

· 基础研究 ·

吲哚青绿介导光动力疗法治疗兔眼后发性白内障中视网膜的毒性观察*

梁毓琳¹, 李 兰^{1△}, 张远平², 李云川¹, 查 旭²,
戴红梅¹, 曹 倩¹, 李静华², 杨文艳¹

(1. 云南省昆明市第一人民医院眼科 650034; 2. 昆明医科大学附属第二医院眼科, 昆明 650000)

摘要:目的 研究吲哚青绿介导光动力疗法治疗兔眼后发性白内障后, 兔眼视网膜的损伤情况。方法 32 只兔眼随机分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 分别行晶状体超声乳化及皮质吸出术, 低、中、高剂量组术后前房内注入 0.5 mL 浓度分别为 1.25、2.50、5.00 mg/mL 的吲哚青绿, 用 810 nm 的半导体激光对囊膜进行低能量(50 mW/cm)照射 2 min。术后 3 个月时对兔眼进行闪光视觉诱发电位检查后取材行透射电镜观察兔眼视网膜有无损伤。结果 晶状体后囊膜混浊情况均有减轻, 各組间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。同时前房内注入浓度为 1.25 mg/mL 吲哚青绿组兔眼视网膜电镜损伤相对较小, 各实验组行闪光视觉诱发电位结果之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 吲哚青绿介导的光动力疗法可明显降低术后晶状体后囊膜混浊的程度, 而同时吲哚青绿浓度为 1.25 mg/mL 治疗组对视网膜的损伤最小。

关键词: 视网膜; 吲哚青绿; 透射电镜

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.06.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)06-0655-02

Observation on the toxic effect of indocyanine green mediated photodynamic therapy on retina of rabbits with after-cataract*

Liang Yulin¹, Li Lan^{1△}, Zhang Yuanping², Li Yunchuan¹, Zha Xu², Dai Hongmei¹,
Cao Qian¹, Li Jinghua², Yang Wenyan¹

(1. Department of Ophthalmology, First People's Hospital of Kunming City, Kunming, Yunnan 650034, China; 2. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650000, China)

Abstract: Objective To observe the toxic effect of indocyanine green mediated photodynamic therapy on retina in rabbits with after-cataract. Methods 32 rabbits' eyes were randomly divided in 4 groups. Extracapsular lens extraction by phacoemulsification was operated on rabbits' eyes. 0.5 mL ICG (1.25 mg/mL, 2.50 mg/mL, and 5.00 mg/mL) was injected into the anterior chamber after surgery respectively, and the eye was illuminated with a diode laser (wavelength 810 nm) for 2 min. 3 months after surgery, the toxic effect on retina was observed by electron microscope and FVEP. Results Each group had effects and degree of the rabbits' PCO was related to the dose of ICG ($P < 0.01$). The toxic effect on retina in 1.25 mg/mL group was less than that in other groups. The result of FVEP in each group had no significant difference ($P > 0.05$). Conclusion PDT with ICG greatly reduces the degree of PCO. The toxic effect on retina in ICG of 1.25 mg/mL group was least.

Key words: retina; indocyanine green; transmission electron microscope

吲哚青绿染料(indocyanine green, ICG)是一种水溶性无毒三碳菁染料,曾广泛应用于眼科各类疾病的检查诊断中。近年来,由于后发性白内障已成为影响白内障患者术后拥有良好视力的主要因素,在研究后发障的实验中,ICG被作为一种光敏剂使用,并于动物实验及体外实验中取得了较好的治疗效果。Melendez的体外实验证实,ICG对晶状体上皮细胞具有光动力毒性,并呈剂量依赖性。在近几年对白内障术后的后发障治疗中,寄予了吲哚青绿更多的期望并加强了对其临床及基础方面的研究。本研究在利用 ICG 介导光动力治疗后发障实验中,通过透射电镜观察视网膜有无损伤,了解在 ICG 介导激光治疗后发障实验中后对视网膜有无不良反应。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 32 只新西兰兔,雌雄兼备,体质量 2.0~2.5 kg,随机分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 8 只。

1.2 方 法

1.2.1 记录仪器 重庆艾尔曦医疗器械设备有限公司生产的 IVE 205A 电生理检查仪。

1.2.2 刺激参数 采用全视野闪光刺激器,白光刺激,刺激强度为 $1.6 \text{ cd} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.2.3 实验步骤 分组后的新西兰兔,行晶状体超声乳化手术,术前房内注入 0.5 mL 浓度分别为 1.25 mg/mL(低剂量组),2.5 mg/mL(中剂量组),5 mg/mL(高剂量组)的 ICG 后分别注入气体,使气体泡与角膜内皮相接触,隔离 ICG 与角膜内皮的接触,用 810 nm 的半导体激光对囊膜进行低能量(50 mW/cm)照射 2 min 后完毕,冲洗出 ICG,关闭切口。术后 3 个月,按晶状体后囊增生混浊程度并分级,分级标准:按 Odrich 后囊膜混浊分级法(0 级为透明;1 级为轻度混浊,能看清眼底或混浊面积小于 1/2 后囊膜面积;2 级为中度混浊,能模糊看见眼底或混浊面积大于 1/2 后囊膜面积;3 级为完全混浊,不能看见眼底。

