

核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联照射时间与视网膜损伤的关系

颜东¹ 刘丽梅² 明春秀² 张少斌²

¹滨州医学院, 烟台 264033; ²潍坊眼科医院 261041

通信作者: 张少斌, Email: zhangsb518@163.com

【摘要】 目的 研究不同照射时间下核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联术对兔视网膜的影响, 寻找照射的安全时间。方法 采用随机数表法将 60 只健康成年新西兰大白兔随机分为对照组(0 min 组)和照射 10、20、30 及 40 min 组, 每组 12 只, 均取左眼进行核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联照射(370 nm, 10 mW/cm²)。采用光学显微镜和透射电子显微镜观察并比较各组视网膜病理组织学改变; 采用生化反应试剂盒检测并比较各组视网膜组织中丙二醛(MDA)浓度及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性; 采用 Western blot 法检测并比较各组视网膜组织中 SOD、CAT 蛋白表达水平。结果 光学显微镜下观察到对照组视网膜各层结构排列有序, 照射 10 min 组与对照组相比无明显变化, 随着照射时间的延长, 视网膜结构损伤逐渐加重。透射电子显微镜下可见对照组光感受器细胞外节膜盘层状结构完整, 光感受器细胞内节线粒体结构完整, 线粒体嵴结构连续, 照射 10 min 组与对照组相比无明显变化, 随着照射时间的延长, 视网膜结构损伤逐渐加重。各组视网膜组织中 MDA 浓度随着照射时间的延长逐渐升高, 总体比较差异有统计学意义($F=65.25, P<0.05$), 其中照射 20 min、30 min、40 min 组 MDA 浓度分别为(11.31±1.84)、(14.94±1.04)和(18.25±1.42) nmol/mgprot, 明显高于对照组的(1.13±0.02) nmol/mgprot, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$); 照射 20 min、30 min、40 min 组 MDA 浓度依次升高, 两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。随着照射时间的延长, 视网膜组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性及 SOD、CAT 蛋白相对表达量均逐渐降低, 总体比较差异均有统计学意义($F=44.09, 34.18, 35.60, 115.75, 78.86$, 均 $P<0.05$), 其中照射 20、30、40 min 组与对照组比较, 照射 20 min、30 min、40 min 组两两比较, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 10 mW/cm² 核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联照射兔眼 10 min 是安全的, 照射时间过长可引起视网膜损伤。

【关键词】 胶原交联; 巩膜/药物作用; 核黄素/药理; 紫外线/不良反应; 光感受器细胞/药物作用; 光敏剂/毒性作用; 实验性放射损伤/病理, 超微结构; 脂质过氧化损伤

基金项目: 潍坊市科技发展计划项目(2017YX031)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190703-00287

Relationship between irradiation time of riboflavin-ultraviolet A scleral collagen cross-linking and retinal injury

Yan Dong¹, Liu Limei², Ming Chunxiu², Zhang Shaobin²

¹Binzhou Medical University, Yantai 264033, China; ²Weifang Eye Hospital, Weifang 261041, China

Corresponding author: Zhang Shaobin, Email: zhangsb518@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of riboflavin-ultraviolet A scleral collagen cross-linking on the retina under different irradiation time, and to determine the safe irradiation time. **Methods** Sixty healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into control group (0 minute group), 10 minutes group, 20 minutes group, 30 minutes group and 40 minutes irradiation group according to the irradiation time, with 12 rabbits in each group. The left eye was irradiated with riboflavin-ultraviolet A scleral collagen (370 nm, 10 mW/cm²). The histopathological change of retina was observed by light microscope and transmission electron microscope and compared among different groups. The concentration of MDA and the activities of SOD, CAT and GSH-Px in retinal tissue were detected by corresponding kits. The expression levels of SOD and CAT proteins in retinal tissue were detected by Western blot method. The study protocol was approved by the Binzhou Medical University Laboratory Animal Ethical Committee (No. 2017-80). The use and care of animals complied with the statement of ARVO and the Regulation on the Management of Laboratory Animal Quality of China. **Results** Under the light microscope, the structure of the retinas in the control group was orderly arranged. Under the transmission electron microscope, the lamellar structure in the inner segment and the mitochondrial structure in the outer segment of the photoreceptor cells

were intact, and the mitochondrial ridge was continuous in the control group. There was no obvious difference in retinal morphology between the 10 minutes irradiation group and the control group under both the light microscope and the transmission electron microscope, and the retinal damage became more severe with the prolongation of irradiation time. The concentration of MDA in the retina of each group was elevated gradually with the increase of irradiation time, and the difference was statistically significant ($F = 65.25, P < 0.05$). The concentration of MDA was (11.31 ± 1.84), (14.94 ± 1.04) and (18.25 ± 1.42) nmol/mgprot in the 20 minutes, 30 minutes and 40 minutes irradiation groups respectively, which were significantly higher than (1.13 ± 0.02) nmol/mgprot in the control group (all at $P < 0.05$). The MDA concentration in 20 minutes, 30 minutes and 40 minutes irradiation groups was increased successively, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). With the prolongation of irradiation time, the activities of SOD, CAT and GSH-Px as well as the expression levels of SOD and CAT proteins were significantly decreased gradually ($F = 44.09, 34.18, 35.60, 115.75, 78.86$; all at $P < 0.05$). The differences between the control group and 20 minutes, 30 minutes, 40 minutes irradiation groups, and the differences among 20 minutes, 30 minutes, 40 minutes irradiation groups were statistically significant (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Riboflavin-ultraviolet A 10 mW/cm² scleral collagen cross-linking irradiation for 10 minutes is safe. Excessive irradiation time can cause damage to the retina of rabbits.

