

## · 实验研究 ·

# 高强度聚焦超声辐照活体兔眼角膜对视网膜形态学的影响

李美璇 杜之渝 王梦蕾 晏丕松 张珂 李崇燕

400010 重庆医科大学附属第二医院眼科中心(李美璇、杜之渝、王梦蕾);400050 重庆明达眼科(晏丕松、张珂);400016 重庆医科大学生物医学工程学院省部共建超声医学工程国家重点实验室培育基地 超声医学工程重庆市重点实验室(李崇燕)

通信作者:杜之渝,Email:dr. duzhiyu@163. com

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 06. 005

**【摘要】** **背景** 目前,高强度聚焦超声(HIFU)作为一种新兴的无创技术可通过辐照角膜以改变角膜曲率,从而矫治老视,然而其辐照角膜后对视网膜的安全性研究鲜见报道。**目的** 探讨 HIFU 辐照活体兔眼角膜后对视网膜组织的影响,为其临床治疗的安全性提供实验依据。**方法** 选择健康成年新西兰大白兔 41 只,用 HIFU 以圆环状定位辐照活体兔右眼角膜基质 6 s,辐照环直径约为 9 mm,左眼不接受干预,作为对照组。分别于辐照后第 1、7、14、30、60、90 天各处死 6 只实验兔,收集双侧眼球。取其中 3 只实验兔眼球剥取视网膜,行超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)浓度检测;其余 3 只实验兔眼球常规石蜡包埋并行组织病理学、勿动蛋白 A(Nogo-A)免疫组织化学及 TUNEL 凋亡染色观察。取 5 只实验兔分别于辐照前及辐照后第 1、7、14、30、60、90 天接受 OCT 扫描,观察视网膜厚度变化。**结果** 实验兔对照眼可见视网膜分为 10 层,各层视网膜结构完整,边界清晰,细胞排列规则,HIFU 辐照角膜后不同时间点实验兔视网膜组织学形态与对照眼比较无明显改变。对照眼和手术后各时间点实验兔视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均有少量的 Nogo-A 蛋白表达,各组在术后不同时间点视网膜中 Nogo-A 表达量总体比较,差异均无统计学意义( $F_{\text{分组}} = 0.672, P = 0.413; F_{\text{时间}} = 1.622, P = 0.157$ )。各组兔眼在术后不同时间点视网膜匀浆中 SOD 活性及 MDA 浓度均无明显变化,总体比较差异均无统计学意义( $SOD: F_{\text{分组}} = 0.167, P = 0.684; F_{\text{时间}} = 0.074, P = 0.996. MDA: F_{\text{分组}} = 0.005, P = 0.946; F_{\text{时间}} = 0.405, P = 0.844$ )。各组兔眼视网膜中未发现 TUNEL 阳性细胞。术前和术后 1、7、14、30、60、90 d 兔眼视网膜厚度值分别为(148.20±1.79)、(148.10±1.79)、(147.60±1.52)、(148.00±1.58)、(147.80±1.64)、(147.40±1.67)和(147.80±2.05) μm,总体比较差异无统计学意义( $F = 0.150, P = 0.988$ )。**结论** HIFU 辐照活体兔眼角膜后对视网膜组织形态、结构及各生物活性因子无明显影响,故 HIFU 辐照角膜改变角膜曲率以矫治老视对视网膜是安全的。

**【关键词】** 高强度聚焦超声; 视网膜; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 勿动蛋白-A

**基金项目:** 重庆市卫生局重点课题项目(2010-1-25)

**Influence of high intensity focused ultrasound irradiating cornea on retinas of living rabbits** Li Meixuan, Du

Zhiyu, Wang Menglei, Yan Pisong, Zhang Yu, Li Chongyan

Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010,

China (Li MX, Du ZY, Wang ML); Chongqing Medal Eye Institute, Chongqing 400050, China (Yan PS, Zhang Y);

State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-founded by Chongqing and Ministry of Science and

Technology, Chongqing Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, College of Biomedical Engineering,

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China (Li CY)

Corresponding author: Du Zhiyu, Email: dr. duzhiyu@163. com

**【Abstract】** **Background** High intensity focused ultrasound (HIFU) is a novel noninvasive technique and it has been used to clinical treatment of solid tumors. However, whether it is safe to cure eye related diseases has not been reported. **Objective** This study was to explore the influence of HIFU on retinas of living rabbits after the irradiation on cornea, and provide a theoretical basis for the safety of clinical therapy. **Methods** Forty-one rabbits were involved. The corneal stroma of the right eye was irradiated by HIFU that was fixed in circular shape. The left eye with no treatment served as control group. Six rabbits were sacrificed at day 1, 7, 14, 30, 60 and 90 days after irradiation, respectively. The eyeballs of 3 rabbits were collected for paraffin imbedding. Histological method was then used to evaluate the structure of retina. Immunohistochemistry was used to determine the expression of Nogo-A. TUNEL method was carried out to examine cell apoptosis of different layers of retina. The retina of the rest 3 rabbits were collected to determine the contents of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). The retinal

