

· 实验研究 ·

纤溶酶 K 区缺失突变体玻璃体腔注射对光化学诱导大鼠视网膜分支静脉阻塞的溶栓作用

陈武 莫炜 黄欣 欧阳艳玲 宋后燕 张志云

442001 湖北省十堰市,湖北医药学院附属东风医院检验科(陈武),外科(张志云);200032 上海,复旦大学教育部代谢与分子医学重点实验室(莫炜、宋后燕);200031 上海,复旦大学附属眼耳鼻喉医院(黄欣、欧阳艳玲)

通信作者:张志云,Email:cwy_100@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.05.006

【摘要】 背景 视网膜静脉阻塞是常见的视网膜血管性疾病,目前溶栓和抗凝疗法是重要的治疗手段。然而,系统溶栓疗法效率较低,且易增加出血风险。**目的** 观察玻璃体腔注射纤溶酶 K 区缺失突变体(PLM- Δ K)对光化学诱导的大鼠视网膜分支静脉阻塞(BRVO)的治疗作用。**方法** 用 SD 大鼠尾静脉注射孟加拉玫瑰红溶液 40 mg/kg,然后用氩激光照射视网膜静脉法建立 SD 大鼠 BRVO 模型,采用随机数字表法将造模成功的 40 只大鼠随机分为平衡盐溶液(BSS)组、0.01 U(商品单位)PLM- Δ K 组、0.02 U PLM- Δ K 组和 0.03 U PLM- Δ K 组,每组 10 只。造模并避光饲养大鼠 12 h 后于大鼠玻璃体腔内分别注射 BSS 和 0.01、0.02 或 0.03 U PLM- Δ K 10 μ l,各组大鼠于注射后 3 d 行间接检眼镜、荧光素眼底血管造影(FFA)检查。用过量麻醉法处死 SD 大鼠并制备视网膜铺片和眼球壁切片,采用苏木精-伊红染色法观察大鼠球壁的形态学变化;采用免疫荧光法检测大鼠球壁组织中纤连蛋白(FN)和层黏连蛋白(LN)的表达;透射电子显微镜下观察大鼠视网膜的超微结构改变。**结果** 玻璃体腔内药物注射后 3 d,FFA 显示 BSS 组及 0.01、0.02 或 0.03 U PLM- Δ K 组视网膜分支静脉再通达 2 支以上的大鼠数量分别为 0、3、6 和 8 只,组间总体比较差异有统计学意义($\chi^2=9.635$, $P=0.022$),其中 0.01 U PLM- Δ K 组再通血管的大鼠数量与 BSS 组比较,差异无统计学意义($Z=-1.558$, $P=0.119$),而 0.03 U PLM- Δ K 组再通血管的大鼠数量明显多于 0.01 U PLM- Δ K 组,差异有统计学意义($Z=-2.762$, $P=0.006$)。玻璃体腔药物注射后 3 d,BSS 组大鼠视网膜静脉内可见血栓形成,视网膜铺片可见新生血管;而 0.03 U PLM- Δ K 组可见大鼠玻璃体后脱离,视网膜铺片未见新生血管形成。BSS 组可见 FN 主要表达于内界膜(ILM)层、感光细胞层(PCL)、外界膜(OLM)层、脉络膜和巩膜,LN 主要表达于大鼠 ILM 层、OLM 层和巩膜,且均呈强表达。0.03 U PLM- Δ K 组大鼠球壁各层组织中 FN 荧光强度较 BSS 组明显减弱,脉络膜层 FN 表达接近消失,LN 在 ILM 层表达增强,而 OLM 层和巩膜表达减弱。**结论** 玻璃体腔注射 PLM- Δ K 促进阻塞的视网膜分支静脉再通,是潜在的 BRVO 治疗药物。PLM- Δ K 玻璃体腔注射后可以扩散至脉络膜并降解 FN 和 LN。

【关键词】 视网膜静脉阻塞/治疗;纤维蛋白溶解剂/用法及用量;玻璃体注射;溶栓疗法/方法;动物模型;SD 大鼠

基金项目: 湖北省教育厅资助项目(B2013105)

Thrombolysis of plasmin- Δ K on photochemically induced branch retinal vein occlusion after intravitreal injection in rats Chen Wu, Mo Wei, Huang Xin, Ou-yang Yanling, Song Houyan, Zhang Zhiyun

Department of Clinical Laboratory(Chen W), Department of Surgery(Zhang ZY), Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442001, China; Key Laboratory of Metabolism and Molecular Medicine of Education Ministry, Fudan University, Shanghai 200032, China (Mo W, Song HY); Eye and ENT Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China (Huang X, Ou-yang YL)

Corresponding author: Zhang Zhiyun, Email: cwy-100@163.com

[Abstract] **Background** Retinal vein occlusion is a common retinal vascular diseases. Thrombolysis and anticoagulation therapies are main approaches. However, systemic thrombolysis is relatively inefficient, and it often enhances the risk of hemorrhage. **Objective** This study was to investigate the therapeutic effects of PLM- Δ K, a kringle deficiency mutant of plasmin, on photochemically induced branch retinal vein occlusion (BRVO) after intravitreal injection. **Methods** BRVO models were established by the combination of caudal vein injection of Rose

