

兔视网膜在不同阈值激光作用后 MMP-9 表达的变化

王春燕, 李慧丽, 李小丹, 余海, 傅燕

基金项目: 重庆市基础与前沿研究计划 (No. cstc2013jcyjA10135)

作者单位: (400021) 中国重庆市中医院眼科

作者简介: 王春燕, 毕业于重庆医科大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 李慧丽, 毕业于重庆医科大学, 主任医师, 科主任, 研究方向: 眼底病. lhl117@icloud.com

收稿日期: 2017-03-08 修回日期: 2017-06-05

Changes of MMP-9 expression in rabbit retina after laser irradiation at different thresholds

Chun - Yan Wang, Hui - Li Li, Xiao - Dan Li, Hai Yu, Yan Fu

Foundation item: Basic and Frontier Research Program of Chongqing (No. cstc2013jcyjA10135)

Department of Ophthalmology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China

Correspondence to: Hui - Li Li. Department of Ophthalmology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China. lhl117@icloud.com

Received: 2017-03-08 Accepted: 2017-06-05

Abstract

• AIM: To observe the changes of MMP-9 expression in rabbit retina after laser irradiation at different thresholds of 577nm.

• METHODS: Twenty - six pigmentation rabbits were randomly divided into normal control group ($n = 2$), conventional photocoagulation group ($n = 6$) and subliminal micropulse laser photocoagulation group ($n = 18$). The conventional photocoagulation group was treated with 577nm laser photocoagulation, subcutaneous micro-pulsed laser photocoagulation at a working loading rate of 9%, 12% and 15%, respectively. Eighteen rabbits were again divided into three subgroups according different powers of subthreshold working loading rate of 9% ($n = 6$), 12% ($n = 6$) and 15% ($n = 6$) that undertook, respectively. The expression of MMP-9 on the retina of rabbit eyes was detected by immunohistochemistry.

• RESULTS: In the conventional photocoagulation group, the expression of MMP-9 in the RPE layer and the visual cell layer was strongly positive, which was significantly higher than that in the sub-micro pulse group ($P < 0.05$). Less MMP-9 positive expression of RPE layer and visual cell layer in the working loading rate of 9% subgroup, and more MMP-9 positive expression of RPE layer and visual

cell layer in the working loading rate of 12% subgroup; little expression was also noted in the nucleus of RPE and visual cell layer. Moderate MMP-9 positive expression of RPE layer and visual cell layer was observed in the working loading rate of 15% subgroup. There were no significant differences between the three subgroups ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: The 577nm subliminal micro - pulsed photocoagulation has high selectivity to retinal pigment epithelium at working load rate of 9%, 12% and 15%, and no damage to retinal nerve fiber layer, which is safer than conventional 577nm laser photocoagulation.

• KEYWORDS: subthreshold micropulse laser; retina; MMP-9

Citation: Wang CY, Li HL, Li XD, et al. Changes of MMP-9 expression in rabbit retina after laser irradiation at different thresholds. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(7):1242-1244

摘要

目的: 观察兔视网膜在不同阈值 577nm 激光作用后 MMP-9 的表达变化。

方法: 将色素兔 26 只采用抽签法随机分为正常对照组 2 只、常规光凝组 6 只和阈下微脉冲光凝组 18 只。正常对照组不做任何处理, 常规光凝组行 577nm 激光光凝, 阈下微脉冲光凝组又亚分为三个亚组, 分别行 9%、12%、15% 工作负载率的 577nm 阈下微脉冲激光光凝。采用免疫组织化学法检测各组兔眼视网膜上 MMP-9 的表达情况。

结果: 常规光凝组: RPE 层及视细胞层 MMP-9 呈强阳性表达, 较阈下微脉冲组明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阈下微脉冲组: 9% 工作负载率见 RPE 层及视细胞层 MMP-9 少许阳性表达, 12% 工作负载率见 RPE 层及视细胞层阳性表达增多, 胞核也出现少许阳性表达, 15% 工作负载率 RPE 层及视细胞层中度阳性表达, 三个亚组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论: 577nm 阈下微脉冲光凝在 9%、12%、15% 工作负载率下对视网膜色素上皮层具有高度选择性, 对视网膜神经纤维层无明显损伤, 较常规 577nm 激光光凝更加安全。

