

前言

在頑固性青光眼，並可能高度結膜下及鞏膜上纖維化的病人需施行濾過手術時，用 mitomycin C 輔助，已經在眼科界形成風潮 (Chen 等, 1990; Hung 等, 1995)。青光眼濾過手術合併 mitomycin C 使用，雖使手術成功率大增(Bergstrom 等，1991; Pasquale 等，1992)，但這個方法並不全然是沒有風險。最常見的併發症之一就是持續性的術後眼壓過低。術後眼壓過低可能是因為傷口癒合受阻，而導致房水流出過多 (Geijssen 等，1992; Jampel 等，1992; Schwartz 等，1992)。但是 mitomycin C 對睫狀體的毒性而導致房水分泌的減少，也可能是造成持續性的術後眼壓過低的原因。

Mitomycin C 若直街打入前房(Derick,等，1991)，或是在翼狀贅片手術後以眼藥型式點用(Rubinfeld 等，1992; Fujitani 等，1993)，是會產生嚴重副作用。在青光眼濾過手術時因為是單一次的浸潤，而且僅局限於 scleral flap 下，使用後又都會用大量平衡生理食鹽水沖洗，是故對角鞏膜並無太大毒性(Nuyts 等，1992; Ramakrishnan 等，1993; Hollo, 1993; Kawase 等, 1993; Kitazawa 等, 1993)。但是 mitomycin C 也有報告會被下層鞏膜吸收(Kawase 等，1992)。

最近，有報告顯示在使用 mitomycin C 後，有少數睫狀體無色素上

皮細胞有 large cytoplasmic vacuoles 及 electron dense material 的堆積，這被認為有可能是持續性的術後眼壓過低的原因之一(Mietz 等，1994)。

局部使用前列腺素 $F_{2\alpha}$ ，或它的類似分子化合物，會經由增加 Uveoscleral outflow facility，而達到降低眼壓的目的(Gabelt 等, 1989; Kaufman 等, 1989; Nilsson 等, 1989; Tamm 等, 1990; Alm 等, 1991; Toris 等, 1993)。這個現象所伴隨的生理變化目前所知仍然不多。使用前列腺素 $F_{2\alpha}$ 或它的 isopropyl ester, 在可降低眼壓劑量對靈長類眼睛施行治療 4 至 8 天之後，檢查超微細構造時可以發現在平滑肌束間的膠原纖維有很明顯的下降，平滑肌細胞的基底膜也有結構關係的改變，及在肌細胞內有不同種類的 Inclusion body 的增加 (Tamm 等, 1990)。因為有愈來愈多的證據顯示，透過細胞表面 Integrin 的接受器，基底膜中的成份 Laminin，會調節平滑肌的型態，及移行 (Yamamoto 等, 1993; Clyman 等, 1992; Gimond 等, 1992; Paulsson 等, 1992)，我們所觀察到在前列腺素治療後基底膜的改變，可能也會影響 Laminin 及 Integrin 之間的互動。這對睫狀肌平滑肌細胞的正常生理功能可能有很大的關係。

最近的研究顯示，Laminin 是一個有相似分子結構的家族，它們在

體內不同的細胞中,各有其獨特的分佈(Engvall 等, 1986; Hunter 等, 1989; Leivo 等, 1989; Gehlsen 等, 1989; Sanes 等, 1990; Ehrig 等, 1990 Engvall 等, 1990; Beck 等, 1990; Marinkovich 等, 1992)。有更進一步的證據顯示, 每個不同的 Laminin 亞型可以和不同的 integrin 接受體反應, 而各自引發獨特的生理反應(Cohen 等, 1991)。因此, 要評估 Laminin 在各種眼球組織反應的變化, 必需要知道, 圍繞著睫狀肌細胞及其它類型的細胞基底膜存在的是那一種亞型。

Laminin 家族所有的成員, 都是由一條重鏈及兩條輕鏈所形成的分子(Engvall 等, 1986; Beck 等, 1990)。在多數的組織中, 有兩種的重鏈, 及參種的輕鏈分子被發現, 兩重鏈分子是 A 及 M, 而三種輕鏈是 B₁, B₂ 及 S。因此, 有四種這些分子的可能結合出現, 即 A-B₁-B₂, A-S-B₂, M-B₁-B₂, 及 M-S-B₂(Engvall 等, 1990)。