Bengal with argon laser radiation of periphery area of retinal veins in SD rats. Forty model rats were randomized into balance salt solution (BSS) group and 0.01 U, 0.02 U, 0.03 U PLM-ΔK group, and 10 μl corresponding drug was intravitreally injected 12 hours after modeling. Ophthalmoscopy and fundus fluorescein angiography (FFA) were performed to observe the change of retinal veins. The animals were sacrificed 3 days after intravitreal injection, and hematoxylin and eosin staining was used for the histopathological and ultrastructural examination of retinas. The retina of the rats was isolated for the stretched preparation of retina. The expressions of fibronectin (FN) and laminin (LN) in eyeball wall were assayed by immunofluorescence technology. The use and care of the animals complied with Statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. **Results** The revascularization of over 2 retinal veins was found in 0, 3, 6 and 8 rats in the BSS group and 0.01 U, 0.02 U, 0.03 U PLM-ΔK group 3 days after intravitreal injection, respectively, showing a significant difference among the groups ($\chi^2 = 9.635, P = 0.022$), and the rat number with revascularization in 0.01 U PLM-ΔK group was not significantly different from that in BSS group ($Z = -1.558, P = 0.119$), but the difference between 0.03 U PLM-ΔK group and 0.01 U PLM-ΔK group was significant ($Z = -2.762, P = 0.006$). In the third day after intravitreal injection, retinal vein thrombus were found in the BSS group under the light microscope, and angiogenesis was seen on the retinal flatmount nuclear. In the 0.03 U PLM-ΔK group, posterior vitreal detachment was exhibited under the light microscope, and no retinal new vessel and cell damage were seen. FN was strongly expressed in the inner limiting membrane (ILM) layer, photocyte layer, outer limiting membrane (OLM) layer, choroid and scleral layer, and LN was expressed mainly in the ILM, OLM and scleral layer in the BSS group. However, the expression intensities of FN and LN were obviously weakened in the 0.03 U PLM-ΔK group. **Conclusions** Intravitreal injection of PLM-ΔK can enhance the reperfusion of occluded branch retinal vein and serve as a potential therapeutic drug for BRVO. Also it can permeate into choroid after intravitreal injection to degradate FN and LN.

[Key words] Retinal vein occlusion/therapy; Fibrinolytic agents/administration & dosage; Intravitreal injection; Thrombolytic therapy/methods; Disease models, animal; SD rats

Fund program: Hubei Education Ministry Funding Project (B2013105)

视网膜静脉阻塞 (retinal vein occlusion, RVO) 是临床上常见的视网膜血管疾病, 其中 85% 为视网膜分支静脉阻塞 (branch retinal vein occlusion, BRVO)^[1]。RVO 预后较差, 且可引起多种并发症, 近年来采用玻璃体切割术、动静脉髓鞘切开术、激光光凝等手术治疗取得了一定的效果, 玻璃体腔内注射抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体和糖皮质激素疗法也已用于临床。然而, 这些治疗措施主要针对 RVO 的并发症, 因此无法解决 RVO 的发病因素^[2]。血栓形成是导致 RVO 发生的重要原因, 因此早期恢复视网膜静脉的血液流通对于预后和减少缺血、缺氧引起的视网膜血管新生、水肿和坏死至关重要。近年来研究表明, 周围静脉或玻璃体腔注射组织酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, tPA)、自体纤溶酶等溶栓药物可增强溶解血栓的作用, 减轻视网膜黄斑水肿, 改善患者视力^[3-4]。纤溶酶 K 区缺失突变体 (plasmin-ΔK, PLM-ΔK) 是人纤溶酶的丝氨酸蛋白酶区, 在体外与纤溶酶的纤溶活性接近, 其相对分子质量约为纤溶酶的 1/4, 并且重组人 PLM-ΔK 可通过毕赤酵母菌表达获得批量生产^[5]。我们先前的研究表明, 玻璃体腔注射重组人 PLM-ΔK 可诱导兔眼玻璃体后脱离 (post vitreous detachment, PVD)^[6], 提示其玻璃体腔注射后能够保持纤溶活性, 但其对 BRVO 的治疗作用

尚未得到证实。本研究中观察玻璃体腔注射 PLM-ΔK 对大鼠 BRVO 的溶栓作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~10 周龄雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 250~300 g, 购自湖北医药学院实验动物中心。实验动物于 SPF 级动物房饲养, 室温保持正常, 不限制饮食, 环境中光照循环正常。实验动物的使用和喂养符合 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂及仪器 PLM (美国 Sigma 公司); 小鼠抗大鼠纤连蛋白 (fibronectin, FN) 单克隆抗体 (ab6328, 1.0 μg/ml)、小鼠抗大鼠层黏连蛋白 (laminin, LN) 单克隆抗体 (ab49726, 0.5 μg/ml) (英国 Abcam 公司); FITC 和 CY3 分别标记的羊抗小鼠二抗 (BA1101, BA1031, 0.5 μg/ml) (武汉博士德生物公司); JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (日本电子光学公司); YZ-5C 型裂隙灯显微镜 (苏州六六医疗器械厂); BX61 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PLM-ΔK 的制备及活性检测 重组人纤溶酶原 K 区缺失突变体 (PLG-ΔK) 由复旦大学教育部代谢与分子医学重点实验室构建的毕赤酵母菌株表达, 纯

