368