再对兔眼行闪光视觉诱发电位检查。在视区皮层记录到

* 基金项目:昆明市科技局基金资助项目(08S090207)。 作者简介:梁毓琳(1978~),主治医师,硕士,主要从事眼科眼表及眼底疾病研究。 △ 通讯作者, Tel:13888584899; E-mail:lldflz@sina.com。

主要成分为 NPN 的 3 相波,其中,P 波的出现率为 100%,潜伏期最稳定,幅值也较高。故本试验只测量 P 波的潜伏期、波幅、时程。检查方法为均选取右眼电极,所有家兔均在清醒状态下,充分散瞳中后于暗室内放置 30 min,支架固定头部,室温 18~24 ℃。记录电极刺于后枕区皮下,枕骨粗隆左右旁开 0.5 cm 处,参考电极刺于乳突处皮下,接地电极刺于鼻根处^[1]。检查结束后处死动物,取出眼球,制作透射电镜视网膜标本。最后分别观察不同组别兔眼视网膜损伤情况。

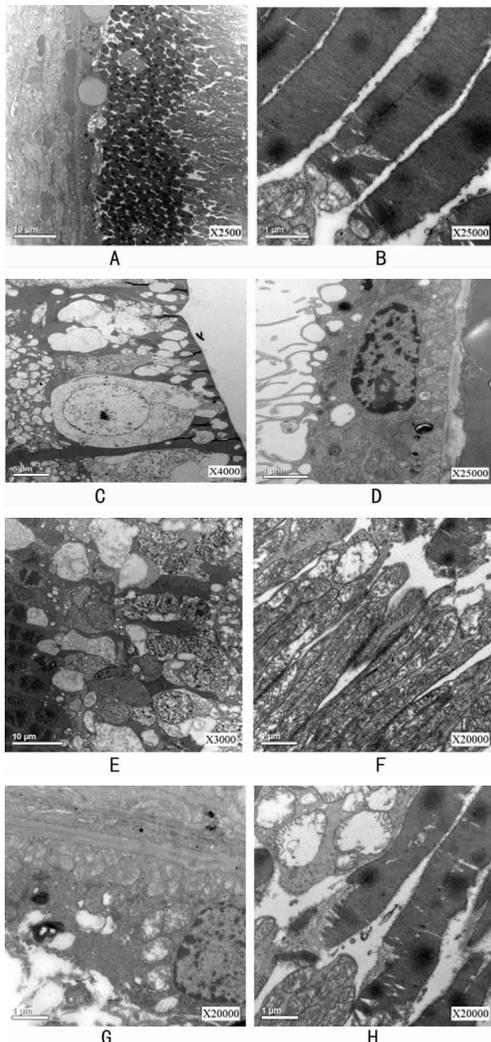
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,兔眼晶状体后发障程度观察结果采用 χ^2 检验,兔眼闪光视觉诱发电位 P 波采用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

术后 3 个月,各组兔眼晶状体后发障程度观察结果($\chi^2 = 122.49$),差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 术后第 3 个月晶状体后囊膜混浊情况($n=8$)

组别	0 级	1 级	2 级	3 级
对照组	0	2	5	1
低剂量组	2	5	1	0
中剂量组	4	2	2	0
高剂量组	4	3	1	0



A、B:对照组;C、D:低剂量组;E、F:中剂量组;G、H:高剂量组。

图 1 视网膜电镜图片

经闪光视觉诱发电位检测,实验各组兔眼闪光视觉诱发电位 P 波经配对 t 检验潜伏期($t=0.374, r=0.033$),波幅($t=2.187, r=0.251$)、时程($t=1.766, r=0.566$)与对照组比较均无较大差异($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组闪光视觉诱发电位的 P 波潜伏期、波幅、时程($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	潜伏期	波幅	时程
对照组	113.37 ± 15.25	8.85 ± 1.90	68.58 ± 7.99
低剂量组	111.01 ± 8.81	10.54 ± 1.64	63.94 ± 7.97
中剂量组	105.13 ± 14.22	9.60 ± 1.57	60.01 ± 8.59
高剂量组	110.64 ± 12.33	9.75 ± 2.31	63.07 ± 5.39