化、冻干后,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。临用时以适量 1 mg/ml 平衡盐溶液 (balance salt solution, BSS) 溶解 PLG- ΔK , 与尿激酶混合 (200:1), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴激活后于 0、2、4、6 和 8 h 各取 $40\text{ }\mu\text{l}$ 反应液, 参照文献 [7] 的方法, 取其中 $20\text{ }\mu\text{l}$ 采用还原性 SDS-PAGE 检测 PLG- ΔK 激活的比例, 另取 $10\text{ }\mu\text{l}$ 通过纤维蛋白板法测定 PLM- ΔK 活性; 以牛 PLM 作为标准品调节 PLM- ΔK , 使其含量分别为 1.00、2.00、3.00 U/ml (商品单位)。

1.2.2 大鼠 BRVO 模型的建立 每只大鼠的左眼为实验眼。参照文献 [8] 的方法, 采用孟加拉玫瑰红联合氩激光法制备 BRVO 模型。大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠进行麻醉, 剂量为 240 mg/kg , 用质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉。采用复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳, 大鼠尾静脉注射孟加拉玫瑰红溶液, 剂量为 40 mg/kg , 注射后 10 min 从视网膜静脉远端开始行氩激光照射, 照射点距视盘 1~3 个视盘直径 (papillary diameter, PD), 激光波长为 53 nm , 能量为 100 mW , 光斑直径为 $50\text{ }\mu\text{m}$, 照射 0.5 s 。每处血管平均照射 25~30 个点, 光斑连续排列, 直至血流中断, 形成约 1 PD 的静脉血栓, 完全阻塞 3 个视网膜分支静脉, 并分布在 3 个象限内者为造模成功。

1.2.3 眼底检查 造模后立即行裂隙灯显微镜和间接检眼镜检查, 排除手术引起的眼部损伤。按 50 mg/kg 的剂量于大鼠腹腔内注射质量分数 10% 荧光素钠, 设置激发光为 675 nm 和 490 nm , 行荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA), 以确认 BRVO 情况。

1.2.4 眼平坦部玻璃体腔注射 采用随机数字表法将造模成功的 40 只大鼠分为 BSS 组、0.01 U PLM- ΔK 组、0.02 U PLM- ΔK 组和 0.03 U PLM- ΔK 组, 每组 10 只, 避光饲养 12 h 后于大鼠角巩膜缘处穿刺放液 $10\text{ }\mu\text{l}$, 然后于颞下方距角巩膜缘后 1 mm 处以 30 G 针头朝向视盘方向进行穿刺, 经瞳孔区看见针头后按照分组缓慢注入 $10\text{ }\mu\text{l}$ 相应的药物, 针尖开口朝向后极部。注药完毕后 10 s 拔出针头, 湿棉签按压穿刺处 1 min。于注药后 3 d 间接检眼镜检查视网膜出血和水肿情况, FFA 检测眼底血管再通的分支静脉数。

1.2.5 大鼠视网膜的病理组织学检查 注药后 3 d, 用预冷质量分数 4% 多聚甲醛进行大鼠心脏灌注 5 min, 迅速摘除眼球, 0.02 mol/L PBS 漂洗, 在上方角巩缘 12:00 处

缝线标记, 在巩膜 4 个方向做切口后迅速浸入 4% 多聚甲醛中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定 20 h, 然后沿睫状体扁平部剪除角膜和晶状体, 去除玻璃体, 选择视网膜静脉血栓处制备 $4\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 的切块, 行常规苏木精-伊红染色, 光学显微镜和透射电子显微镜下检查, 并制作视网膜铺片。

1.2.6 免疫荧光法检测大鼠视网膜中 FN 及 LN 的表达 将 4% 多聚甲醛固定的眼球经 0.02 mol/L PBS 漂洗后, 用质量分数 15%、20%、30% 梯度蔗糖脱水过夜, Epon812 包埋, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下制备 $6\text{ }\mu\text{m}$ 厚切片, 分别滴加鼠抗人 FN 和 LN 单抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 分别滴加 FITC 和 CY3 标记的羊抗鼠二抗, 同时以 PBS 代替 FN、LN 抗体作为阴性对照。荧光显微镜下观察并拍照, Image-Pro Plus 6.0 软件 (美国 Media Cybernetics 公司) 进行分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计学软件 (美国 SPSS Inc., Chicago, IL, USA 公司) 进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料以频数表达, 采用完全随机分组多水平实验设计, BSS 组及 0.01 U、0.02 U、0.03 U PLM- ΔK 组间视网膜静脉再通大鼠数量的差异比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 PLG- ΔK 的激活情况