morphology of 5 rabbits were scanned by OCT and retinal thickness was recorded before irradiation and 1, 7, 14, 30, 60 and 90 days after irradiation. The use and care of experimental animals complied with Regulations on the Administration of Experimental Animals from National Ministry of Science and Technology. **Results** The number of retinal cell layers remained intact in the cornea of living rabbits after HIFU irradiation. The structure of each layer was densely and orderly arranged with clear borders between layers. The histological morphology of retinal tissues were the same among control eyes and experimental eyes at different time points. There was no significant difference in Nogo-A expression among control eyes and experimental eyes at different time points ( $F_{\text{group}} = 0.672, P = 0.413; F_{\text{time}} = 1.622, P = 0.157$ ). No significant difference was obtained in SOD activity and MDA contents among control eyes and experimental eyes at different time points (SOD:  $F_{\text{group}} = 0.167, P = 0.684; F_{\text{time}} = 0.074, P = 0.996$ . MDA:  $F_{\text{group}} = 0.005, P = 0.946; F_{\text{time}} = 0.405, P = 0.844$ ). No TUNEL positive cell was obtained in each group. The thickness of retinal tissues showed no significant difference among before irradiation and 1, 7, 14, 30, 60 and 90 days after irradiation ( $F = 0.150, P = 0.988$ ). **Conclusions** The irradiation of HIFU on the cornea of living rabbits shows no significant influence on the morphology and bioactive factors of retina. Therefore, the therapeutic application of HIFU irradiation on cornea is safe for retina.

[Key words] High intensity focused ultrasound; Retina; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Nogo-A

Fund program: Key Project of Chongqing Health Bureau (2010-1-25)

人晶状体密度随着年龄增长而逐渐增加,弹性和可塑性逐渐减弱,睫状肌收缩能力也逐渐降低,引起眼的调节功能逐渐减退,近点远移,导致人眼近距离视物不清,即老视。老视是一种自然的生理现象,发生在 40~45 岁。2005 年的统计数据表明,全球老视的患病人数约为 10.4 亿<sup>[1]</sup>。到目前为止老视性视力异常影响全球约 20 亿人,预计到 2020 年将上升至 21 亿人<sup>[2-3]</sup>。因此,老视已成为影响中老年人视功能的重要原因。目前配戴框架眼镜仍是矫正老视的常用方法<sup>[4]</sup>,但生活上有其限制和不便。近年来,一些矫治老视的手术逐渐应用于临床,主要包括准分子激光屈光性角膜切削术、准分子激光角膜原位磨镶术、角膜热成形术以及人工晶状体植入术。然而,由于手术本身需考量的有创、可预测性及稳定性等因素尚未完美解决,目前仍缺少解决老视的最佳方案。因此,寻求一种无创、安全、有效的技术来矫治老视十分必要。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)是一种新兴的非侵入性治疗技术,已在国内外广泛开展并取得了显著的临床效果。HIFU 利用超声的热效应、空化效应和机械效应达到治疗疾病的目的,后引入难治性青光眼、视网膜脱离等疾病的治疗<sup>[5-7]</sup>。Du 等<sup>[8]</sup>于 2016 年首次提出将 HIFU 应用于老视的矫治,其机制为辐照角膜基质后使角膜基质纤维收缩,角膜曲率增加,角膜产生前凸效应,达到矫治老视的目的,但 HIFU 辐照后对视网膜组织是否产生不良影响值得关注。本研究观察 HIFU 辐照活体兔眼角膜基质后对视网膜组织的影响,探讨 HIFU 用于老视矫治及其他角膜疾病的安全性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 成年普通级新西兰大白兔 41 只,体质量 1.7~2.5 kg,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供,所有实验兔经眼科常规检查排除眼部疾患。实验过程中对动物的使用和处理符合国家科学技术部颁布的《实验动物管理条例》。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、脂质氧化丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗兔勿动蛋白 A(Nogo-A)一抗(BA1309, 1:200, 武汉博士德生物工程技术有限公司);生物素-链霉卵白素免疫组织化学检测试剂盒(北京中杉金桥公司);TUNEL 凋亡试剂盒(德国罗氏公司);盐酸奥布卡因滴眼液、复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社);红霉素眼膏(重庆科瑞制药有限公司)。CZF 型超声波治疗仪(重庆海扶技术有限公司研制,重庆医科大学生物医学工程系医学超声工程研究所提供);匀速电动机(江苏电机厂);光学显微镜(日本奥林巴斯株式会社);RS-3000 型光学相干断层扫描仪(日本尼德克株式会社);眼科显微器械(上海医药器械股份有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 HIFU 角膜基质辐照模型的制备** 麻醉前实验兔均禁食 12 h,取质量分数 3% 戊巴比妥钠经耳缘静脉注射麻醉,剂量为 1 ml/kg。实验兔侧卧于实验固定台,用手术缝线牵引眼球筋膜,暴露实验眼角膜,盐酸奥布卡因滴眼液点眼行右眼表面麻醉,置开睑器,眼表涂 HIFU 专用耦合剂,将 CZF 型超声治疗头调整至与术眼角膜平行,用游标卡尺调整焦距。超声治疗仪参数为:脉冲 1 000 Hz、焦距 4.5 mm、频率 10.20 MHz、功率 1 W、辐照时间 6 s,电动机以 10 r/min 的转速带动