[Key words] Collagen cross-linking; Sclera/drug effects; Riboflavin/pharmacology; Ultraviolet ray/adverse effects; Photoreceptor cells/drug effects; Photosensitizing agents/toxicity; Radiation injuries, experimental/pathology, ultrastructure; Lipid peroxidation

Fund program: Weifang Science and Technology Development Plan Project (2017YX031)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190703-00287

病理性近视是全球性的公共卫生问题,是低视力和致盲的主要原因之一。病理性近视的眼底常出现多种异常改变,包括视盘斜入、视盘颞侧萎缩弧或视盘周围萎缩环、后巩膜葡萄肿、豹纹状眼底等。这些改变的根本原因在于眼轴的进行性增长,后巩膜变薄,生物力学强度减弱,眼底出现退行性变化^[1]。核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联术可增强巩膜的生物力学强度^[2-6],但是在紫外线 A 照射时可能会有视网膜损伤的风险。既往研究主要通过病理组织学方法研究核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联术的安全性^[7-8]。由于其潜在的损伤机制可能为交联过程中释放的活性氧自由基导致的光化学损伤^[9],因此本研究在组织学研究的基础上,进一步探讨该技术对视网膜氧化及抗氧化水平的影响,寻找其照射的安全时间。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选取健康成年新西兰大白兔 60 只,雌雄各半,体质量 2.0~2.5 kg(青岛大学提供),实验兔均在 SPF 动物房饲养并进行实验。实验动物的饲养和使用均遵循 ARVO 制定的科研动物使用规范和国家科学技术委员会颁布的《实验动物质量管理办法》要求。本研究经滨州医学院实验动物伦理委员会审核批准(批文号:2017-80)。采用随机数表法将 60 只实验兔随机分为对照组(0 min)和照射 10、20、30 及 40 min 组,每组 12 只,均以左眼为实验眼。

1.1.2 主要试剂及仪器 质量分数 0.1%核黄素溶液(意大利 Sooft 公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(TBA 法)、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(WST-1 法)、过氧化氢酶(catalase, CAT)测定试剂盒(钼酸铵法)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);兔抗 GAPDH 抗体、兔抗 CAT 抗体(美国 Abcam 公司);兔抗 SOD 抗体(美国 Affinity 公司);HRP 标记的山羊抗兔二抗(南非 Aspen 公司);RIPA 裂解液(中国 Beyotime 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。LED 紫外线发射仪(Mod. VEGA 10 mW,意大利 Sooft 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司);光学显微镜(日本尼康公司);透射电子显微镜(美国 FEI 公司);电泳仪、转膜仪、凝胶成像系统(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联术及术后处理 实验前 3 d 采用氧氟沙星滴眼液点眼,每天 4 次。在每次照射前对交联仪进行能量测试,确保能量的准确性。采用质量分数 1%戊巴比妥钠溶液(2 ml/kg)经兔耳缘静脉注射行全身麻醉。实验眼采用盐酸丙美卡因滴眼液点眼行表面麻醉,开睑器撑开左眼睑,眼科剪剪开球结膜,分离结膜下组织,5-0 尼龙线在角膜缘处牵拉,暴露鼻上象限赤道部巩膜 9 mm×9 mm 以上。于照射前 15 min 采用 0.1%核黄素溶液点眼,每 3 min 点

眼 1 次。照射参数:波长为 370 nm,能量密度为 10 mW/cm^2 ,光圈直径为 9 mm,照射期间仍每 3 min 核黄素溶液点眼 1 次。术后采用氧氟沙星滴眼液点眼,每天 4 次。于照射结束后 24 h,采用耳缘静脉注射空气法处死实验兔后摘取眼球。

1.2.2 苏木精-伊红染色观察视网膜组织形态 将眼球置于质量分数 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,取实验眼交联区域和对照组相应区域的组织,于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,乙醇脱水,石蜡包埋,用苏木精-伊红染色 $4 \mu\text{m}$ 厚石蜡切片,光学显微镜下观察视网膜组织的病理学改变。所有实验独立重复 3 次。

1.2.3 醋酸铀-柠檬酸铅双重染色观察视网膜超微结构 取新鲜视网膜组织迅速投入配置好的固定液中,标本先后经体积分数 2.5%戊二醛固定液和质量分数 1%四氧化锇固定液双重固定;梯度乙醇脱水;环氧丙烷过渡,Epon812 包埋;半薄切片定位,制作超薄切片,厚度为 60 nm;采用醋酸铀-柠檬酸铅双重染色。采用 Tecnai G2 20 Twin 透射电子显微镜观察视网膜超微结构变化。所有实验独立重复 3 次。