还原性 SDS-PAGE 显示, 采用尿激酶将 PLG- ΔK 激活为 PLM- ΔK 后 2、4、6 和 8 h 的激活比率分别为 $(48.2\pm 3.3)\%$ 、 $(56.1\pm 4.1)\%$ 、 $(63.4\pm 4.7)\%$ 和 $(69.5\pm 4.1)\%$, 纤维蛋白板法测定其活性分别为 (2.7 ± 0.2) 、 (3.3 ± 0.3) 、 (3.8 ± 0.2) 和 $(4.3\pm 0.3)\text{ U/ml}$, 随着激活时间的延长其活性呈上升趋势 (图 1)。

2.2 各组大鼠的眼底表现

检眼镜检查和 FFA 显示, 正常 SD 大鼠视网膜约有 15 条分支动静脉, 激光照射后可见 3 支静脉血流中

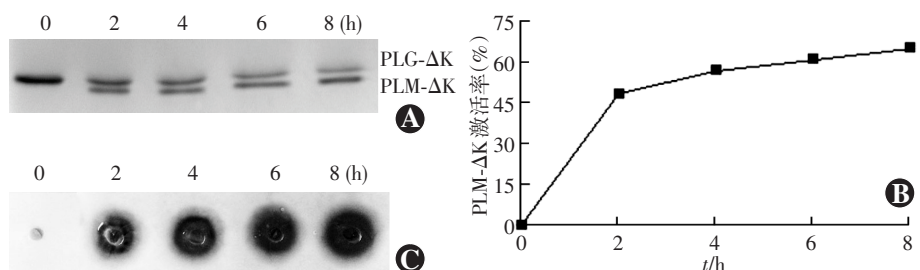


图 1 尿激酶作用后 PLM- ΔK 的激活率 A: 还原性 SDS-PAGE 测定 PLG- ΔK 激活为 PLM- ΔK 的电泳图 B: 根据 SDS-PAGE 得到的 PLG- ΔK 激活为 PLM- ΔK 的动力曲线 C: 纤维蛋白板法测定激活产物 PLM- ΔK 的活性 PLG- ΔK : 纤溶酶原 K 区缺失突变体; PLM- ΔK : 纤溶酶 K 区缺失突变体

断,分布于 3:00、6:00、9:00 位的 3 个区间,造模后 12 h 可见上述 3 支静脉的邻近血管走行迂曲,FFA 显示其中无荧光素通过。玻璃体腔注药后 3 d, BSS 组出现视网膜出血和水肿, FFA 显示广泛的视网膜血管荧光素渗漏,部分大鼠静脉出现自主性再通(图 2)。各 PLM-ΔK 处理组中视网膜分支静脉完全再通的大鼠眼视网膜水肿、出血及荧光素渗漏较 BSS 组减轻,不同

PLM-ΔK 剂量组间视网膜血管再通的大鼠数量随着 PLM-ΔK 剂量的增加而增多,差异有统计学意义($\chi^2=9.635, P=0.022$),其中 0.01 U PLM-ΔK 组再通血管的大鼠数量与 BSS 组比较差异无统计学意义($Z=-1.558, P=0.119$),0.03 U PLM-ΔK 组再通血管的大鼠数量明显多于 0.01 U PLM-ΔK 组,差异有统计学意义($Z=-2.762, P=0.006$)(表 1)。