超声波治疗头匀速旋转 1 周,辐照环直径约为 9 mm (图 1)。术后红霉素眼膏涂眼。各组实验兔左眼均不予处理,作为对照组。

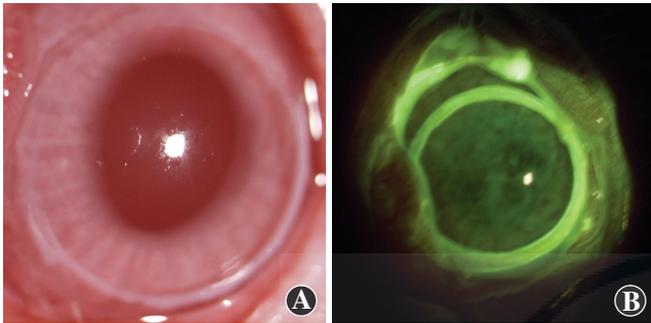


图 1 HIFU 辐照兔眼角膜模型 A:裂隙灯显微镜弥散光下可见角膜辐照环 B:裂隙灯显微镜下可见荧光素钠染色的角膜辐照环

**1.2.2 各组兔眼常规组织病理学检查** 分别于术后 1、7、14、30、60、90 d 用空气栓塞法任意处死各组实验兔 3 只,快速摘除双侧眼球,去除眼前节组织,用复方甲醛固定剂 (compound formaldehyde fixative solution, AGFD 固定液) 充分固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,苏木精-伊红染色,于 400 倍光学显微镜下观察并拍照。

**1.2.3 免疫组织化学法检测视网膜中 Nogo-A 的表达**

取 1.2.2 部分制备的眼球石蜡切片,常规脱蜡至水化,胰蛋白酶消化法抗原修复,体积分数 3%  $H_2O_2$  去离子水孵育以消除内源性过氧化物酶活性,PBS 漂洗 3 次;滴加山羊血清,室温封闭 20 min,甩去多余液体,滴加兔抗兔 Nogo-A 一抗,37 °C 孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次;滴加生物素化二抗工作液,37 °C 孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,37 °C 孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次;DAB 显色剂室温下显色 10 min,蒸馏水冲洗终止显色;脱水,透明,封片,光学显微镜下观察,以视网膜组织中出现棕黄色染色为 Nogo-A 阳性表达。任意选取各组视网膜石蜡切片各 5 张,400 倍光学显微镜下观察并拍照。用 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统采集图像并进行分析处理,任意测定 3 个视野平均吸光度(A)值。

**1.2.4 各组兔眼视网膜组织中 SOD 活性和 MDA 浓度测定** 分别于术后 1、7、14、30、60、90 d 任意处死各组 3 只实验兔,快速摘除眼球,生理盐水冲洗,于细胞外液中剥离视网膜,滤纸吸干水分后置于 -80 °C 冰箱保存。取视网膜样品,称量后置于 1.5 ml EP 管中,加入 4 °C 的生理盐水,冰浴中充分研磨,制备成质量分数 10% 的匀浆。取适量匀浆液,离心半径 15 cm,4 °C 下 600 r/min 离心 15 min,取上清液作为待测样品,采用

总 SOD 活性检测试剂盒检测 SOD 活性,采用 MDA 试剂盒检测视网膜上清液中 MDA 浓度,用酶标仪测定波长分别为 450 nm、532 nm 的 A 值作为 SOD 和 MDA 的测定值,按试剂盒中的公式计算视网膜中 SOD 活性及 MDA 浓度。

**1.2.5 TUNEL 凋亡试剂盒检测各组凋亡细胞** 取 1.2.2 部分制备的石蜡切片,常规脱蜡,用蛋白酶 K 工作液于 37 °C 下处理组织 30 min,PBS 冲洗 3 次;3%  $H_2O_2$  去离子水室温封闭 10 min,滴加 50  $\mu$ l 新鲜配置的 TUNEL 反应混合液(1:9 均匀混合的 TdT 液与荧光素标记的 dUTP 液),加盖玻片,于湿盒中 37 °C 避光孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次;滴加 DAPI 对活性细胞核染色 5 min,PBS 冲洗 3 次;滴加抗荧光淬灭剂封片,在 200 倍荧光显微镜下观察并拍照。

**1.2.6 OCT 法测定各组视网膜厚度** 任意选取 5 只实验兔,分别于术前及术后 1、7、14、30、60 及 90 d 行右眼 OCT 检查。检查前右眼用复方托吡卡胺滴眼液充分扩瞳至 6 mm 以上,由同一位熟练的检查者用同一 OCT 仪进行视网膜厚度测定。实验兔用 3% 戊巴比妥钠经耳缘静脉注射麻醉,将右眼固定于 OCT 检查仪颌架上,使 OCT 探测光源对准视网膜,实验眼重复测定 3 次,选择扫描位置标准、成像清晰的图像,自动测定并标注视网膜色素上皮层及内界膜厚度。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 23.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析,本研究中数据资料经 Q-Q 图检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。各组视网膜不同时间点 SOD 活性、MDA 浓度和 Nogo-A 表达量总体比较采用两因素方差分析,兔眼手术前后不同时间点视网膜厚度比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验组与对照组兔眼组织形态学观察