因此, 我們使用單株抗體對 A, M, B₁, B₂, 及 S, 有系統的來研究 Laminin 在眼球組織的分佈, 並研究是否有因為 mitomycin C 的使用而改變了它們的分佈, 以便對持續性的術後眼壓過低的成因, 究竟是傷口癒合不好造成房水流出過多, 還是對睫狀體的毒性, 而讓房水分泌減少, 能有更進一步的瞭解。

§ 材料及方法

抗體

對抗抗體的抗原是來自人類的胎盤。

實驗動物及組織處理過程

九隻兔子的十八隻眼施行典型小樑切除術。實驗眼浸潤 0.2 mg/ml mitomycin C 三分鐘，對照眼則是以生理食鹽水取代。術後皆以平衡生理食鹽水沖洗浸潤處。動物分三組於 5、10、30 天摘除眼球。

眼球在固定前，由輪部後 5mm 處，將眼球分成前後兩半。在顯微鏡下，前眼部將角膜置於底處，水晶體在剪除晶體韌帶後摘除。虹彩及睫狀體在由鞏膜分離下來。虹彩由睫狀體處剪分離，再用刮鬚刀片將睫狀體切成輻射狀小條，大小約 4.0×1.5×0.5mm。

睫狀體是個極易碎的組織，為了保存結構的完整性及抗原性，我們採用了 Pre-embedding 的技術(Weinreb 等, 1994)。睫狀體小條用 4% paraformaldehyde 固定，在 20℃ 下浸泡一小時後，在 4℃ 下和第一個抗體作用一小時。使用的是對抗人類 Laminin 抗體。組織用 phosphate-buffered saline(PBS)浸泡過夜，然後再和有結合 rhodamine 的 anti-mouse

IgG-IgM 在 4℃ 下作用一小時。組織再用 PBS 浸泡過夜，再用 4% paraformaldehyde 固定一小時，再用濃度漸增的酒精脫水，再包埋於 Spurr's 樹脂中。然後用玻璃刀切下 1 μ m 的薄片。這個抗體對組織的穿透性有限，因此從表面算起，每個組織包埋塊只能切下約 40 片有用的薄片。Negative control 的組織則以 PBS 取代第一個抗體。

§ 結果

睫狀體

在睫狀肌的基底膜，我們在肌肉束的周圍，觀察到均勻且強烈的染色。但在肌束中的個別肌肉細胞則只有少數幾條有染色(圖 1A,1B)。不論是直向，輻射狀，或圓型的睫狀肌肉，它們呈色方式是類似的。色素上皮細胞，及無色素上皮細胞，不論在 pars plana 或 pars plicata 都有很強的呈色(圖 1C)。血管的基底膜也都有染上顏色(圖 1C)。但基質及神經則都沒有染上顏色。

在 Negative Control 的片子則沒有任何結構染上顏色，除了色素上皮細胞內色素顆粒的自體螢光(圖 2A,圖 2B)。在 Positive Control，它的呈色方式則在所有實驗的結果都一致。

§ 討論

我們發現在睫狀體中，不同的 Laminin 鏈在各個地方的分布是有其特異性的。如表一所列，我們觀察到在睫狀肌束、血管，及無色素上皮細胞的基底膜觀察到免疫反應。色素上皮細胞也有反應。在神經纖維的附近，我們觀察到免疫反應，因為各個鏈他們可能組成 A-B₁-B₂，A-S-B₂，M-B₁-B₂，M-S-B₂ 的組合(Engvall 等, 1990; Sanes 等, 1990; Leivo 等 1989; Hunter 等, 1989)，我們觀察到各個不同的鏈，表示這四種分子的存在可能。

在神經纖維周圍的基底膜存在的免疫反應，表示 B1-merosin(M-B₁-B₂)及 S-merosin(M-S-B₂)都存在這裏。Sanes 等人在老鼠的 phrenic nerve 及老鼠和兔子的 Sciatic nerve 也有同樣的發現(Sanes 等, 1990)。

