

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.18.009

玻璃体腔联合注射赖氨酸-纤溶酶原和瑞替普酶诱导兔眼玻璃体后脱离的有效性*

赵曦泉 朱忠桥 王建洲 刘 静 周卓琳 柴 芳

(西安市第四医院眼科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:探讨兔眼玻璃体腔联合注射赖氨酸-纤溶酶原和瑞替普酶诱导玻璃体后脱离(PVD)的有效性。**方法:**选取 30 只健康的新西兰白兔,以白兔右眼作为实验眼,左眼作为对照眼。随机分为 A、B、C 三组(每组 10 只),三组实验眼分别联合应用 1 万 U 瑞替普酶+125 μ g 赖氨酸-纤溶酶原、2 万 U 瑞替普酶+125 μ g 赖氨酸-纤溶酶原、3 万 U 瑞替普酶+125 μ g 赖氨酸-纤溶酶原进行玻璃体内注射,对照眼均注射平衡盐溶液。应用视网膜电图、扫描电镜及光镜观察、比较各组诱导 PVD 的效果。**结果:**三组实验眼均形成不同程度 PVD。A 组实验眼注药前与注药后 24 h、注药后 2 周的最大混合反应 a 波振幅、b 波振幅比较均无明显差异($P>0.05$);B 组实验眼注药后 24 h 的 a 波振幅、b 波振幅均有轻度下降,2 周后均恢复正常,注药前后的 a 波振幅、b 波振幅比较均无明显差异($P>0.05$)。C 组实验眼注药后 24 h 的 a 波振幅、b 波振幅均明显低于注药前和对照眼,注药后 2 周的 b 波振幅均明显低于注药前和对照眼($P<0.05$)。光学组织切片观察显示:A 组实验眼及所有对照眼、B 组实验眼、C 组实验眼的视网膜组织细胞形态正常,结构清晰,但 B 组神经节内核层、细胞层细胞略有减少,C 组神经节内核层及细胞层细胞明显减少。**结论:**玻璃体腔内联合注射赖氨酸-纤溶酶原和瑞替普酶能有效诱导 PVD,1 万 U 瑞替普酶+125 μ g 赖氨酸-纤溶酶原可诱导实现完全性 PVD,不会对视功能、视网膜结构造成损害。

关键词:玻璃体后脱离;瑞替普酶;赖氨酸-纤溶酶原

中图分类号:R-33;R774 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)18-3443-04

The Effectiveness of combined Injection of Intravitreal Lysine Plasminogen and Reteplase-induced Vitreous Body after Detachment in Rabbit*

ZHAO Xi-quan, ZHU Zhong-qiao, WANG Jian-zhou, LIU Jing, ZHOU Zhuo-lin, CHAI Fang

(Department of Ophthalmology, Xi'an fourth hospital, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effectiveness of vitreous body combined with injection of lysine amino acid-plasminogen on the reteplase induce vitreous detachment (PVD). **Methods:** 30 healthy New Zealand white rabbits were selected, the right eyes were considered as the experimental eye and the left eye were considered as the control eye. The eyes were random divided into group A, B, C(n=10), three groups of experimental eyes were treated by 1 million U reteplase + 125C μ g lysine, plasmin, 2 million U reteplase + 125C μ g lysine - plasmin, 3 million U reteplase + 125C μ g lysine plasminogen were intravitreal injection, the control eyes were injected with balanced salt solution. The effect of induced posterior detachment of vitreous body were observed and compared. **Results:** Before injection and at 24h, 2 weeks after injection, the maximum mixing reaction a-wave amplitude and b-wave amplitude showed no significant difference ($P>0.05$). In group B, at 24 hours after injection, the amplitude of a wave and b wave amplitude were slightly decreased and returned to normal at 2 weeks after injection, the amplitude of a wave and b wave amplitude showed no significant difference before and after the drug injection ($P>0.05$). At 24 h after injection, a wave amplitude and b wave amplitude of experimental eyes in the group C were significantly lower than those before injection and control eyes, the b wave amplitude at 2 weeks after injection was significantly lower than that before injection and control eyes ($P<0.05$). Optical biopsy observations showed that the experimental eyes in the group A, B, C and all control group C displayed that the retinal tissue cells were normal, the structure was clear, but group B showed that the the kernel and cell layer of ganglion were slightly reduced, the kernel layer and layer cells of ganglion were significantly decreased in the group C. **Conclusion:** Intravitreal injection combined with lysine amino acid - plasminogen and reteplase could effectively induce the posterior vitreous detachment, 1 million U reteplase + 125C μ g lysine plasminogen could be induced to achieve complete vitreous detachment, not visual function and structure of the retina damage.