实验兔对照眼视网膜为 10 层结构,层次分明,视网膜内核层和外核层排列紧密,染色均匀。实验眼各个时间点视网膜各层排列整齐,视网膜神经节细胞层细胞核清晰,细胞质均匀晕染;视网膜各层界限较为清楚,内核层和外核层细胞排列紧密、规则,细胞层数完整,细胞大小正常。各时间点实验组与对照组视网膜结构无明显差别(图 2)。

### 2.2 各组兔眼视网膜中 Nogo-A 表达的变化

光学显微镜下可见视网膜神经节细胞层、内核层、外核层有少量 Nogo-A 阳性表达。术后 1、7、14、30、60、90 d

实验组在视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均有 Nogo-A 表达,与对照组比较 Nogo-A 表达未见明显增强(图 3)。各组术后不同时间点视网膜中 Nogo-A 表达量的总体比较差异均无统计学意义( $F_{\text{分组}} = 0.672, P = 0.413; F_{\text{时间}} = 1.622, P = 0.157; F_{\text{交互作用}} = 0.566, P = 0.726$ )(表 1)。

### 2.3 各组兔眼视网膜组织中 SOD 活性和 MDA 浓度的变化

各组兔眼在术后不同时间点视网膜匀浆中 SOD 活性无明显变化,总体比较差异均无统计学意义( $F_{\text{分组}} = 0.167, P = 0.684; F_{\text{时间}} = 0.074, P = 0.996; F_{\text{交互作用}} =$

表 1 各组兔眼不同时间点视网膜中 Nogo-A 表达量的比较( $\bar{x} \pm s, \times 10^{-3}$ )

组别	样本量	不同时间点 Nogo-A 表达量					
		术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 30 d	术后 60 d	术后 90 d
对照组	5	6.97±1.06	6.56±0.88	6.58±0.79	6.67±0.81	7.12±0.89	7.02±0.86
实验组	5	6.71±0.69	6.31±0.64	6.89±0.88	6.71±0.89	6.89±0.97	6.77±0.85

注: $F_{\text{分组}} = 0.672, P = 0.413; F_{\text{时间}} = 1.622, P = 0.157; F_{\text{交互作用}} = 0.566, P = 0.726$ (两因素方差分析) Nogo-A: 勿动蛋白 A

0.766,  $P = 0.578$ ); 各组兔眼在术后不同时间点视网膜匀浆中 MDA 浓度无明显变化,总体比较差异均无统计学意义( $F_{\text{分组}} = 0.005, P = 0.946; F_{\text{时间}} = 0.405, P = 0.844; F_{\text{交互作用}} = 0.123, P = 0.987$ )(表 2, 3)。

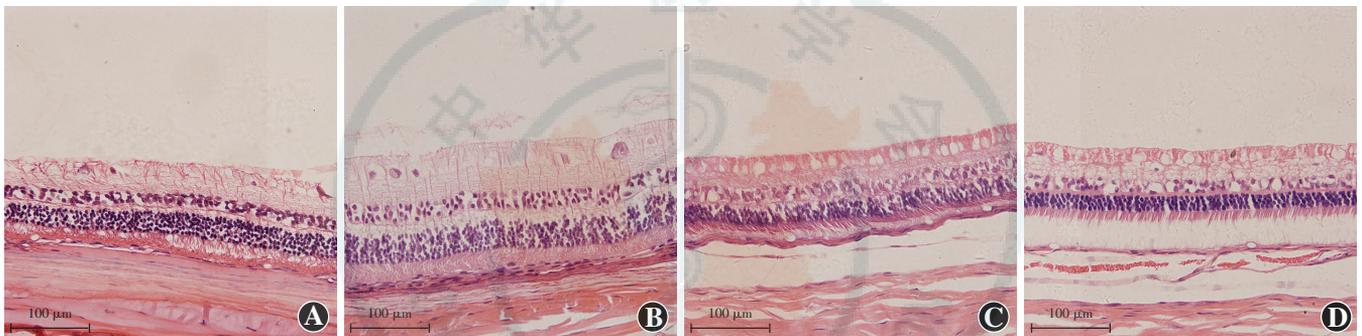


图 2 各组兔眼不同时间点视网膜组织形态变化(HE ×400, 标尺 = 100 μm) 术后 1、7、14、30、60、90 d 对照眼视网膜各层结构排列规则,实验眼与对照眼比较未见明显差异 A: 对照眼 B: 术后 1 d 实验眼 C: 术后 7 d 实验眼 D: 术后 14 d 实验眼 E: 术后 30 d 实验眼 F: 术后 60 d 实验眼 G: 术后 90 d 实验眼