1.2.4 MDA 测试盒检测视网膜中 MDA 浓度 取新鲜视网膜组织,称重,置于玻璃匀浆器中,加入预冷的生理盐水,质量分数 10%蛋白匀浆,离心半径 16 cm,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。在空白管、标准管、测定管及对照管分别加入无水乙醇 0.1 ml、10 nmol/ml 标准品 0.1 ml、测试样品 0.1 ml,向每管加入试剂一 0.1 ml,混匀。向每管中依次加入试剂二 3.0 ml 和试剂三 1.0 ml,对照管中加入质量分数 50%冰醋酸 1 ml 代替试剂三。离心管盖上盖子,用针在盖子上扎 1 个小孔,振荡混匀器混匀,95 °C 水浴 40 min,取出后冷却,3 500 r/min 离心 10 min,取上清。蒸馏水调零,532 nm 处测定各管吸光度(A)值后计算其含量。所有实验独立重复 3 次。

1.2.5 SOD、CAT、GSH-Px 测定试剂盒检测视网膜中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性 取 1.2.4 已制备好的上清液待用。(1)SOD 活性检测 在对照孔、对照空白孔、测定孔及测定空白孔依次加入待测匀浆上清、蒸馏水、酶工作液、酶稀释液及底物应用液各 $20 \mu\text{l}$,混匀,37 °C 孵育 20 min,450 nm 处酶标仪上读取 A 值,计算 SOD 抑制率和 SOD 活性。SOD 抑制率=(对照 A 值-测定 A 值)/对照 A 值;SOD 活性 [$\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$]=SOD 抑制率/50%×反应体系稀释倍数/待测样本蛋白浓度 (mgprot/ml)/60。(2)CAT 活性检测 取组织匀浆液 $50 \mu\text{l}$ 加到测试管内,对照管内不加组织匀浆液,向 2 个管内依次加入试剂一 1 ml 和试剂二 $100 \mu\text{l}$,混

匀,37 °C 反应 60 s 后依次加入试剂三 1 ml 和试剂四 $100 \mu\text{l}$,对照管内补加 $50 \mu\text{l}$ 组织匀浆液,混匀。双蒸水调零,测定各管波长 405 nm 处 A 值后计算 CAT 活性,CAT 活性 [$\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$]=(对照 A 值-测定 A 值)×271/60。(3)GSH-Px 活性检测 酶管与非酶管内各加 1 mmol/L GSH 溶液 $200 \mu\text{l}$,然后酶管内再加 $200 \mu\text{l}$ 组织匀浆液。混匀,37 °C 水浴 5 min。加入试剂一应用液 $100 \mu\text{l}$,37 °C 水浴反应 5 min。加入试剂二应用液 2 ml 终止反应,非酶管内补加 $200 \mu\text{l}$ 组织匀浆液,混匀,3 500 r/min 离心 10 min。分别向空白管、标准管中加入 GSH 标准品溶剂应用液、 $20 \mu\text{mol/L}$ GSH 标准液 1 ml,向非酶管和酶管中各加入上清液 1 ml,向各管中依次加入试剂三、四、五进行显色反应。混匀,室温下静置 15 min。蒸馏水调零,测定各管波长 412 nm 处 A 值。GSH-Px 抑制率=(非酶管 A 值-酶管 A 值)/非酶管 A 值×100%,抑制率在 45%或 50%左右为最佳取样浓度。GSH-Px 活力 [$\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$]=标准管浓度×取样量×样本蛋白含量 (mgprot/ml)/60。所有实验独立重复 3 次。

1.2.6 Western blot 法检测视网膜中 SOD、CAT 蛋白相对表达量 取新鲜视网膜组织,用 RIPA 总蛋白裂解液提取视网膜总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度并调平。各组分别取等量蛋白用质量分数 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,转移蛋白至 PVDF 膜。采用质量分数 5%脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗 (CAT:1:2 000;SOD:1:1 000;GAPDH:1:10 000),于 4 °C 孵育过夜。次日弃去一抗,加入二抗 (1:10 000),室温下封闭 1 h,滴加 ECL 液曝光显影,用凝胶成像系统获取蛋白条带图片。以 GAPDH 为内参,计算各蛋白相对表达量。蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。所有实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(美国 SPSS 公司)进行统计分析,计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用随机分组单因素干预多水平研究设计。不同照射时间组视网膜中 MDA 浓度,SOD、CAT 和 GSH-Px 活性,SOD 和 CAT 蛋白相对表达量的总体比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同照射时间对视网膜组织形态的影响

对照组和照射 10 min 组视网膜各层结构排列均

规则有序,界限清晰,视网膜整体结构较正常。照射 20 min 组视网膜各层结构轻度水肿,光感受器细胞层排列偶见疏松,神经节细胞轻度水肿,细胞质淡染。照射 30 min 组视网膜各层结构明显水肿,细胞整体淡染,光感受器细胞层排列紊乱,神经节细胞层细胞数量减少,神经纤维层轻度增生。照射 40 min 组视网膜光感受器层和色素上皮层分离,光感受器层细胞水肿,细胞质淡染,神经节细胞层内神经节细胞消失,神经纤维显著增生,神经纤维层厚度增加,可见内界膜脱落(图 1)。