关键词: 阈下微脉冲激光; 视网膜; MMP-9 蛋白

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.7.10

引用: 王春燕, 李慧丽, 李小丹, 等. 兔视网膜在不同阈值激光作用后 MMP-9 表达的变化. *国际眼科杂志* 2017;17(7):1242-1244

0 引言

视网膜激光光凝是治疗视网膜疾病的一种重要而有效的手段, 挽救了无数眼底病患者的视力。视网膜激光主要是光热效应, 激光的能量被 RPE 细胞吸收后向四周传

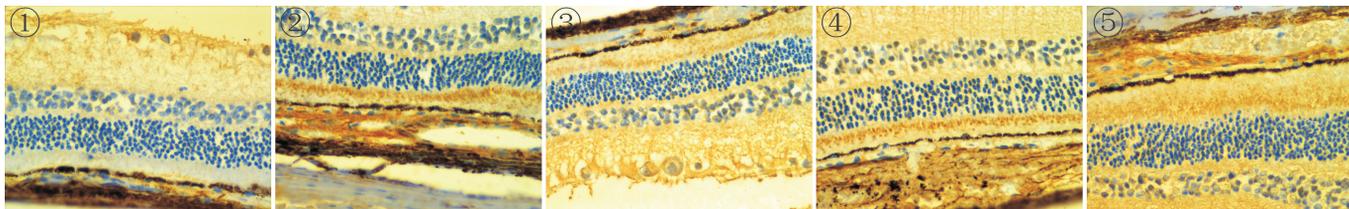


图1 正常对照组,视网膜各层均未见阳性表达(SP,×400)。
图2 常规光凝组(RPE层及视细胞层大量棕黄色颗粒聚集,强阳性,×400)。
图3 9%阈下组(RPE细胞散在分布淡黄色颗粒,弱阳性,×400)。
图4 12%阈下组(RPE细胞及视细胞胞浆均匀表达黄褐色颗粒,中等阳性,×400)。
图5 15%阈下组(RPE细胞胞浆均匀表达黄褐色颗粒,中等阳性,×400)。

导,导致光感受器细胞破坏、Bruch膜破裂、脉络膜充血和血栓形成^[1-2],术后并发症主要有脉络膜新生血管^[3-4]、视网膜下纤维化^[5]、激光斑瘢痕逐渐增大和视野缺损^[5-7]等。阈下微脉冲视网膜光凝治疗是近年来眼底病激光治疗的研究热点,微脉冲激光是一种短促的高频率重复脉冲激光,可避免光感受器细胞损伤及视野暗点的形成^[8]。本研究主要通过对成年色素兔视网膜进行常规577nm光凝和阈下微脉冲光凝,观察激光后兔视网膜MMP-9免疫组织化学表达改变,进行半定量分析对比研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年有色家兔26只,普通级,雌雄不限,体质量1.5~2.5kg,重庆市中药研究院实验动物研究所提供,许可证号:SCXK(渝)2012-0006;遵循国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。每只兔的右眼均为实验眼,实验前双眼前节和眼底检查均正常。

1.1.2 仪器设备 法国光太(Supra 577Y)眼底激光机,日本立德克OCT,康华眼底照相成像系统,日本Olympus双目生物显微镜,LKB公司11800修块机,8800超薄切片机,山羊抗MMP-9抗体(Abcam公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将26只色素兔按照体质量由轻到重进行编号,然后采用抽签方法随机分为正常对照组2只2眼、常规光凝组6只6眼和阈下微脉冲光凝组18只18眼,其中阈下微脉冲光凝组按照激光工作负载率的不同又亚分为9%、12%和15%共3个亚组,每个亚组色素兔各6只6眼,分别行9%、12%、15%工作负载率的577nm阈下微脉冲激光光凝;正常对照组不做任何处理;常规光凝组均行577nm激光光凝。

1.2.2 激光方法 复方托品酰胺眼液散瞳,肌注速眠新2号(0.4mL/kg)麻醉后,盐酸奥布卡因滴眼液行表面麻醉,由助手将兔固定在裂隙灯,角膜放置全视网膜激光镜,使用甲基纤维素作为耦合剂,为使相对应比较的光凝灶具有接近的视网膜条件(减少因中心至周边视网膜厚度或激光照射角度微小差异的可能影响),以视盘有髓神经纤维为标志线,距其下方2PD的区域作9个光斑×9个光斑的标志光凝区,每个标志光斑直径为200 μ m,间隔一个光斑距离,在此区域内作为实验区,行激光治疗。

1.2.3 微脉冲激光参数设置 参照577nm阈下微脉冲参数设计公式(滴定=曝光时间×功率)。首先设置577nm激光曝光时间0.10s,然后测试0.10s曝光时间连续模式下形成2级反应光斑所需的激光功率为滴定值。微脉冲

组分别在微脉冲各自负载率情况下采用0.10s曝光时间,微脉冲激光功率是滴定值的一半。具体参数为:(1)9%阈下组:工作“ON”时间0.20ms,间歇“OFF”时间2.00ms,工作负载率为9%;(2)12%阈下组:工作“ON”时间0.20ms,间歇“OFF”时间1.50ms,工作负载率为12%;(3)15%阈下组:工作“ON”时间0.17ms,间歇“OFF”时间1.00ms,工作负载率为15%。