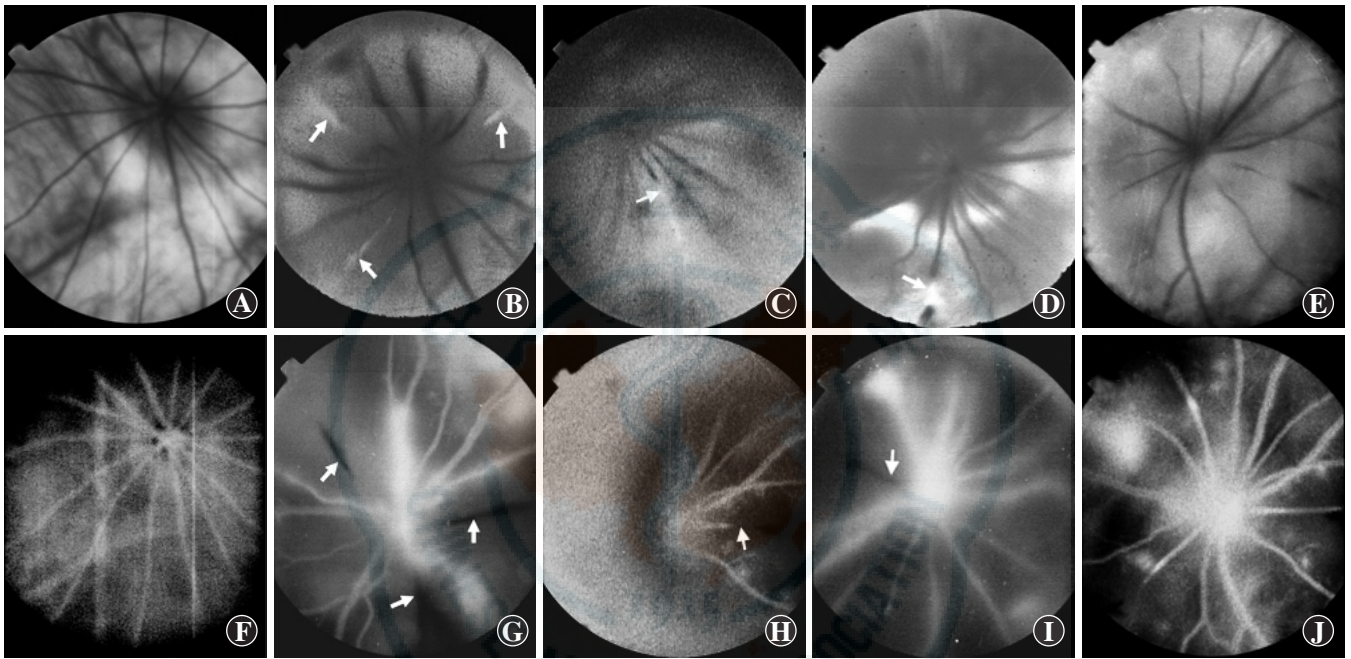


图 2 各组大鼠 FFA 检查 A:正常大鼠可见视网膜血管走行正常 B:造模后 12 h 可见大鼠 BRVO(箭头) C:BSS 组玻璃体腔注射 3 d 大鼠可见视网膜分支静脉完全阻断(箭头) D:0.02 U PLM-ΔK 组大鼠玻璃体腔注射后 3 d 可见视网膜静脉阻断远端血流(箭头) E:0.03 U PLM-ΔK 组玻璃体腔注射后 3 d 视网膜静脉再通 F:正常大鼠 FFA 表现正常 G:造模后 12 h FFA 可见大鼠 BRVO(箭头) H:BSS 组玻璃体腔注射后 3 d FFA 可见 BRVO(箭头) I:0.02 U PLM-ΔK 组玻璃体腔注射后 3 d FFA 仍可见 BRVO(箭头) J:0.03 U PLM-ΔK 组玻璃体腔注射后 3 d FFA 可见视网膜分支静脉再通

表 1 各组视网膜分支静脉再通大鼠数量的比较(n)

组别	样本量	视网膜分支静脉再通的 SD 大鼠数量			
		再通 0 支	再通 1 支	再通 2 支	再通 3 支
BSS 组	10	7	3	0	0
0.01 U PLM-ΔK 组	10	3	4	3	0
0.02 U PLM-ΔK 组	10	1	3	4	2
0.03 U PLM-ΔK 组	10	0	2	4	4

注: $\chi^2=9.635, P=0.022$ (Kruskal-Wallis H 检验) BSS:平衡盐溶液; PLM-ΔK:纤溶酶 K 区缺失突变体

2.3 各组大鼠视网膜组织形态学表现

玻璃体腔注药后 3 d, BSS 组大鼠阻塞的视网膜静脉内呈现大量血栓,血管周围有水肿和炎性细胞浸润,导致视网膜神经纤维层、神经节细胞层严重破坏,并与视网膜内网状层脱离,视网膜外层组织结构连续。视网膜铺片显示毛细血管增生,透射电子显微镜显示视网膜神经节细胞层细胞水肿、细胞器减少。各 PLM-ΔK

组大鼠再通的视网膜血管仅有少量血栓残留,邻近视网膜无明显水肿,可见玻璃体后界膜脱离。视网膜铺片未发现毛细血管增生,透射电子显微镜显示视网膜神经节细胞层损伤较轻(图 3)。

2.4 各组大鼠视网膜组织中 FN 和 LN 的表达

阴性对照片仅可见少量散在的 FN 和 LN 阳性表达,分别呈绿色和红色荧光。BSS 组大鼠视网膜中 FN 和 LN 荧光较强, FN 主要分布于内界膜(inner limiting membrane, ILM)层、感光细胞层(photocyte layer, PCL)、外界膜(outer limiting membrane, OLM)层、脉络膜和巩膜;而 LN 主要分布于 ILM 层、OLM 层和巩膜, FN 和 LN 共定位于 ILM 层、OLM 层和巩膜。玻璃体腔注射 0.03 U PLM-ΔK 后 3 d 可见 ILM 层、OLM 层、PCL 的 FN 荧光明显弱于 BSS 组,脉络膜的 FN 荧光接近消失;同样 ILM 层、OLM 层 LN 荧光较 BSS 组明显减弱,表明玻璃体腔注射的 PLM-ΔK 可穿透视网膜扩散至脉络膜(图 4)。