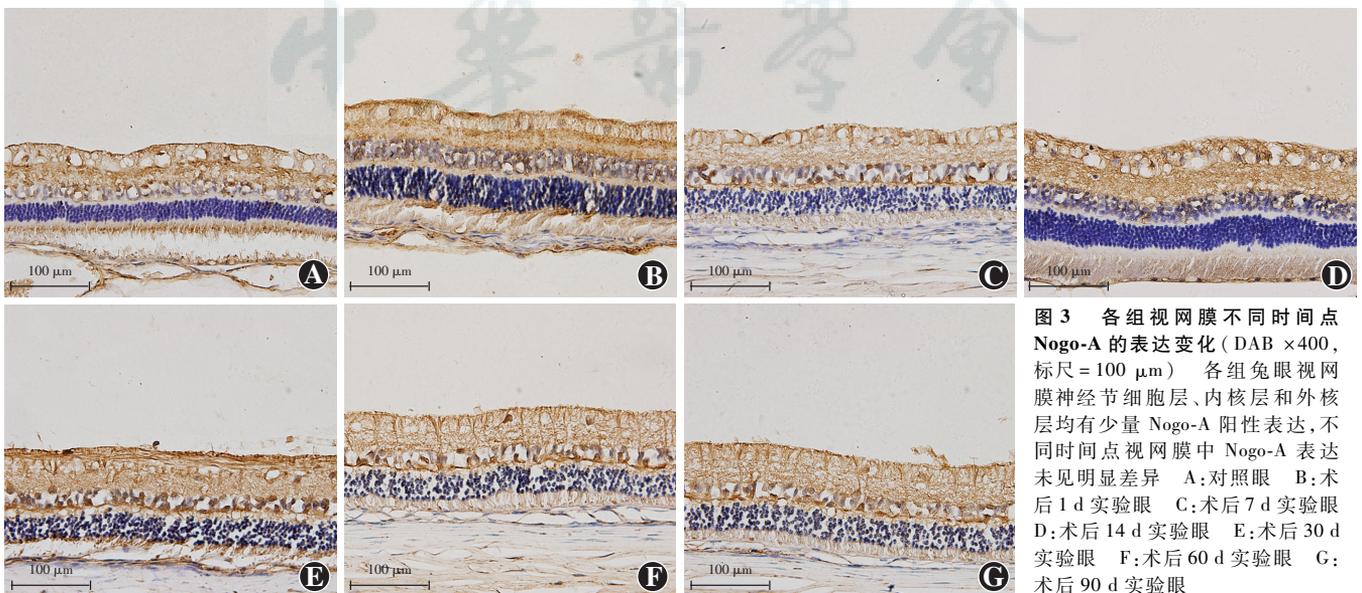


图 3 各组视网膜不同时间点 Nogo-A 的表达变化(DAB ×400, 标尺 = 100 μm) 各组兔眼视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均有少量 Nogo-A 阳性表达,不同时间点视网膜中 Nogo-A 表达未见明显差异 A: 对照眼 B: 术后 1 d 实验眼 C: 术后 7 d 实验眼 D: 术后 14 d 实验眼 E: 术后 30 d 实验眼 F: 术后 60 d 实验眼 G: 术后 90 d 实验眼

**表 2 术后不同时间点各组视网膜中 SOD 活性的比较** [ $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ ]

组别	样本量	不同时间点 SOD 活性					
		术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 30 d	术后 60 d	术后 90 d
对照组	3	40.95±3.01	40.23±2.32	40.26±1.61	39.40±1.85	39.75±1.28	40.19±1.98
实验组	3	39.64±2.39	39.81±2.10	40.33±1.61	40.84±1.51	40.57±1.26	40.67±1.28

注:  $F_{\text{分组}} = 0.167, P = 0.684; F_{\text{时间}} = 0.074, P = 0.996; F_{\text{交互作用}} = 0.766, P = 0.578$  (两因素方差分析) SOD: 超氧化物歧化酶

**表 3 术后不同时间点各组视网膜中 MDA 浓度的比较** ( $\bar{x} \pm s, \text{nmol}/\text{L}$ )

组别	样本量	不同时间点 MDA 浓度					
		术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 30 d	术后 60 d	术后 90 d
对照组	3	20.80±1.75	21.58±1.77	21.26±2.73	21.18±1.59	21.66±2.18	20.67±2.44
实验组	3	20.85±1.42	21.64±1.84	21.48±1.64	20.56±1.66	21.32±2.04	21.12±1.64

注:  $F_{\text{分组}} = 0.005, P = 0.946; F_{\text{时间}} = 0.405, P = 0.844; F_{\text{交互作用}} = 0.123, P = 0.987$  (两因素方差分析) MDA: 丙二醛