2.2 不同照射时间对视网膜超微结构的影响

对照组光感受器细胞外节膜盘层状结构完整,层次清晰,排列整齐;光感受器细胞内节线粒体结构完整,线粒体嵴结构连续,呈长椭圆形,细胞核染色均匀,核膜结构完整,与细胞质界限清晰,形态规则。照射 10 min 组与对照组相比无明显变化。照射 20 min 组视网膜光感受器细胞外节膜盘层状结构完整,层次清晰,排列整齐,少量外节膜盘结构溶解,层次结构消失;部分内节线粒体嵴结构溶解,模糊,不连续。照射 30 min 组部分视网膜光感受器细胞外节膜盘层状结构解离,空泡化,紊乱呈髓样结构;部分线粒体嵴结构溶解、模糊,形成髓样小体。照射 40 min 组视网膜光感受器外节细胞减少、稀疏,细胞间隙较大;内节线粒体肿胀,线粒体嵴结构消失,形成空泡化(图 2)。

2.3 不同照射时间对视网膜组织中 MDA 浓度的影响

随着照射时间的延长,各组视网膜组织中 MDA 浓度逐渐升高,总体比较差异有统计学意义($F = 65.25, P < 0.05$),其中照射 20 min、30 min 和 40 min 组 MDA 浓度明显高于对照组,照射 20 min、30 min 和 40 min 组 MDA 浓度依次升高,两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。

2.4 不同照射时间对视网膜组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性的影响

随着照射时间的延长,各组视网膜组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性逐渐降低,总体比较差异均有统计学意义($F = 44.09, 34.18, 35.60$, 均 $P < 0.05$),其中照射 20 min、30 min、40 min 组 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性明显低于对照组,照射 20 min、30 min、40 min 组 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性依次降低,两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。

2.5 不同照射时间对视网膜组织中 SOD 和 CAT 蛋白相对表达量的影响

随着照射时间的延长,各组视网膜组织中 SOD 和 CAT 蛋白相对表达量逐渐降低,总体比较差异均有统计学意义($F = 115.75, 78.86$, 均 $P < 0.05$),其中照射 20 min、30 min、40 min 组 SOD 和 CAT 蛋白相对表达量明显低于对照组,照射 20 min、30 min、40 min 组 SOD 和 CAT 蛋白相对表达量依次降低,两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 3,表 2)。

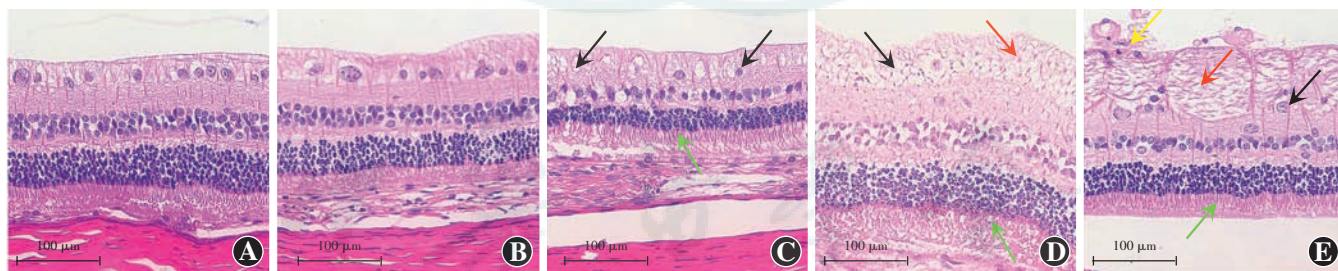


图 1 光学显微镜下观察不同照射时间对视网膜组织形态的影响(HE $\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) A: 对照组视网膜各层结构排列规则有序,界限清晰,视网膜整体结构较正常 B: 照射 10 min 组与对照组表现类似 C: 照射 20 min 组视网膜各层结构轻度水肿,光感受器细胞层排列偶见疏松(绿色箭头),神经节细胞轻度水肿,细胞质淡染(黑色箭头) D: 照射 30 min 组视网膜各层结构明显水肿,细胞整体淡染,光感受器细胞层排列紊乱(绿色箭头),神经节细胞层细胞数量减少(黑色箭头),神经纤维层轻度增生(红色箭头) E: 照射 40 min 组视网膜光感受器层和色素上皮层分离,光感受器层细胞水肿,细胞质淡染(绿色箭头),神经节细胞层内神经节细胞消失(黑色箭头),神经纤维显著增生,神经纤维层厚度增加(红色箭头),内界膜脱落(黄色箭头)

Figure 1 Observation of retinal tissue morphology changes under the light microscope after different irradiation time (HE $\times 200$, bar = $100 \mu\text{m}$)