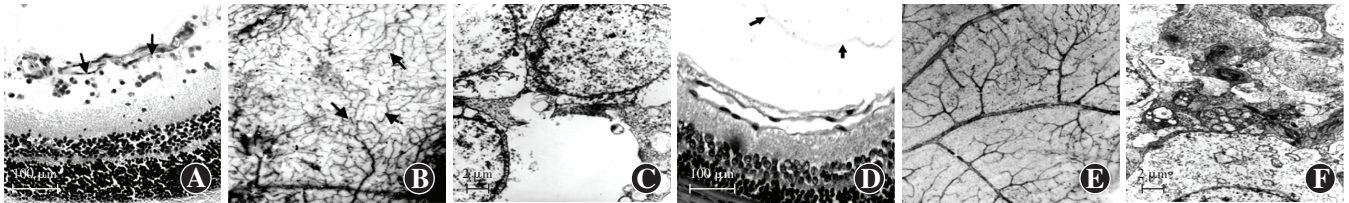


图 3 大鼠视网膜的形态学和结构检查 A: BSS 组大鼠视网膜静脉内可见血栓(箭头)(HE ×400, 标尺 = 100 μm) B: BSS 组大鼠视网膜铺片可见新生血管(箭头) C: BSS 组大鼠超微结构显示神经节细胞层细胞水肿(×15 000, 标尺 = 2 μm) D: 0.03 U PLM-ΔK 组处理后 3 d 大鼠视网膜后脱离(箭头)(HE, 标尺 = 100 μm) E: 0.03 U PLM-ΔK 组处理后 3 d 大鼠视网膜铺片未见新生血管形成 F: 0.03 U PLM-ΔK 组处理后 3 d 大鼠超微结构显示神经节细胞层未见明显细胞水肿(×15 000, 标尺 = 2 μm)