在睫狀體中，不同地方的基底膜，沒有一處同時有含 A 鏈的 Laminin 及 M 鏈的 Laminin(或叫 merosin)。這種互相排斥的分布情形，在其他成人的組織也觀察到(Engvall 等, 1990; Marinkovich 等, 1992; Gehlsen 等, 1989; Leivo 等, 1989; Sanes 等, 1990; Ehrig 等, 1990; Hunter 等, 1989)。這種現象顯示 A-chain laminin 和 merosin 可能負責著不同的生理訊號。有實驗證據顯示，在加有 placental merosin 的新生老鼠視網膜神經細胞的培養，它們可以長得更長，分枝更多，加上 EHS Laminin(只

含 A-B₁-B₂)則生長狀況較差，而這些細胞生長情形的差異，也牽涉到不同的 integrin 受體(Cohen 等, 1991)。因此，這些研究結果都顯示睫狀體肌肉細胞的基底膜有著不同的 Laminin 分布，也可能代表著不同的生理機轉訊號。

視神經頭組織

人類視神經頭的基底膜將 glial cells 和視神經纖維束, Laminin beam matices, 鞏膜, 及玻璃體分開(Anderson 等, 1969, 1970)。在視神經內, 基底膜也將有髓鞘的神經纖維束和環繞他們的 glia 和 pia septa 分開 (Anderson 等, 1969; Cohen, 1967)。而這些基底膜中的一個主要成分即 laminin(Goldbaum 等, 1989; Morrison 等, 1989)。

有許多證據顯示 laminin 在細胞分裂, 組織的隔間, 及神經的再生扮演重要的角色(Paulsson, 1992; Brodkey 等, 1993; Anton 等, 1994; Martini, 1994)。最近有實驗顯示降低 A 鏈的表現會引起類 muscular dystrophy 的骨骼, 肌肉的異常(Wu 等, 1994)。在老鼠, 若將 S 鏈的 gene 突變, 會造成腎小球基底膜的功能, 而產生蛋白尿, 也會產生 Neuromuscle junction 的不正常(Noakes 等, 1995)。由此, 都再次證明, 不同的 laminin 有不同的生理機轉。

視神經頭從眼睛取下後, 先用 Vibratom 切成薄片。

在沒有和單株抗體作用的組織, 在鞏膜、Laminar beam, 及視神經的 pia seption 可以看到很淡片狀的非特異的染色(圖 1A))。在視網膜, pre-laminar 的視神經頭, 內的血管的基底膜, 有著很強的 A,S,及 B₂ 的

染色,而沒有 M 及 B₁ 的染色。這種染色的模式,在球後視神經 pia septa 內的血管基底膜也可見到(圖 2 B 及 C)。

這些結果顯示在血管基底膜 A-S-B₂ 可能是唯一存在的 laminin 這個結果是和我們在睫狀體內的發現是一致的(Wang 等, 1994) 這和其他學者觀察到,成熟老鼠的大腸及脊髓的血管也都有 S 鏈的分布是相同的(Hunter 等, 1992) 但在肝臟及松果體的血管基底膜,則除了 A,S,B₂ 外,還含有 B₁(Wewer 等, 1992)。

和血管的反應相類似, internal limiting membrane 也有很強的 A,S 及 B₂ 的染色,但沒有 M 及 B₁(圖 1(B)及(C))。這表示在 internal limiting membrane 也只有 A-S-B₂ 的染色。A-S-B₂ 曾在人類生骨神經 pecineurium 的基底膜被發現過(Hsiao 等, 1993)。這可以支持這個 laminin 是用來分離神經組織及其他組織用的。

在 Lamina chonsidalis, glial column 內的基底膜對五種鏈的 laminin 都有反應(圖 1(D))。不同鏈並沒有呈現不同的染色方式。在 Lamina cribrosa, Lamina beam 基底膜也是對五種 laminin 都有反應(圖 1(E))。在 laminar beam 的表面,染色呈現線條狀,但在內部則呈現散在性的染色。在用不同的染色及組織處理方法也有類似的反應(Hernandez 等, 1987, 1990)。這可能可以顯示出分開神經束及 laminar beam 的基底膜有

著很複雜來回捲曲(Morrison 等, 1989; Elkington 等, 1990; Furuta 等, 1992)。