A: In the control group, the retinal layers were arranged orderly with clear boundaries, and the whole structure of the retina was normal B: The retinal morphology of the 10 minutes irradiation group was similar to that of the control group C: In the 20 minutes irradiation group, there was mild edema in each retinal layer; the arrangement of photoreceptor cell layers was occasionally loose (green arrow); the ganglion cells were slightly swelling; the cytoplasm was slightly stained (black arrows) D: In the 30 minutes irradiation group, there was obvious edema in each retinal layer; the cells were slightly stained on the whole; the photoreceptor cell layers were disordered (green arrow); the number of ganglion cells was decreased (black arrow); the nerve fiber layer was slightly proliferated (red arrow) E: In the 40 minutes irradiation group, the photoreceptor layer and the pigment epithelium layer were separated; the photoreceptor cells were swelling; the cytoplasm was slightly stained (green arrow); the ganglion cells disappeared (black arrow); the nerve fibers proliferated significantly; the thickness of the nerve fibers layer increased (red arrow); the inner limiting membrane fell off (yellow arrow)

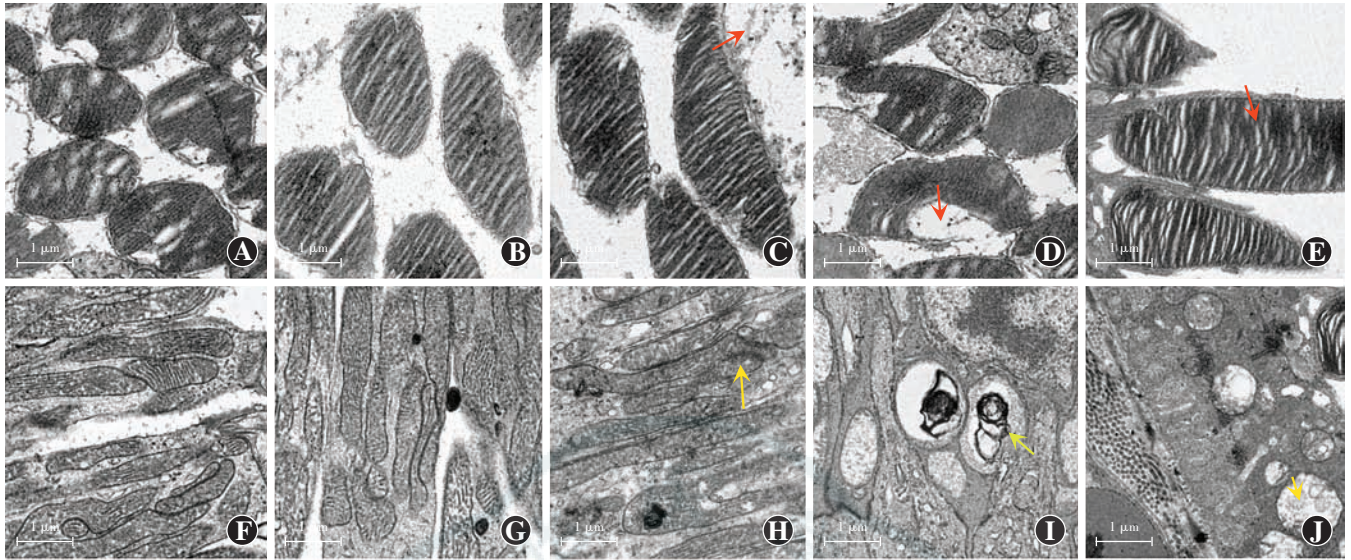


图 2 电子显微镜下观察不同照射时间对视网膜光感受器细胞外节和内节超微结构的影响(醋酸铀-柠檬酸铅 ×5 000, 标尺 = 1 μm) A: 对照组光感受器细胞外节膜盘层状结构完整, 层次清晰, 排列整齐 B: 照射 10 min 组光感受器细胞外节表现与对照组类似 C: 照射 20 min 组视网膜光感受器细胞可见少量外节膜盘结构溶解, 层次结构消失(红色箭头) D: 照射 30 min 组部分视网膜光感受器细胞外节膜盘层状结构解离、空泡化、紊乱, 呈髓样结构(红色箭头) E: 照射 40 min 组视网膜光感受器外节细胞减少、稀疏, 细胞间隙较大(红色箭头) F: 对照组光感受器细胞内节线粒体结构完整, 线粒体嵴结构连续, 呈长椭圆形, 细胞核染色均匀, 核膜结构完整, 与细胞质界限清晰, 形态规则 G: 照射 10 min 组光感受器内节表现与对照组类似 H: 照射 20 min 组光感受器内节部分线粒体嵴结构溶解、模糊、不连续(黄色箭头) I: 照射 30 min 组部分线粒体嵴结构溶解、模糊, 形成髓样小体(黄色箭头) J: 照射 40 min 组光感受器内节线粒体肿胀, 线粒体嵴结构消失, 形成空泡化(黄色箭头)