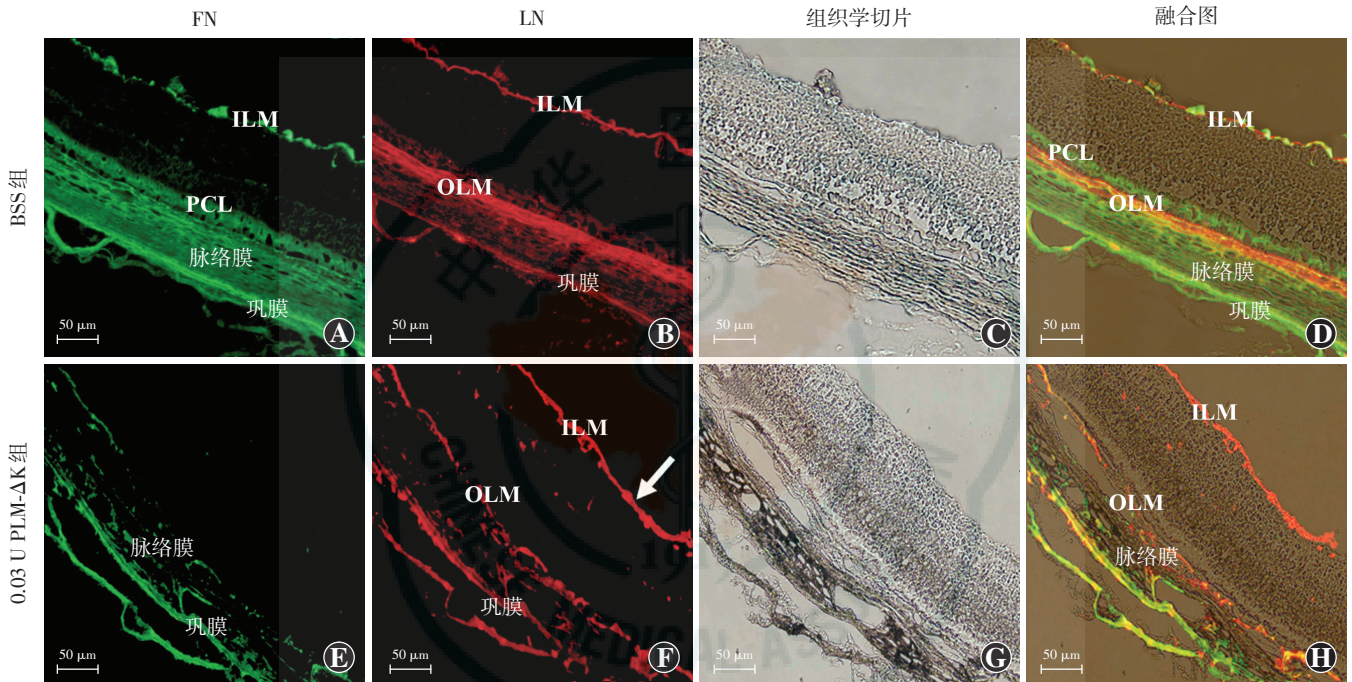


图 4 各组大鼠球壁组织中 FN 和 LN 表达的免疫荧光检测(×200, 标尺 = 50 μm) A: 阴性对照组织切片中 FN 表达呈绿色荧光(FITC), 主要表达于大鼠 ILM、PCL、脉络膜、巩膜层 B: 阴性对照组织切片中 LN 表达为红色荧光(CY3), 主要表达于大鼠 ILM、OLM 和巩膜层 C: 阴性对照组织切片 D: 阴性对照组织切片中可见 FN 和 LN 共同表达于大鼠 ILM、OLM 和巩膜层 E: 0.03 U PLM-ΔK 组处理 3 d 后可见球壁各层组织中 FN 荧光强度较 BSS 组明显减弱(FITC) F: 0.03 U PLM-ΔK 组处理 3 d 后可见 ILM 层 LN 表达增强(箭头), 而 OLM 层和巩膜层表达减弱(Cy3) G: 0.03 U PLM-ΔK 组处理后 3 d 组织切片图 H: 0.03 U PLM-ΔK 组处理后 3 d 可见 ILM 和 OLM 层中的 FN、LN 表达明显减弱 ILM: 内界膜; OLM: 外界膜; PCL: 感光细胞层; PLM-ΔK: 纤溶酶 K 区缺失突变体; BSS: 平衡盐溶液

3 讨论

目前, RVO 的溶栓治疗主要有体静脉、玻璃体、球后、眼动脉、视网膜静脉微穿刺等多种途径。眼部玻璃体与视网膜接触面积较大, 且玻璃体腔注射方法操作简单, 并发症较少, 故为优先考虑的施药途径。近年来的研究证实, 玻璃体腔注射 tPA 后药物可扩散至阻塞或未阻塞的猪视网膜分支静脉, 并有效溶解光化学法诱导的静脉血栓^[9]。然而, 由于 tPA 本身不具有纤溶活性, 需依赖于血液中的 PLM 才能发挥溶栓作用, 因此对于急性 RVO 具有较好的治疗效果^[4], 而 PLM 具有直接溶栓作用, 且能快速被 α₂-抗纤溶酶灭活, 因此发生出血并发症的风险较低^[10]。

PLM-ΔK 是一种截断的 PLM 突变体, 缺失 PLM 的

5 个 K 区, 保留了 PLM 的纤溶活性。PLM-ΔK 的相对分子质量为 27 000, 小于 PLM (88 000) 和 tPA (57 000), 理论上有利于其扩散入视网膜血管内, 此外由于其缺乏 K 区, 也可避免 PLM 诱导的炎症和新生血管形成^[11]。本研究结果证实, 玻璃体腔注射后 PLM-ΔK 可扩散至大鼠视网膜外层, 0.02 U PLM-ΔK (相当于 1.2 μg) 玻璃体腔注射可诱导玻璃体后脱离, 60% 的 BRVO 模型大鼠注射后分支静脉的再通达到 2 支以上, 而 0.03 U PLM-ΔK 注射后可诱导 40% 的 BRVO 模型大鼠视网膜血管完全再通, 明显减轻视网膜的水肿和出血, 新生血管形成减少, 血管内层细胞的损伤减轻, 未发现明显的视网膜脱离。

目前, PLM-ΔK 已获得美国 FDA 和欧洲一些国家的批准用于玻璃体黄斑粘连的治疗, 临床研究表明其

治疗选择性玻璃体黄斑粘连和黄斑裂孔是安全和有效的^[12],然而其用于 RVO 的治疗鲜有报道。此外,这种 K 区缺失突变体可明显改善大鼠脑卒中后的神经功能和肢体活动,出血风险较小^[13-14]。PLM-ΔK 可降解 OLM 和 PCL 的 FN 和部分 LN,表明 PLM-ΔK 可以扩散至视网膜内层。Sakuma 等^[15]报道兔眼玻璃体腔注射 250 μg PLM-ΔK 后视网膜电图 a 波和 b 波振幅下降,注射后 2~7 d 视网膜电图 a 波可恢复正常,注射后 90 d 视网膜电图 b 波恢复正常,但未发现视网膜内层结构发生明显改变。PLM-ΔK 用于治疗玻璃体与黄斑粘连时,5.6% 的患者视力下降,高于对照组的 3.2%,但约 90% 的患者视力在平均 2 周内恢复至治疗前^[16-17]。研究表明,血管内皮细胞表达的 FN 和 LN 可能参与新生血管的生成^[18],因此这种降解作用对于治疗的影响还有待进一步研究。

目前,RVO 动物模型的造模方法有多种,光化学法的作用机制是激光照射光敏化合物后通过发热而导致血管内皮细胞受损,释放组织因子,促进血栓形成。由于该方法操作简易,无需复杂的手术,自发性血管再通者较少,因此被广泛用于 BRVO 溶栓及抑制新生血管的实验研究^[19]。本研究结果表明,玻璃体腔注射 PLM-ΔK 可扩散至脉络膜,并促进了光化学法诱导 BRVO 血管的再通,因此可能成为治疗 BRVO 的一种潜在方法。由于动物模型血栓产生的机制与临床自然病程仍有不同,有必要采用其他模型验证其效率和安全性。