Key words: Posterior detachment of vitreous body; Reteplase; Lysine plasminogen

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R774 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)18-3443-04

* 基金项目:陕西省卫生局科研基金项目(J2010B09)

作者简介:赵曦泉(1972-),硕士研究生,副主任医师,研究方向:玻璃体视网膜疾病,电话:13299087118

(收稿日期:2016-11-08 接受日期:2016-11-23)

前言

目前,手术仍是临床眼科治疗视网膜病变的主要手段,玻璃体后脱离是玻璃体视网膜手术成功的关键^[1]。虽然近年来的玻璃体视网膜手术器械及技术日趋成熟,但是单纯使用器械清除玻璃体后皮质仍有较大的难度,特别是年龄较小的患者,器械清除玻璃体后皮质还可能造成视盘及黄斑损伤^[2]。器械清除玻璃体后皮质多有残留,而这些残留皮质可为纤维细胞提供生长的支架,从而引发增殖性玻璃体视网膜病变,导致手术失败。鉴于此,临床行玻璃体视网膜手术有必要辅助使用药物,以诱导PVD,从而提高手术成功率。纤溶酶、纤溶酶激活物都是临床用于诱导玻璃体后脱离的常用药物,瑞替普酶是纤溶酶原激活物的缺失变构体,其能有效激活纤溶酶原^[3]。为寻找一种诱导玻璃体后脱离的有效方法,本实验联合应用了赖氨酸-纤溶酶原和瑞替普酶诱导兔眼玻璃体后脱离,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:新西兰兔 30 只,雌雄各半,体重 2000~2500 g,健康状况良好。经眼科检查明确无眼部疾病。

仪器:RETIpor32 型视网膜电图仪;Q400HF 型 Ganzfeld 半球刺激器;AMRAY-1000B 型扫描电子显微镜;SUPER FIELD NC 型 +120D 前置镜;BQ900 型裂隙灯显微镜;倒置显微镜;纯水器。

试剂:注射用瑞替普酶(商品名:派通欣,爱德药业(北京)有限公司,规格 5.0 MU/支);赖氨酸-纤溶酶原(美国 HTI 公司,规格 1 mg/支);眼用平衡盐溶液(美国 Alcon 公司);复方托吡卡胺滴眼液(商品名:美多丽,日本 Santen Pharmaceutical Co., Ltd.);盐酸奥布卡因滴眼液(商品名倍诺喜,日本 Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)。

1.2 治疗方法

动物分组:使用随机数字表法,将 30 只新西兰白兔分为 A、B、C 三组(每组 10 只)。以白兔右眼作为实验眼,左眼作为对照眼。A 组:向白兔实验眼玻璃体腔内注射 1 万 U 瑞替普酶+125 μ g 赖氨酸-纤溶酶原;B 组:向白兔实验眼玻璃体腔内注射 2 万 U 瑞替普酶+125 μ g 赖氨酸-纤溶酶原;C 组:向白兔实验眼玻璃体腔内注射 3 万 U 瑞替普酶+125 μ g 赖氨酸-纤溶酶原。三组白兔的对照眼均向玻璃体腔内注射等体积(0.15 mL)的眼用平衡盐溶液。

注药方法:对实验动物进行全麻,以复方托吡卡胺滴眼液滴眼充分散瞳,麻醉后对眼睑及眼周皮肤进行消毒,直视下向实验眼、对照眼的结膜玻璃体腔中注药,注药后棉签按压 2 min。对前房进行穿刺抽取少量房水,降低眼压。