Figure 2 Observation of the ultrastructure of retinal photoreceptors outer and inner segments under the electron microscope after different irradiation time (uranium acetate-lead citrate ×5 000, bar = 1 μm) A: In the control group, the layered structure of the photoreceptor outer segment was complete and clear with neat arrangement B: The morphology of the photoreceptor outer segment in the 10 minutes irradiation group was similar to that in the control group C: In the 20 minutes irradiation group, the layered structure of the photoreceptor outer segment was a little dissolved and the layers disappeared (red arrow) D: In the 30 minutes irradiation group, the layered structure of the photoreceptor outer segment was dissociated, vacuolated and disordered and presented medullary (red arrow) E: In the 40 minutes irradiation group, the cells of the photoreceptor outer segment were reduced and sparse, and the intercellular space was large (red arrow) F: In the control group, the mitochondria of photoreceptor inner segment cells were intact; the mitochondrial ridge structure was continuous, regular and long ellipse in shape; the nucleus was uniformly stained; the structure of nuclear membrane was intact with clear boundary between it and the cytoplasm G: The morphology of the photoreceptor inner segment in the 10 minutes irradiation group was similar to that in the control group H: In the 20 minutes irradiation group, part of mitochondrial ridge structure of the photoreceptor inner segment was dissolved, blurred and discontinuous (yellow arrow) I: In the 30 minutes irradiation group, part of the mitochondrial ridge structure was dissolved and blurred with medullary corpuscles formed (yellow arrow) J: In the 40 minutes irradiation group, mitochondria swelled and mitochondrial ridge structure disappeared with vacuolation formed in the photoreceptor inner segment (yellow arrow)

表 1 各组兔眼视网膜组织中 MDA 浓度及 SOD、CAT、GSH-Px 活性比较 (mean±SD)

Table 1 Comparison of MDA concentration and SOD, CAT, GSH-Px activities in retinal tissues of rabbits among different groups (mean±SD)

组别	样本量	MDA 浓度 (nmol/mgprot)	SOD 活性 [μmol/(s·mg)]	CAT 活性 [μmol/(s·mg)]	GSH-Px 活性 [μmol/(s·mg)]
对照组	3	1.13±0.02	0.25±0.03	0.11±0.01	3.00±0.29
照射 10 min 组	3	4.13±1.21	0.25±0.01	0.11±0.02	2.81±0.39
照射 20 min 组	3	11.31±1.84 ^a	0.19±0.03 ^a	0.07±0.01 ^a	2.13±0.15 ^a
照射 30 min 组	3	14.94±1.04 ^{ab}	0.13±0.01 ^{ab}	0.06±0.01 ^{ab}	1.67±0.12 ^{ab}
照射 40 min 组	3	18.25±1.42 ^{abc}	0.08±0.01 ^{abc}	0.04±0.01 ^{abc}	0.92±0.17 ^{abc}
F 值		65.25	44.09	34.18	35.60
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与各自对照组比较,^aP<0.05;与各自照射 20 min 组比较,^bP<0.05;与各自照射 30 min 组比较,^cP<0.05(单因素方差分析, LSD-t 检验) MDA:丙二醛;SOD:超氧化物歧化酶;CAT:过氧化氢酶;GSH-Px:谷胱甘肽过氧化物酶

Note: Compared with the respective control group, ^aP<0.05; compared with the respective 20 minutes irradiation group, ^bP<0.05; compared with the respective 30 minutes irradiation group, ^cP<0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test) MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GSH-Px: glutathione peroxidase

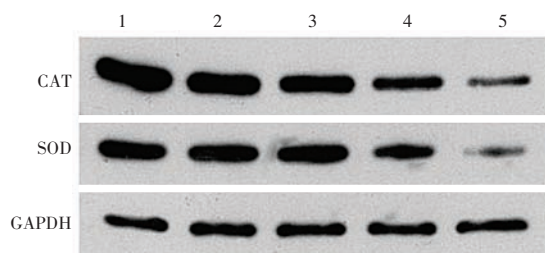


图3 Western blot法检测各组视网膜组织中SOD和CAT蛋白表达电泳图 随着照射时间的延长,各组视网膜组织中SOD和CAT蛋白表达条带逐渐减弱 1:对照组;2:照射10 min组;3:照射20 min组;4:照射30 min组;5:照射40 min组 CAT:过氧化氢酶;SOD:超氧化物歧化酶;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 3 Expression levels of SOD and CAT proteins in retina of different groups by Western blot With the increase of irradiation time, the expression bands of SOD and CAT proteins in retina were decreased gradually 1: control group; 2: 10 minutes irradiation group; 3: 20 minutes irradiation group; 4: 30 minutes irradiation group; 5: 40 minutes irradiation group CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表2 各组兔视网膜组织中SOD和CAT蛋白相对表达量比较(mean±SD)

Table 2 Comparison of relative expression levels of SOD and CAT proteins in retina of rabbits among different groups (mean±SD)

组别	样本量	SOD 蛋白相对表达量	CAT 蛋白相对表达量
对照组	3	1.82±0.14	3.82±0.14
照射 10 min 组	3	1.64±0.08	3.50±0.49
照射 20 min 组	3	1.23±0.11 ^a	1.93±0.11 ^a
照射 30 min 组	3	0.79±0.06 ^{ab}	0.94±0.13 ^{ab}
照射 40 min 组	3	0.08±0.02 ^{abc}	0.29±0.09 ^{abc}
F 值		115.75	78.86
P 值		<0.05	<0.05

注:与各自对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自照射 20 min 组比较,^b $P < 0.05$;与各自照射 30 min 组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) SOD:超氧化物歧化酶;CAT:过氧化氢酶