视网膜透射电镜检查可见使用 ICG 各组兔眼视网膜结构均有不同程度损伤,以神经节细胞,膜盘水肿,以及线粒体损伤较明显,其中低剂量组兔眼视网膜损伤相对较轻,双极细胞与水平细胞胞质存在。RPE 细胞层呈单细胞排列无水腫等改变,与视网膜神经层黏附良好,损伤层次局限于视锥细胞层。而中剂量组及高剂量组则可见视网膜全层均有不同程度损伤。对照组视网膜各层未见损伤,见图 1。

3 结 论

ICG 原被用于视网膜和脉络膜血管造影四十年,因其分子大,可与蛋白结合,对光敏感,吸收峰(805 nm)与传统半导体激光波长(810 nm)相近,皮肤光毒性低,组织靶向性高,生物分布和清除迅速,使用操作简单等特点使近年来其眼科用途逐渐扩大,已广泛用于眼底视网膜手术中。但目前经临床随访和实验研究发现 ICG 在眼内使用,无论是单独使用或联合光照都具有潜在的神经毒性和视网膜毒性^[2-3]。Rezai 等^[4]研究发现,ICG 作用于 RPE 后明显提高其凋亡率。Haritoglou 等^[5]对 10 例 ICG 染色后剥除的内界膜用透射电子显微镜进行分析显示,视网膜内界膜面有 Muller 细胞的损伤和细胞破裂。推测与 ICG 属于高分子物质,具有很强的亲水性,溶解后包浆渗透提高,造成细胞水肿有关。王文莹等^[6]发现,ICG 对体外培养 RPE 细胞生长有明显抑制作用并呈浓度和时间依赖性。考虑为体内多种细胞可主动转运摄取 ICG,导致细胞内 ICG 浓度较高后细胞水肿。多项实验证明了 ICG 长期存留对眼组织有潜在的危险^[7]。国内何晓静等^[8]研究发现,经光动力治疗后,细胞外节段排列轻微紊乱,RPE 细胞轻微内质网扩张,其内可见髓样小体。考虑机制为当激光作用于视网膜时,视网膜色素上皮的损伤,色素屏障受破坏,结果提示能量能对光感受器和色素上皮起作用^[9]。宋志杰等^[10]在使用 ICG 染色视网膜内界膜治疗黄斑裂孔时亦发现其药物毒性与剂量呈相关,并随随访时间的延长,视网膜水肿能够逐渐减轻。李雁杰等^[11]研究亦发现无论是低浓度还是高浓度的 ICG 直接用于都会对视网膜造成损伤。

本实验中 ICG 虽不直接作用于眼底,但药物滞留于后囊膜 3 个月,通过缓慢代谢,可能有部分 ICG 弥散到玻璃体腔及视网膜前造成损害,并可能随浓度增加和作用时间延长,对细胞毒性作用逐渐增强。为了解 ICG 引导光动力治疗后发障后是否也存在对视网膜细胞的毒性作用,从而更加全面评价本实验的治疗价值和不良反应,对不同药物浓度组别分别观察视网膜电镜结果,同时行闪光视觉诱发电位检查。本实验设立了手术对照组,目的是为了了解手术是否会对视网膜造成损伤。手术对照组术后 3 个月电镜显示视网膜各层排(下转第 659 页)

业的发展较快,居民对西医的认可度一再攀高,很多综合医院业务收入也主要来源于西医相关科室,而中医相关科室或者中医类医院却出现了日渐凋零的迹象,很多病人为追求治病速度,问药西医,可见中医药的价值地位有被抹灭倾向。但实际上中医学是中华民族、中国文化的宝贵遗产,是经历了几千年的沉淀而流传至今的学科,因此应大力推广中医药宣传,增加民众对中医药价值的肯定,这样才能使更多的民众问药于中医。从而从“需”推动中医药事业的发展。

本文认为,通过上述努力,能解决中医药事业发展道路上的“供需”双方矛盾,从而加快中医药事业的发展。

参考文献:

- [1] 陈璐,鲁静,陈磊. 中医药进社区的现状与发展趋势[J]. 中国中医药信息杂志,2010,(17)10:3-4.
- [2] 周春祥. 名老中医经验总结与传承过程中的问题与思考[J]. 江苏中医药,2004,25(12):1-4.
- [3] 万德昌. 浙江省主要中药材 2005 年度产销情况分析和 2006 年产销走势预测[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(5):108-110.
- [4] 李建国,华伦荣,林辉广. 广东中医人力资源需求与预测[J]. 中国中医药现代远程教育,2009,7(5):84-85.
- [5] 武继彪,徐传庚,宋永刚,等. 中医相关类职业教育现状分析与人才需求预测[J]. 中医教育,2010,29(1):80-83.
- [6] 袁索. 中医药人才培养现状及对策探讨[J]. 中医药学刊,2005,23(3):146-148.