1.2.4 免疫组化检查 标本制作步骤严格按照免疫组织化学染色SP试剂盒说明书操作。组织切片脱蜡,PBS缓冲液振洗3次,每次3min;放入已沸腾的高压锅中进行组织抗原热修复,继续加热至喷气,2min后停止对压力锅加热,冷却至室温,蒸馏水冲洗两次,PBS液振洗3次,每次3min;30mL/L H₂O₂去离子水消除内源性过氧化物酶活性,室温下孵育10min,PBS缓冲液振洗3次,每次3min;正常山羊血清封闭,室温孵育15min;加浓度为1:100稀释的第一抗体,37℃孵育2h,PBS缓冲液振洗3次,每次3min;加生物素标记的第二抗体(稀释浓度为1:200),37℃孵育15min,PBS缓冲液振洗3次,每次3min;加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育15min,PBS缓冲液振洗3次,每次3min;DAB显色,苏木素浅染,脱水,封片,镜检。光学显微镜下(×400)观察RPE层,MMP-9阳性表达为细胞质黄色或棕黄色染色。应用OPTION VIDAS图像分析系统对结果进行分析,每张切片取5个视野,每个视野面积为0.2mm×0.2mm,得视野中棕黄色阳性染色的平均吸光度(A)值,对视网膜组织中MMP-9蛋白的表达进行半定量分析。

统计学分析:采用SPSS18.0统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不同剂量组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用SNK-q检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

正常对照组:为正常视网膜免疫组化图片,视网膜各层未见黄色或棕黄色颗粒(图1)。常规光凝组:RPE层MMP-9蛋白表达呈强阳性,大量棕黄色颗粒主要聚集在RPE层及视细胞层细胞的胞浆中(图2),平均灰度值为 0.330 ± 0.040 。工作负载率为9%的阈下组:RPE层MMP-9蛋白的表达呈弱阳性,淡黄色颗粒散在分布于RPE细胞胞浆(图3),平均灰度值为 0.178 ± 0.040 ;工作负载率为12%和15%的阈下组:MMP-9蛋白均呈中度阳性表达,其黄色颗粒均匀表达于RPE细胞胞浆(图4~5),其平均灰度值分别为 0.190 ± 0.067 、 0.210 ± 0.060 。常规光凝组MMP-9蛋白表达明显多于阈下组三个不同工作

负载率处理的蛋白表达,差异有统计学意义($F=6.620$, $P<0.05$)。

3 讨论

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是一组锌离子依赖性内肽酶,主要作用是降解胶原等细胞外基质(extracellular matrix, ECM),目前确定的MMPs家族成员至少有26种,其中MMP-9是家族中能降解IV型胶原、V型胶原、纤维黏连蛋白和弹性蛋白的明胶酶^[9]。实验发现^[10],RPE细胞能合成多种MMPs和基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs),包括MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和TIMP-1,MMPs-TIMPs的平衡维持着体内合成降解ECM的平衡,是维持组织器官正常结构和生理功能的关键。大量研究表明^[11-12],MMP-9与视网膜脉络膜新生血管形成及纤维化关系密切。常规激光后脉络膜新生血管的形成主要是通过MMP-9降解基底膜蛋白成分,降解Bruch膜,促使脉络膜新生血管突破Bruch膜,在视网膜色素上皮下生长,从而形成脉络膜新生血管膜^[13]。目前研究证实^[14],光损伤后MMP-9在RPE层的表达随着光照时间的延长而增加,MMP-9参与了视网膜光损伤的机制。

常规577nm激光治疗的作用时间为全部曝光时间,RPE细胞吸收热量后造成局部组织连续升温,局部组织在短时间内蛋白质凝固坏死,形成光凝斑,达到了治疗目的,但治疗的同时伴有严重的光感受器和脉络膜毛细血管的破坏,导致视野缺损,中心视力下降,脉络膜新生血管形成及视网膜纤维化等副作用^[15]。阈下微脉冲激光是一种短促的高频率的重复脉冲激光,即一个完整的脉冲时间包含了一系列的微小的“开-关”脉冲:即激光作用时间“ON”和间歇时间“OFF”。当治疗在“ON”时,RPE细胞将吸收能量,将光能转化成热能,在“OFF”时,暂停治疗工作,RPE细胞将吸收的热能局部扩散,组织温度降低,造成局部组织不连续的温度升高。微脉冲激光只对RPE层起作用,对光感受器和脉络膜毛细血管的影响很小,在提高患者视力的同时,减少视野缺损及脉络膜新生血管的形成^[15],更好地保护患者的视功能。