Note: Compared with the respective control group, ^a $P < 0.05$; compared with the respective 20 minutes irradiation group, ^b $P < 0.05$; compared with the respective 30 minutes irradiation group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase

3 讨论

关于巩膜胶原交联术安全性的研究相对较少,Zhang等^[10]用3 mW/cm²的紫外线照射兔眼不同的时间,光学显微镜下观察发现照射时间在40 min以内不会对视网膜造成损伤,照射时间过长可引起视网膜损伤。本实验中未选用3 mW/cm²的能量照射,而是采用10 mW/cm²的能量照射,因为根据本生罗斯科互易律,照射能量和照射时间的乘积相等,其光化学反应是等价的,胶原交联效果与组织吸收的总能量成正比^[11-12],通过增加紫外线的能量密度,减少照射时间可以加速交联反应。本实验结果显示,从照射20 min开始,视网膜的

正常结构开始出现改变,这与Zhang等^[10]对巩膜胶原交联安全性研究的结果一致,均证明了照射时间过长可引起视网膜损伤。本实验通过电子显微镜观察同样发现,从照射20 min开始,视网膜光感受器细胞外节和内节均逐渐发生改变,照射10 min组视网膜组织在光学显微镜和电子显微镜下均未出现明显的组织结构变化,因此本实验通过组织病理学观察得出核黄素-紫外线A巩膜胶原交联照射10 min是安全的。

视网膜的光损伤分为机械损伤、热损伤和光化学损伤^[13]。光化学损伤机制主要包括自由基和脂质过氧化损伤、钙离子和内质网应激反应蛋白及细胞凋亡机制^[14-17]。紫外线照射时会产生大量活性氧自由基^[18-19],活性氧自由基可直接损伤DNA,促进细胞凋亡,也可攻击蛋白质使蛋白质功能受损,还可以与生物膜中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,造成细胞膜正常结构的破坏。脂质过氧化反应的产物为MDA,通常MDA的浓度可以反映视网膜内脂质过氧化水平,提示视网膜的损伤程度。本研究结果表明,核黄素-紫外线A巩膜胶原交联照射20 min后视网膜中MDA浓度升高,说明视网膜中产生大量活性氧自由基,脂质过氧化水平升高,视网膜出现损伤。在以往的实验研究中,Wang等^[20]用核黄素-紫外线(365 nm, 3.0 mW/cm²)照射兔眼30 min,通过TUNEL染色分析发现视网膜层凋亡细胞,由此也可推测胶原交联治疗过程中细胞的凋亡可能是由细胞氧化损伤引起。

生理状态下,视网膜中存在清除自由基的抗氧化防御系统包括酶类和非酶类抗氧化物质,SOD、GSH-Px和CAT作为主要的酶类抗氧化物质可保护视网膜免受氧化损伤^[21],其中SOD可将O₂⁻分解为H₂O₂,而GSH-Px、CAT又能分解SOD催化产生的H₂O₂和其他来源的H₂O₂,它们与体内的自由基处于动态平衡。本实验将SOD、CAT、GSH-Px作为观察指标,结果显示从核黄素-紫外线A巩膜胶原交联照射20 min开始,SOD、CAT、GSH-Px活性和SOD、CAT蛋白相对表达量随照射时间延长均逐渐下降,说明此时视网膜内产生了过多活性氧自由基,大量消耗了视网膜中抗氧化物质同时使其失活,视网膜内氧化和抗氧化系统间的相对平衡受到破坏,视网膜发生氧化损伤,这与检测MDA浓度得到的结论一致。核黄素-紫外线A巩膜胶原交联照射10 min组MDA浓度,SOD、CAT活性和相对表达量,以及GSH-Px活性与对照组相比差异均无统计学意义,说明此时视网膜组织氧化系统和抗氧化系统处于动态平衡,胶原交联术并未对视网膜造成损伤。因此从视网膜组织氧化和抗氧化角度同样认为核黄素-紫外线A

巩膜胶原交联照射 10 min 是安全的,照射 20 min 会对视网膜造成损伤。另外,根据本生罗斯科互易律和以往实验证明,总能量为 5.4 J/cm^2 的核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联照射可增强巩膜生物力学强度^[11-12,22]。本实验照射 10 min 组总能量为 6.0 J/cm^2 ,结果显示核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联照射 10 min 是安全的,推测其还可增强巩膜生物力学强度,但其影响及机制仍需进一步研究。