参考文献

- [1] Rogers S, McIntosh RL, Cheung N, et al. The prevalence of retinal vein occlusion: pooled data from population studies from the United States, Europe, Asia, and Australia [J]. *Ophthalmology*, 2010, 117(2): 313-319. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.07.017.
- [2] Chatziralli IP, Jaulim A, Peponis VG, et al. Branch retinal vein occlusion: treatment modalities: an update of the literature [J]. *Semin Ophthalmol*, 2014, 29(2): 85-107. DOI: 10.3109/08820538.2013.833271.
- [3] Mcallister IL, Sarojini V, Dao-Yi Y. Intravitreal tenecteplase (metalyse) for acute management of retinal vein occlusions [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(7): 4910-4918. DOI: 10.1167/iovs.13-11967.
- [4] Patricia U, Manuel DL, Salvador GD, et al. Intravitreal plasmin without vitrectomy for macular edema secondary to branch retinal vein occlusion [J]. *Arch Ophthalmol*, 2011, 29(3): 283-287. DOI: 10.1001/archophthalmol.2011.8.
- [5] 陈武, 莫炜, 张艳玲, 等. 重组人纤溶酶原基因的酵母表达、产物纯化及鉴定 [J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(10): 18-22. Chen W, Mo W, Zhang YL, et al. Expression, production purification and identification of recombinant human plasminogen gene in yeast [J]. *Chin Biotechnol*, 2009, 29(10): 18-22.
- [6] 陈武, 黄欣, 莫炜, 等. 纤溶酶 Kringle 区缺失突变体对兔眼玻璃体视网膜界面的作用 [J]. *眼科研究*, 2010, 28(3): 231-235. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0808.2010.03.012. Chen W, Huang X, Mo W, et al. The effects of plasmin Kringle domains deficiency mutant on the interface of vitreous and retina in rabbit eyes [J]. *Chin Ophthalmol Res*, 2010, 28(3): 231-235. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0808.2010.03.012.
- [7] 陈武, 吴茂材, 吴敬源, 等. 一种含精-甘-天冬氨酰三肽人纤溶酶原 K 区缺失突变体在巴斯德毕赤酵母中的表达、纯化与特性 [J]. *生物工程学报*, 2011, 27(5): 764-772. Chen W, Wu MC, Wu JY, et al. Purification and characterization of a kringle-deficit mutant of human plasminogen with Arg-Gly-Asp tripeptide expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Chin J Biotech*, 2011, 27(5): 764-772.
- [8] Wilson CA, Hatchell DL. Photodynamic retinal vascular thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, 32(8): 2357-2365.
- [9] Tal K, Dotan A, Nisgav Y, et al. Penetration of intravitreal injected tissue plasminogen activator to the retina-rats model study [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(7): 1211 [2015-08-22]. <http://iovs.arvojournals.org/solr/searchResult.aspx?author=Kfir+Tal>.
- [10] Marder VJ. Pre-clinical studies of plasmin: superior benefit-to-risk ratio of plasmin compared to tissue plasminogen activator [J]. *Thromb Res*, 2008, 122(6): 9-15. DOI: 10.1016/j.thromres.2008.06.019.
- [11] Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2015. DOI: 10.1155/2015/437695.
- [12] 李璐希, 杜红俊, 李曼红, 等. 重组微纤溶酶 Ocriplasmin 作为玻璃体溶解剂的临床评估 [J]. *中华眼科杂志*, 2015, 51(2): 155-160. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.02.023. Li LX, Du HJ, Li MH, et al. Clinical evaluation of ocriplasmin as a vitreolytic agent [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2015, 51(2): 155-160. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.02.023.
- [13] Suzuki Y, Chen F, Ni Y, et al. Microplasmin reduces ischemic brain damage and improves neurological function in a rat stroke model monitored with MRI [J]. *Stroke*, 2004, 35(10): 2402-2406. DOI: 10.1161/01.STR.0000140628.00927.1a.
- [14] Thijs VN, Peeters A, Vosko M, et al. Randomized, placebo-controlled, dose-ranging clinical trial of intravenous microplasmin in patients with acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2009, 40(12): 3789-3795. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.560201.
- [15] Sakuma T, Tanaka M, Mizota A, et al. Safety of in vivo pharmacologic vitreolysis with recombinant microplasmin in rabbit eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(9): 3295-3299. DOI: 10.1167/iovs.04-1517.
- [16] Mettouchi A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6(6): 528-534. DOI: 10.4161/cam.22862.
- [17] Kim JE. Safety and complications of ocriplasmin: ocriplasmin; oh, how safe art thou? [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2014, 132(4): 379-380. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.278.
- [18] Beebe DC. Understanding the adverse effects of ocriplasmin [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2015, 133(2): 229-229. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.4484.
- [19] 袁子茗, 吴强. 视网膜静脉阻塞动物模型制作的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(11): 1044-1047. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.020. Yuan ZM, Wu Q. Current progress in research on animal model of retinal vein occlusion [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(11): 1044-1047. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.020.

(收稿日期: 2015-10-03)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)