577nm波长激光因在屈光介质的散射少,不被黄斑区叶黄素吸收且对氧合血红蛋白吸收率高,而被认为是眼底激光治疗的最佳波长。法国光太飞黄577nm多点微脉冲激光治疗实用指南证实,577nm阈下微脉冲能产生持续的、且只局限于RPE的光热效应,保护了视网膜感觉神经层组织,同时建议微脉冲占空比的设置选取9%、12%及15%。《法国光太飞黄激光577nm多点微脉冲激光治疗实用指南》中多篇文献研究表明,三个占空比的阈下激光未引起明显的视网膜治疗损伤,阈下微脉冲激光治疗的效果与常规激光的疗效相同,同时对RPE内灼伤周围组织的医源性损伤更小。本研究选择9%、12%、15%三个占空比的577nm阈下微脉冲激光光凝,选择RPE层MMP-9表达行免疫组化,对视网膜不同阈值激光后MMP-9作半定量分析,观察不同阈值激光下视网膜RPE层是否有损伤,损伤程度是否不同,以此研究不同占空比微脉冲激光对兔视网膜损伤的影响。

本实验免疫组织化学证明,常规577nm激光光凝后兔视网膜RPE细胞MMP-9蛋白表达致密,在RPE层及其周边呈棕黄色聚集,与阈下组RPE层MMP-9蛋白表达差异有统计学意义。577nm阈下激光三个不同占空比亚组之间比较,兔视网膜RPE层MMP-9表达差异无统计学意义。本研究证实阈下组微脉冲激光对兔视网膜RPE层产生了反应,发挥了激光治疗作用,但对视网膜RPE层及其周围组织损伤轻微。我们考虑上述情况受多种因素影响,主要与样本量太小、激光治疗剂量的不确定性、实验制片过程的精确度以及统计学检验标准不同等多种因素相关。本研究兔视网膜阈下微脉冲激光与传统激光相比较,阈下微脉冲激光对组织损伤更轻微,阈下微脉冲组三个不同占空比之间兔视网膜MMP-9半定量分析比较无统计学差异。

参考文献

- 1 Dastgheib K, Bressler SB, Green WR. Clinicopathologic correlation of laser lesion expansion after treatment of choroidal neovascularization. *Retina* 1993;13(4):345-352
- 2 李涛,罗清礼,吴海英.人视网膜激光光凝后荧光血管造影和超微结构研究. *四川大学学报(医学版)* 2004;35(2):234-237
- 3 Lewis H, Schachat AP, Haimann MH, et al. Choroidal neovascularisation after laser photocoagulation for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 1990;97(4):503-510
- 4 Nehemy M, Torqueti - Costa L, Magalhães EP, et al. Choroidal neovascularization after accidental macular damage by laser. *Clin Exp Ophthalmol* 2005;33(3):298-300
- 5 Rutledge BK, Wallow IH, Poulsen GL. Sub-pigment epithelial membranes after photocoagulation for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 1993;111(5):608-613
- 6 Schatz H, Madeira D, McDonald HR, et al. Progressive enlargement of laser scars following grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 1991;109(11):1549-1551
- 7 Lovestam-Adrian M, Agardh E. Photocoagulation of diabetic macular oedema complications and visual outcome. *Acta Ophthalmol Scand* 2000;78(6):667-671
- 8 Schuele G, Rumohr M, Huettmann G, et al. RPE damage thresholds and mechanisms for laser exposure in the microsecond to millisecond time regimen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(2):714-719
- 9 冯树,宋金丹.参与肿瘤侵袭和转移的细胞外基质降解酶. *肿瘤防治研究* 1999;29(1):72-74
- 10 Stetler-Stevenson WC. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 2008;1(27):re6
- 11 Das A, McLamore A, Song W, et al. Retinal neovascularization is suppressed with a matrix metalloproteinase inhibitor. *Arch Ophthalmol* 1999;117(4):498-503
- 12 刘东宁,刘哲丽.增殖性糖尿病视网膜病变基质金属蛋白酶的表达. *国际眼科杂志* 2007;7(3):682-684
- 13 曾军,姜德咏,刘湘平,等. MMP-2和MMP-9在脉络膜新生血管膜的表达. *眼科新进展* 2004;24(6):455-457
- 14 姜文静.光损伤后基质金属蛋白酶在视网膜色素上皮的表达及EPO对其的影响. 2007年青岛大学硕士论文
- 15 田璐,徐延山.中心性浆液性脉络膜视网膜病变激光治疗方法研究进展. *中国激光医学杂志* 2011;20(3):188-193