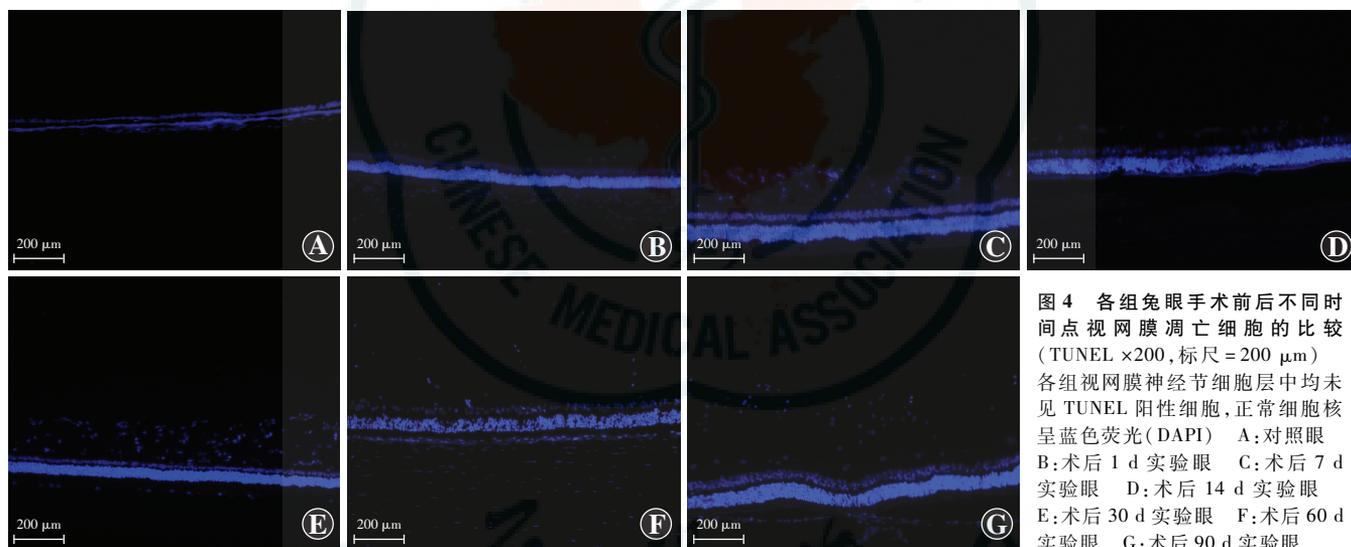
**2.4 各组兔眼在术后不同时间点视网膜凋亡细胞的变化**

手术前后不同时间点实验兔视网膜厚度的总体比较差异无统计学意义 ( $F = 0.150, P = 0.988$ ) (表 4)。

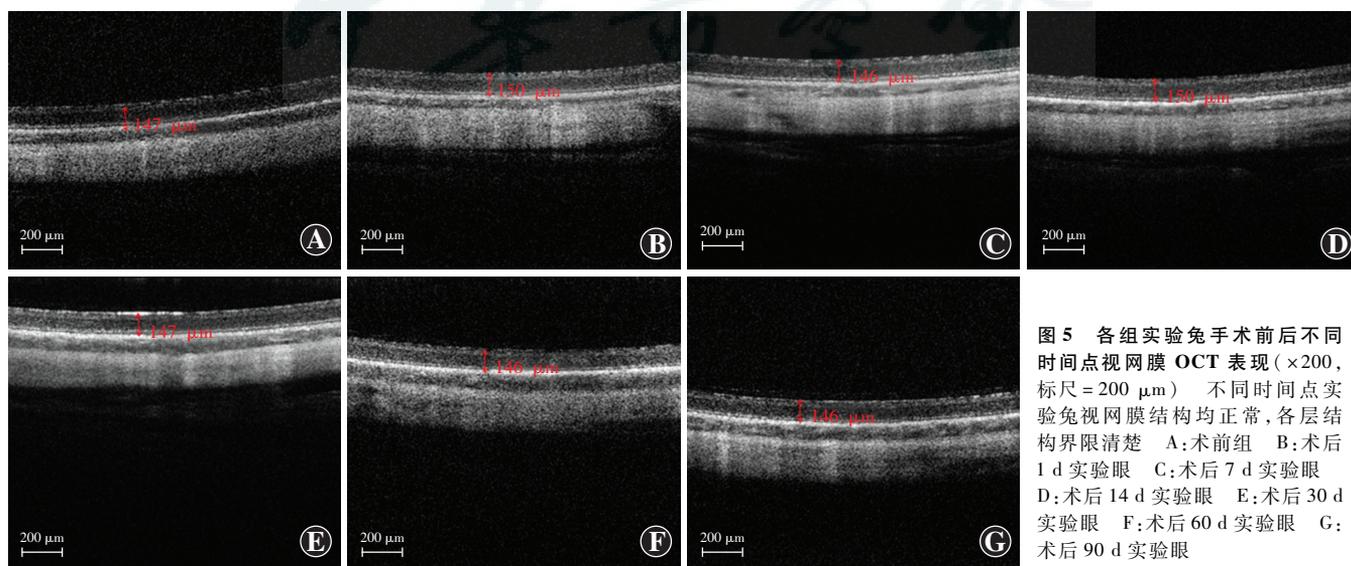
TUNEL 检测结果显示, 对照组及实验组在不同时间点视网膜神经节细胞层细胞排列规则, 未发现细胞核皱缩、核碎裂、染色质凝集、细胞质减少等现象。荧光显微镜下观察显示各组实验兔视网膜组织中均未见 TUNEL 阳性细胞 (图 4)。