1.3 检测指标

注药 24 h 后,每组取 5 只白兔,将其处死,取全层眼球壁标本在扫描电镜和光镜下观察,评估注药后 24 h 内的玻璃体后脱落情况。剩余实验动物在注药后第 1 d、第 3 d、第 1 周、第 2 周、第 3 周、第 4 周,分别做视网膜电图检查。注药后 1 个月将剩余白兔全部处死,取全层眼球壁标本在透射电镜、光镜下观察结构形态变化,评估视网膜结构及功能变化。

1.4 统计学方法

运用统计学软件 SPSS19.0 处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组治疗前后视网膜电图比较

A 组实验眼注药前与注药后 24 h、注药后 2 周的最大混合反应 a 波振幅、b 波振幅比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);B 组实验眼注药后 24 h 的 a 波振幅、b 波振幅均有轻度下降,2 周后均恢复正常,注药前后的 a 波振幅、b 波振幅比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

A、B 两组实验眼注药前、注药后 24 h 和注药后 2 周的最大混合反应 a 波振幅、最大混合反应 b 波振幅与同期对照眼相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);C 组实验眼注药后 24 h 的 a 波振幅、b 波振幅均明显低于注药前和对照眼,注药后 2 周的 b 波振幅均明显低于注药前和对照眼($P < 0.05$)。见表 1,表 2。

2.2 三组治疗后视网膜结构

光学组织切片观察显示:A 组实验眼及所有对照眼的视网膜组织细胞形态正常,结构清晰(图 1);B 组实验眼的视网膜组织细胞形态正常,结构清晰,神经节内核层、细胞层细胞略有减少(图 2);C 组实验眼的视网膜细胞形态正常,结构清晰,但神经节内核层及细胞层细胞明显减少(图 3)。

电镜检查结果显示:A 组、B 组、C 组的对照眼视网膜内界膜表面附着了大量的胶原纤维和玻璃体皮质,未发生玻璃体后脱离(见图 4)。A 组实验眼的视网膜内界膜表面光滑,1 例可见少许皮质附着,但无胶原纤维附着,且内界膜形态完整,实现了完全性 PVD(见图 5)。B 组实验眼的视网膜内界膜表面光滑,未见胶原纤维附着,可见少许皮质,较 A 组残留皮质少,实现了

表 1 三组实验动物注射药物前后波幅最大混合反应的比较 ($\bar{x} \pm s, \mu V$)

Table 1 Comparison of the biggest mixed reaction of a wave amplitude between three groups of experimental animals before and after the injection of medicine ($\bar{x} \pm s, \mu V$)

Groups		Eyes	Before the injection	At 24 hours after the injection	At 2 weeks after the injection
Experimental eyes	Group A	10	128.3 $\pm$ 30.5	116.9 $\pm$ 25.3	123.1 $\pm$ 25.4
	Group B	10	126.8 $\pm$ 25.9	119.4 $\pm$ 15.2	125.2 $\pm$ 20.7
	Group C	10	120.7 $\pm$ 26.7	101.7 $\pm$ 16.6**	114.7 $\pm$ 30.6
Control eyes		30	128.9 $\pm$ 31.4	120.5 $\pm$ 14.9	120.4 $\pm$ 24.7

Note: * compared with control eyes, $P < 0.05$; # Compared before inject medicine, $P < 0.05$.

完全性 PVD(见图 6)。C 组实验眼的视网膜表面无胶原纤维、玻璃体皮质,视网膜内界膜表面光滑。(见图 7)。

表 2 三组实验动物注射药物前后 B 波振幅最大混合反应的比较 ($\bar{x} \pm s, \mu V$)

Table 2 Comparison of the biggest mixed reaction of b wave amplitude between three groups of experimental animals before and after the injection of medicine($\bar{x} \pm s, \mu V$)

Groups		Eyes	Before the injection	At 24 hours after the injection	At 2 weeks after the injection
Experimental eyes	Group a	10	305.3 $\pm$ 57.3	276.6 $\pm$ 63.5	320.7 $\pm$ 90.7
	Group B	10	311.5 $\pm$ 56.8	288.3 $\pm$ 55.2	309.9 $\pm$ 55.4
	Group C	10	298.8 $\pm$ 60.4	121.3 $\pm$ 56.6*#	192.8 $\pm$ 44.7*#
Control eyes		30	305.5 $\pm$ 70.7	287.7 $\pm$ 59.7	299.6 $\pm$ 84.2

Note: br bt* compared with control eyes, $P < 0.05$; # Compared before inject medicine, $P < 0.05$.