- [7] 邵湘宁,魏高文,聂绍通,等. 我国中医职业教育现状分析评价[J]. 中医教育,2003,22(3):58-61.
- [8] 王建伟. 基于小波分析和神经网络的股票预测方法[D]. 北京:北京工业大学,2004.
- [9] 于繁华. 基于小波神经网络的变参数振动钻削仿真与预测[D]. 吉林:吉林大学,2004.
- [10] 杜永峰,陈文元. 小波分析与神经网络在结构损伤监测中的应用[J]. 兰州理工大学学报,2005,31(5):121-124.
- [11] Pei J, Han J. Mining sequential pattern sufficiently by prefix-projected pattern growth [J]. Data Engineering, 2001,8(4):215-224
- [12] 飞思科技产品研发中心. 神经网络理论与 MATLAB7 实现[M]. 北京:电子工业出版社,2005:3.
- [13] 姜孝华,彭啸亚. 滑动窗 Walsh 基函数神经网络检测电能质量扰动[J]. 电力系统及其自动化学报,2011,23(3):74-78.
- [14] 王辉,杨杰. 一种基于神经网络的图像复原方法[J]. 红外与激光工程,2006,35(4):121-125.
- [15] Kong F, Chen R. A combined method for triplex pump fault diagnosis based on wavelet transform, fuzzy logic and neuron-net-works [J]. Mechanical Systems Signal Processing,2004,30(18):49-54.

(收稿日期:2012-11-02 修回日期:2012-12-03)

(上接第 656 页)

列整齐、层次清晰,与正常兔眼视网膜电镜图片对比未见明显结构改变。说明该手术对视网膜结构无明显影响。

本实验表明,利用 ICG 介导的光动力作用在治疗兔眼后发障有效的同时,因 ICG 缓慢的弥散至玻璃体腔,不同浓度的 ICG 组均能对视网膜造成损伤,并呈剂量相关。低剂量组损伤较轻,高剂量组则损伤相对增多,在本实验中以浓度为 1.25 mg/mL ICG 治疗时损伤最少。结果与各类实验中将 ICG 直接用于视网膜前结果类似。同时实验各组未造成 RPE 的脱离及细胞凋亡,闪光视觉诱发电位与对照组 P 波潜伏期,波幅及时程比较均无明显差异,且与正常兔眼闪光视觉诱发电位实验值较为接近^[12]。可考虑今后在进一步利用 ICG 介导光动力防治晶状体后发障时,采用低浓度组治疗,以在取得治疗效果的同时将视网膜损伤降为最低。

参考文献:

- [1] 李超英,王良君,李臻. 家兔视觉诱发电位正常值观测[J]. 青岛医学杂志,2005,37(3):164-165.
- [2] Dietz FB,JEaffe RA. Indocyanine green:evidence of neurotoxicity in spinal root axons[J]. Anesthesiology,2003,98(7):516-520.
- [3] Yam HF,Kwok AK,Chan KP,et al. Effect of indocyanine green and illumination on gene expression in humanpigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2003,44(4):370-377.
- [4] Rezaei KA, Farrekh-Siar L, Ernest JT, et al. Lndecyanine green induces apoptosis in human retinal pigment epithe-

lia 118[J]. Ophthalmol,2004,137(5):931-933.

- [5] Haritoglou C, Gandorfer A, Gass CA, et al. Indocyanine green-sisted peeling of the internal limitingmembme in macular holesurgery affects visual outcome;a elinicopathologic correlation[J]. Am J Ophthalmol,2002,134(6):836-841.
- [6] 王文莹,张哲. 吲哚青绿对人视网膜色素上皮细胞和神经胶质细胞的影响[J]. 眼科,2004,13(21):47-51.
- [7] Horiguchi M, Nagata S, Yamamoto N, et al. Kinetics of indocyanine green dye after intraocular surgeries using indocyanine green staining[J]. Arch Ophthalmol,2003,12(1):327-331.
- [8] 何晓静,陈雪艺. 微脉冲半导体激光与氩激光对兔视网膜损伤的形态学比较[J]. 国际眼科杂志,2008,5(8):916-918.
- [9] Peng C, Huang H, Shen XJ, et al. The effect of argon pan-retinal photocoagulation for diabetic retinopathy[J]. Int J Ophthalmol,2007,7(3):833-834.
- [10] 宋志杰,吕林. 降低吲哚青绿着染内界面对黄斑区毒性的研究[J]. 中国实用眼科杂志,2007,1(25):105-107.
- [11] 李雁杰,成霄黎,王丽聪. 玻璃体手术中吲哚青绿对视网膜结构的影响[J]. 山西医药杂志,2007,11(36):980-982.
- [12] 卜博,周定标,许百男. 兔闪光刺激视觉诱发电位正常值测定[J]. 中国临床康复,2006,70(6):46-47.

(收稿日期:2012-10-20 修回日期:2012-12-05)