**2.5 实验兔手术前后不同时间点视网膜结构变化**

OCT 检查显示, 手术前后不同时间点实验兔视网膜厚度均正常, 视网膜各层结构界限清楚, 内层结构清晰可见, 无视网膜色素上皮层缺失, 视网膜各层无结构紊乱及反射信号条带异常等改变 (图 5)。



**图 4 各组兔眼手术前后不同时间点视网膜凋亡细胞的比较** (TUNEL  $\times 200$ , 标尺 =  $200 \mu\text{m}$ ) 各组视网膜神经节细胞层中均未见 TUNEL 阳性细胞, 正常细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) A: 对照眼 B: 术后 1 d 实验眼 C: 术后 7 d 实验眼 D: 术后 14 d 实验眼 E: 术后 30 d 实验眼 F: 术后 60 d 实验眼 G: 术后 90 d 实验眼



**图 5 各组实验兔手术前后不同时间点视网膜 OCT 表现** ( $\times 200$ , 标尺 =  $200 \mu\text{m}$ ) 不同时间点实验兔视网膜结构均正常, 各层结构界限清楚 A: 术前组 B: 术后 1 d 实验眼 C: 术后 7 d 实验眼 D: 术后 14 d 实验眼 E: 术后 30 d 实验眼 F: 术后 60 d 实验眼 G: 术后 90 d 实验眼

表 4 手术前后不同时间点实验兔视网膜厚度比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

组别	样本量	视网膜厚度
术前组	5	148.20±1.79
术后 1 d 组	5	148.10±1.79
术后 7 d 组	5	147.60±1.52
术后 14 d 组	5	148.00±1.58
术后 30 d 组	5	147.80±1.64
术后 60 d 组	5	147.40±1.67
术后 90 d 组	5	147.80±2.05
F 值		0.150
P 值		0.988

(单因素方差分析)

### 3 讨论

HIFU 是一种新的靶向消融技术,其利用热效应将超声能量聚集在很小空间的焦域内,产生极高的声强,使组织温度瞬间上升到 65℃ 以上,引起区域内组织产生不可逆转的凝固性坏死,造成组织的封闭,从而达到治疗疾病的目的<sup>[9-10]</sup>。

视网膜血管丰富,代谢活跃,视网膜组织中含有一些可以产生自由基的酶,SOD 可清除氧自由基,防止视网膜细胞凋亡,是保护视网膜组织免受活性氧自由基损伤的防御屏障。MDA 是脂质过氧化反应的最终产物之一,同时也是脂质过氧化反应的标志物,视网膜在损伤状态下可产生大量活性氧自由基,视网膜光感受器细胞中所含的不饱和脂肪酸与自由基结合后发生脂质过氧化反应,使视网膜组织细胞内的亚细胞器膜中脂类受到不可逆损伤<sup>[11]</sup>。因此,MDA 的浓度升高和 SOD 的活性降低是视网膜损伤的标志。本研究发 现 HIFU 术后各时间点对照组与实验组兔眼视网膜中 SOD 活性和 MDA 浓度无明显变化,且未发现实验组视网膜中存在凋亡细胞,故推测 HIFU 辐照角膜后对视 网膜细胞未产生损伤。

Nogo 受体可抑制神经再生,促进神经元凋亡,Nogo-A 是 Nogo 受体的配体,可促进视网膜中活性氧自由基的堆积,从而诱导细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>。研究表明,Nogo-A 在视网膜神经节细胞层高表达,在损伤状态下,视网膜组织中活性氧自由基增多,Nogo-A 的表达进一步增加<sup>[14]</sup>。本研究中实验组与对照组兔眼视网膜中 Nogo-A 表达基本一致,进一步证实 HIFU 未造成视网膜细胞损伤。

目前,HIFU 已成功用于青光眼的治疗,此外也有研究者采用 HIFU 技术改变角膜曲率以矫治角膜散光<sup>[8]</sup>,前期研究表明 HIFU 矫治老视具有较好的应用前景<sup>[15]</sup>。为了研究 HIFU 矫治老视对视网膜组织的安全性,本研究探讨了 HIFU 辐照角膜后视网膜结构和形态的变化,发现该疗法是安全的,不会造成视网膜结构的损伤。HIFU 是无创疗法,能避免手术造成的角膜结构损伤,在一定程度上减轻患者对有创手术的心理负担,但仍需进一步完善和开展相关的临床研究和流行病学研究,收集跟踪调查的数据以验证 HIFU 的临床安全性。

志谢 衷心感谢重庆医科大学生物医学工程学院省部共建超声医学工程国家重点实验室培育基地 超声医学工程重庆市重点实验室为本研究提供 CZF 型超声治疗仪,使得实验顺利完成