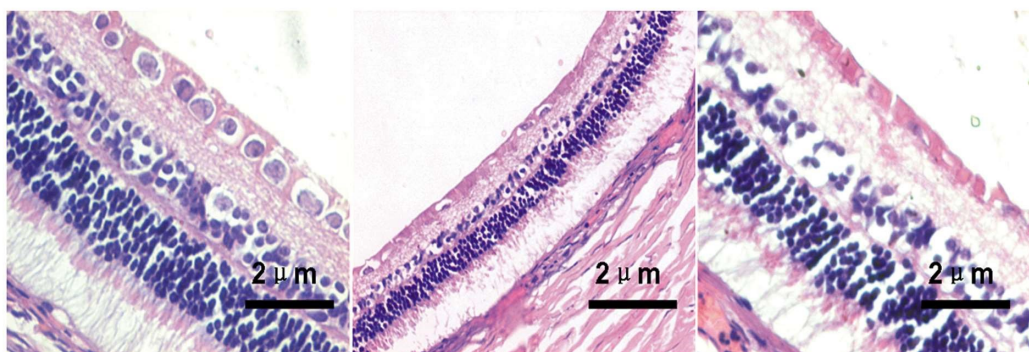


图 1A 组实验眼及所有对照眼 图 2 B 组实验眼 图 3 C 组实验眼

Fig.1 A group of experimental eyes and all control eyes

Fig. 2 experimental group B

Fig. 3 experimental group C

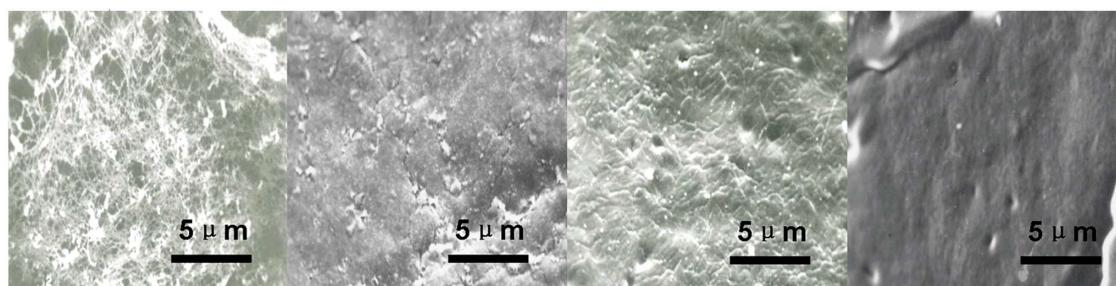


图 4(Fig.4) 图 5(Fig.5) 图 6(Fig.6) 图 7(Fig.7) 图 4(Fig.4) A、B、C 组对照眼 图 5A 组实验眼 图 6B 组实验眼 图 7C 组实验眼

Fig. 4 A, B, C group control eyes

Fig. 5 A set of experiments

Fig. 6 experiments

Fig.7 experimental group C

3 讨论

在玻璃体视网膜手术中,诱导 PVD 对于彻底清除玻璃体后皮质至关重要^[4]。虽然随着现代医学技术的不断发展,玻璃体视网膜手术技术水平也得到了大幅提升,但仅依靠器械仍难以彻底清除玻璃体后皮质,并且器械还可能造成视盘和黄斑损伤,进而导致手术失败^[5]。应用药物诱导 PVD 能够通过破坏玻璃体的凝胶状结构促使玻璃体液化,或者通过与玻璃体视网膜交接面的大分子物质结合将其溶解,从而使玻璃体脱离视网膜