综上所述,本研究结果表明 10 mW/cm^2 核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联照射 10 min 是安全的,照射时间过长可引起视网膜的损伤。本研究在病理组织学基础上进一步研究了视网膜抗氧化能力的变化,从而为核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联术应用于临床提供理论依据,但核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联术对视网膜功能的影响还有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Boote C, Sigal IA, Grytz R, et al. Scleral structure and biomechanics [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2020, 74 : 100773 [2020-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31412277/>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.100773.
- [2] Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, et al. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2005, 83 (4) : 477-482. DOI: 10.1111/j.1600-0420.2005.00447.x.
- [3] Xiao B, Chu Y, Wang H, et al. Minimally Invasive repetitive UVA irradiation along with riboflavin treatment increased the strength of sclera collagen cross-linking [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2017, 2017 : 1324012 [2020-08-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29391948/>. DOI: 10.1155/2017/1324012.
- [4] Wang M, Zhang F, Qian X, et al. Regional biomechanical properties of human sclera after cross-linking by riboflavin/ultraviolet A [J]. *J Refract Surg*, 2012, 28 (10) : 723-728. DOI: 10.3928/1081597X-20120921-08.
- [5] Zhang Y, Li Z, Liu L, et al. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014 : 194204 [2020-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24527438/>. DOI: 10.1155/2014/194204.
- [6] Liu S, Li S, Wang B, et al. Scleral cross-linking using riboflavin UVA irradiation for the prevention of myopia progression in a Guinea pig model: blocked axial extension and altered scleral microstructure [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11 (11) : e0165792 [2020-08-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27829051/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0165792.
- [7] 王红燕,肖博,楚艳华,等.微创核黄素-紫外线 A 巩膜胶原交联对巩膜生物力学强度的增强作用及安全性[J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36 (2) : 96-101. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.02.005.
Wang HY, Xiao B, Chu YH, et al. Enhancement of scleral biomechanics and safety following minimally invasive riboflavin-ultraviolet A collagen crosslinking in rabbits [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36 (2) : 96-101. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.02.005.
- [8] Rong S, Wang C, Han B, et al. Iontophoresis-assisted accelerated riboflavin/ultraviolet A scleral cross-linking: a potential treatment for pathologic myopia [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 162 : 37-47. DOI: 10.1016/j.exer.2017.07.002.
- [9] 孙明甦,张丰菊.紫外线 A-核黄素角巩膜胶原交联术的研究进展[J]. *中华眼科杂志*, 2018, 54 (12) : 948-953. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2018.12.016.
Sun MS, Zhang FJ. Research advances in corneal and scleral collagen cross-linking with ultraviolet A and riboflavin [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2018, 54 (12) : 948-953. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2018.12.016.
- [10] Zhang Y, Zou C, Liu L, et al. Effect of irradiation time on riboflavin-ultraviolet-A collagen crosslinking in rabbit sclera [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2013, 39 (8) : 1184-1189. DOI: 10.1016/j.jcrs.2013.02.055.
- [11] Murata Y, Osakabe M. The Bunsen-Roscoe reciprocity law in ultraviolet-B-induced mortality of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* [J]. *J Insect Physiol*, 2013, 59 (3) : 241-247. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2012.11.008.
- [12] Schumacher S, Oefinger L, Mrochen M. Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin and ultraviolet radiation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (12) : 9048-9052. DOI: 10.1167/iovs.11-7818.
- [13] Ham WT Jr, Mueller HA, Ruffolo JJ Jr, et al. Basic mechanisms underlying the production of photochemical lesions in the mammalian retina [J]. *Curr Eye Res*, 1984, 3 (1) : 165-174. DOI: 10.3109/02713688408997198.
- [14] Bindewald A, Schmitz-Valckenberg S, Jorzik JJ, et al. Classification of abnormal fundus autofluorescence patterns in the junctional zone of geographic atrophy in patients with age related macular degeneration [J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89 (7) : 874-878. DOI: 10.1136/bjo.2004.057794.
- [15] 邹秀兰,俞永珍,徐哲,等.蓝光诱导的人视网膜色素上皮细胞的氧化损伤及其线粒体机制[J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33 (2) : 129-134. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.02.007.
Zou XL, Yu YZ, Xu Z, et al. Oxidative damage of human retinal pigment epithelium cells induced by blue light irradiation and mitochondria-participated mechanism [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33 (2) : 129-134. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.02.007.
- [16] Nakanishi T, Shimazawa M, Sugitani S, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in light-induced photoreceptor degeneration in mice [J]. *J Neurochem*, 2013, 125 (1) : 111-124. DOI: 10.1111/jnc.12116.
- [17] Marc RE, Jones BW, Watt CB, et al. Extreme retinal remodeling triggered by light damage; implications for age related macular degeneration [J]. *Mol Vis*, 2008, 14 : 782-806.
- [18] Kuse Y, Ogawa K, Tsuruma K, et al. Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light [J/OL]. *Sci Rep*, 2014, 4 : 5223 [2020-08-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24909301/>. DOI: 10.1038/srep05223.
- [19] Peus D, Vasa RA, Meves A, et al. H_2O_2 is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 110 (6) : 966-971. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00210.x.
- [20] Wang M, Zhang F, Liu K, et al. Safety evaluation of rabbit eyes on scleral collagen cross-linking by riboflavin and ultraviolet A [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 43 (2) : 156-163. DOI: 10.1111/ceo.12392.
- [21] Benedetto MM, Contin MA. Oxidative stress in retinal degeneration promoted by constant LED light [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13 : 139 [2020-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31105526/>. DOI: 10.3389/fncel.2019.00139.
- [22] Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA) [J]. *Acta Ophthalmol*, 2009, 87 (2) : 193-198. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2008.01229.x.

(收稿日期:2020-07-09 修回日期:2021-05-01)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)