### 参考文献

- [1] Holden BA, Fricke TR, Ho SM, et al. Global vision impairment due to uncorrected presbyopia [J]. Arch Ophthalmol, 2008, 126 (12) : 1731-1739. DOI:10.1001/archophth.126.12.1731.
- [2] Lindstrom RL, Macrae SM, Pepose JS, et al. Corneal inlays for presbyopia correction [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2013, 24 (4) : 281-287. DOI:10.1097/ICU.0b013e328362293e.
- [3] Seyeddain O, Bachernegg A, Riha W, et al. Femtosecond laser-assisted small-aperture corneal inlay implantation for corneal compensation of presbyopia: two-year follow-up [J]. J Cataract Refract Surg, 2013, 39 (2) : 234-241. DOI:10.1016/j.jcrs.2012.09.018.
- [4] 唐静. 老视矫治的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29 (10) : 955-959. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.10.021.
- [5] Tang J. Research progression in correction of presbyopia eye [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29 (10) : 955-959. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.10.021.
- [6] Kim YS, Rhim H, Choi MJ, et al. High-intensity focused ultrasound therapy: an overview for radiologists [J]. Korean J Radiol, 2008, 9 (4) : 291-302. DOI:10.3348/kjr.2008.9.4.291.
- [7] Melamed S, Goldenfeld M, Cotlear D, et al. High-intensity focused ultrasound treatment in refractory glaucoma patients: results at 1 year of prospective clinical study [J]. Eur J Ophthalmol, 2015, 25 (6) : 483-489. DOI:10.5301/ejo.5000620.
- [8] She WH, Cheung TT, Jenkins CR, et al. Clinical applications of high-intensity focused ultrasound [J]. Hong Kong Med J, 2016, 22 (4) : 382-392. DOI:10.12809/hkmj154755.
- [9] Du Z, Yan P, Luo Q, et al. Keratorefractive effect of high intensity focused ultrasound keratoplasty on rabbit eyes [J/OL]. J Ophthalmol, 2016, 2016 : 5260531 [2017-01-22]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4921632/. DOI:10.1155/2016/5260531.
- [10] Pozzi S, Borrazzo C, Carni M, et al. A computational tool for evaluating HIFU safety [J]. Ann Ist Super Sanita, 2016, 52 (2) : 256-260. DOI:10.4415/ANN\_16\_02\_18.
- [11] 苏海兵, 邹建中, 王智彪. 高强度聚焦超声肿瘤治疗技术原理 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17 (3) : 271-272. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2011.03.030.
- [12] Su HB, Zou JZ, Wang ZB. Mechanism of high intensity focused ultrasound thermal ablation therapy [J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2011, 17 (3) : 271-272. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2011.03.030.
- [13] 安美霞, 张效房, 张金嵩. 挫伤性视网膜病变中光感受器细胞凋亡与氧化损伤的实验研究 [J]. 中华眼科杂志, 2004, 40 (2) : 118-121.
- [14] An MX, Zhang XF, Zhang JS. Oxidative damage and photoreceptor cell apoptosis in contusion injury of the rabbit retina [J]. Chin J Ophthalmol, 2004, 40 (2) : 118-121.
- [15] Peng Y, Zhang QL, Xu D, et al. Small hairpin RNA interference of the Nogo receptor inhibits oxygen-glucose deprivation-induced damage in rat hippocampal slice cultures [J]. Neuropathology, 2010, 30 (6) : 565-573. DOI:10.1111/j.1440-1789.2010.01102.x.
- [16] 张扬, 赵家良, 卞爱玲, 等. 慢性高血压大鼠 Nogo-A 及其受体 mRNA 和蛋白表达水平变化的研究 [J]. 中华眼科杂志, 2012, 48 (6) : 507-512. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.06.007.
- [17] Zhang Y, Zhao JL, Bian AL, et al. Expression of Nogo-A, NgR mRNA and protein in the retina of rats with chronic elevated intraocular pressure [J]. Chin J Ophthalmol, 2012, 48 (6) : 507-512. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.06.007.
- [18] 燕振国, 秦萍瑛, 李耀宇. 高原缺氧对兔视网膜 Nogo 表达的影响 [J]. 国际眼科杂志, 2008, 8 (2) : 258-260.
- [19] Yan ZG, Qin PY, Li YY. Expression and distribution of Nogo in retina of adult rabbit on the plateau [J]. Int J Ophthalmol, 2008, 8 (2) : 258-260.
- [20] 张丹, 杜之渝, 晏丕松, 等. 高强度聚焦超声应用于兔眼角膜矫正老视的初步研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2012, 28 (9) : 778-782. DOI:10.3969/j.issn.1002-0101.2012.09.003.
- [21] Zhang D, Du ZY, Yan PS, et al. Preliminary study of high intensity focused ultrasound in correcting presbyopia on rabbits cornea [J]. Chin J Ultrasound Med, 2012, 28 (9) : 778-782. DOI:10.3969/j.issn.1002-0101.2012.09.003.

(收稿日期:2017-03-11)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)