^[6]。纤溶酶及其激活物是目前临床研究最多的 PVD 诱导药物^[7]。

纤溶酶是一种非特异性丝氨酸蛋白酶,能介导纤维溶解,从而促使视网膜与玻璃体后皮质粘结的主要分子物质(纤维连接蛋白、层粘连蛋白及纤维蛋白)水解,进而实现 PVD^[8]。但浓度较高的纤溶酶也会产生纤维蛋白降解产物、激活胶原酶,诱导多形核白细胞,促使弹性蛋白酶释放,产生 IV 型胶原溶解效应,从而对细胞产生一定的毒性作用^[9]。目前,国内外已有多项临床研究证实,在视网膜手术中应用纤溶酶后,玻璃体后皮质会更容易脱离,并且认为纤溶酶诱导玻璃体后脱离存在剂量依赖性

征,应用最低有效浓度是相对安全的^[10]。但是也有部分学者认为纤溶酶的半衰期较短,再加上玻璃体腔内药物有效浓度的持续时间较短,所以纤溶酶所诱导的玻璃体后脱离并不完全,需要联用六氟化硫才能实现完全性玻璃体后脱离^[11-13]。

瑞替普酶是组织型纤溶酶原激活物的缺失变构体,与组织型纤溶酶原激活物相比,瑞替普酶少了糖基化、纤溶酶指状域、表皮生长因子域和 Kringle I,所保留的 Kringle II 能够有效提高纤溶酶原转变为纤溶酶的活性,蛋白酶功能区则能激活纤溶酶原转变为具有生物学活性的纤溶酶^[14-16]。表皮生长因子域能够增加肝脏清除率,糖基化部分能够调节血浆清除率,由于瑞替普酶缺失了这两部分,所以其半衰期会明显延长,其半衰期可达到 18 min,远远长于组织型纤溶酶原激活物(4~6 min)。

本次研究联合应用了赖氨酸-纤溶酶原和瑞替普酶来诱导玻璃体后脱离,前者是纤溶酶原在弹性蛋白水解作用下的产物,其比纤溶酶原更易激活为纤溶酶。国外有动物实验研究^[17,18]显示,兔眼玻璃体腔内注射<200 μg 剂量的赖氨酸-纤溶酶原并不会产生毒性作用。本次实验结果显示三组的实验眼视网膜内界膜表面光滑、完整,无胶原纤维,实现了完全性 PVD,说明三种剂量的瑞替普酶+赖氨酸-纤溶酶原均可诱导完全性 PVD,并且不会造成视网膜损害^[19]。此外,A 组实验眼注药前与注药后 24 h、注药后 2 周的最大混合反应 a 波振幅、b 波振幅比较均无明显差异,说明 1 万 U 瑞替普酶+赖氨酸-纤溶酶诱导玻璃体后脱离不会对实验眼视网膜功能产生明显影响;B 组在注药 24 h 后 a 波振幅、b 波振幅有轻度降低,2 周后均恢复正常,注药前后的 a 波振幅、b 波振幅比较均无明显差异,可见 2 万 U 瑞替普酶+赖氨酸-纤溶酶诱导玻璃体后脱离也不会对视网膜功能产生明显影响;C 组实验眼注药后 24 h 的 a 波振幅、b 波振幅均明显低于注药前和对照眼,注药后 2 周的 b 波振幅均明显低于注药前和对照眼,说明 3 万 U 瑞替普酶+赖氨酸-纤溶酶注药后 24 h 对视网膜功能产生了一定影响,并且在注药后 2 周有所恢复,但视网膜功能仍达不到正常水平^[20]。透射电镜显示 A 组的视网膜组织形态学未发生任何改变,B 组有轻微改变,而 C 组的视网膜组织形态学改变明显,提示 C 组的视网膜组织结构完整性被破坏,说明高剂量的瑞替普酶诱导玻璃体后脱离会对视网膜组织造成一定的损害。

综上所述,玻璃体腔内联合注射赖氨酸-纤溶酶原和瑞替普酶能有效诱导玻璃体后脱离,1 万 U 瑞替普酶+125 μg 赖氨酸-纤溶酶原可诱导实现完全性 PVD,并且不会对视功能、视网膜结构造成损害。但本次实验样本量较小,需大样本实验来进一步证实其诱导 PVD 的有效性及其安全性。

参考文献(References)

- [1] Wang Y, Tian C, Dou G, et al. Surgical efficacy and clinical features of pseudophakic retinal detachment [J]. Chinese journal of ophthalmology, 2014, 16(3): 203-207
- [2] Shi J. 23 g minimally invasive vitreous cutting operation [J]. Jiangsu medicine, 2015, 41(7): 862-863
- [3] Li L, Du H, Li M, et al. Clinical evaluation of ocriplasmin as a vitreolytic agent [J]. Chinese journal of ophthalmology, 2015, 51(2): 155-160
- [4] Grimmer K, Dizon J M, Milanese S, et al. Efficient clinical evaluation of guideline quality: development and testing of a new tool [J]. BMC Medical Research Methodology, 2014, 14(1): 1
- [5] Wang T, Wang Y, Zhao S, et al. Femtosecond laser and lamellar cornea knife made of corneal flap after excimer laser in situ corneal grinding with vitreous postoperative out comparative study [J]. Chinese journal of ophthalmology, 2013, 49(4): 309-314
- [6] Jiang C, Xu G. Vitreous macular interface characteristics of optical coherence tomography [J]. The Chinese journal of ophthalmology, 2012, 28(2): 187-189
- [7] Dong Y K, Joe S G, Baek S, et al. Acute-Onset Vitreous Hemorrhage of Unknown Origin before Vitrectomy: Causes and Prognosis [J]. Journal of Ophthalmology, 2015, 22(3): 89-91
- [8] Yoon G J. Laser in Situ Keratomileusis With New Excimer Laser to Correct Presbyopia in Patients With Hyperopia, Myopia, Emmetropia, or Astigmatism: 6-Month Results [J]. Ascrs, 2015 17(5): 311-313
- [9] Zou H, Ye J. Progression of pharmacologic vitreolysis research [J]. Chinese journal of ophthalmology, 2014, 50(3): 225-229
- [10] Zhu Y, Chen H, Liu C, et al. Excimer laser in situ corneal mill set after vitreous detachment in patients with myopia in young adults [J]. The eye optometry and vision science, 2011, 13(6): 444-448
- [11] Loch, Christian, Bogdahn. Simulation of Drug Distribution in the Vitreous Body After Local Drug Application into Intact Vitreous Body and in Progress of Posterior Vitreous Detachment [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 103(2): 517-526
- [12] Stein S, Bogdahn M, Weitschies W, et al. Influence of Siluron? insertion on model drug distribution in the simulated vitreous body [J]. Current Directions in Biomedical Engineering, 2016, 2(1): 665-668
- [13] Takatori S, Mesman R, Fujimoto T. Microscopic methods to observe the distribution of lipids in the cellular membrane [J]. Biochemistry, 2014, 53(4): 639-653
- [14] Song Z, Ying G, Cao J, et al. Recurrent vitreous hemorrhage in retinal presplitting and from the analysis [J]. Chinese journal of practical ophthalmology, 2013, 31(2): 175-177
- [15] Hasanpour H, Ramezani A, Karimi S. Recurrent Vitreous Hemorrhage in a Case of Retinal Cavernous Hemangioma: A Rare Presentation [J]. Journal of Ophthalmic & Vision Research, 2016, 11(3): 187-189
- [16] Ferenchak K, Duval R, Cohen J A, et al. Intravitreal bevacizumab for postoperative recurrent vitreous hemorrhage after vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy [J]. Retina, 2014, 34(6): 1177-1181
- [17] Shah A R, Williams S, Bauman C R, et al. Predictors of Response to Intravitreal Anti Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Age-Related Macular Degeneration [J]. American Journal of Ophthalmology, 2015, 163(6): 154-166
- [18] Üney GO, Ünlü N, Acar, et al. Role of posterior vitreous detachment on outcome of anti-vascular endothelial growth factor treatment in age-related macular degeneration [J]. Retina, 2014, 34(1): 32-37
- [19] Li N, Lin C, Xiang Z, et al. Glass body cavity medicine injection type joint vitreous surgery choroid detachment retinal detachment [J]. Chinese journal of practical ophthalmology, 2011, 29(11): 1173-1175
- [20] Chen Q, Sun L, Li Z, et al. PDT combined glass body cavity injection of Bevacizumab for the treatment of chronic central serous retinal choroid pathological changes observed [J]. Chinese journal of ophthalmology, 2015, 33(8): 894-898