

## · 实验研究 ·

# 局部应用尿激酶对大鼠血-视网膜屏障外向通透性的影响

许文俊 高永峰 胡萍

**【摘要】** 背景 视网膜血管再通是治疗视网膜血管阻塞性疾病的关键。研究证实,玻璃体腔注射尿激酶可抑制视网膜毛细血管内皮细胞间紧密连接复合体中 Occludin 蛋白的表达。目的 用伊文思蓝(EB)玻璃体注射法观察尿激酶眼局部注射后大鼠血-视网膜屏障(BRB)外向通透性的变化。方法 采用随机数字表法将 60 只 SD 大鼠随机分为 4 个组,各组大鼠均以右眼作为实验眼。尿激酶玻璃体注射组大鼠将尿激酶 350 U(商品单位)4  $\mu$ l 注入右眼玻璃体腔,同容积的 PBS 以同样方式注射作为 PBS 玻璃体注射组,尿激酶球后注射组大鼠将 10  $\mu$ l 1 000 U 尿激酶注入右眼球后组织,等容积的 PBS 以同样方式注射作为 PBS 球后注射组。上述药物注射后 24 h,所有大鼠右眼玻璃体腔注射质量分数 0.5% EB 4  $\mu$ l。EB 注射后 4 h 摘取大鼠右侧眼球,完整取出玻璃体并以甲酰胺温浴萃取 EB。所得提取液以甲酰胺-分光光度法检测 EB 的质量浓度,并据此推算大鼠玻璃体腔内 EB 的质量浓度,对各组间大鼠玻璃体中 EB 质量浓度进行比较。结果 尿激酶玻璃体注射组大鼠玻璃体呈淡蓝色反光,眼科手术显微镜下可见视网膜血管;尿激酶球后注射组大鼠玻璃体呈蓝色,眼底血管不易显示,而 PBS 玻璃体注射组和 PBS 球后注射组大鼠玻璃体均呈深蓝色反光,眼底无法窥见。尿激酶玻璃体注射组、PBS 玻璃体注射组、尿激酶球后注射组和 PBS 球后注射组大鼠玻璃体的甲酰胺 EB 溶液吸光度(A)值分别为  $0.181 \pm 0.008$ 、 $0.450 \pm 0.017$ 、 $0.330 \pm 0.009$  和  $0.436 \pm 0.012$ ;尿激酶玻璃体注射组大鼠玻璃体腔内 EB 的质量浓度为  $(0.266 \pm 0.014)$  g/L,明显低于 PBS 玻璃体注射组、尿激酶球后注射组和 PBS 球后注射组的  $(0.667 \pm 0.026)$ 、 $(0.496 \pm 0.015)$  和  $(0.657 \pm 0.017)$  g/L,4 个组间差异有统计学意义( $F = 100.406, P < 0.01$ ),其中尿激酶玻璃体注射组大鼠玻璃体 EB 质量浓度均明显低于其他 3 个组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。结论 大鼠眼局部应用尿激酶可增加 BRB 的外向通透性,玻璃体腔内注射 EB 是检测大鼠 BRB 外向通透性的可靠方法。

**【关键词】** 尿激酶;玻璃体腔注射;伊文思蓝;血-视网膜屏障;SD 大鼠

**Effect of urokinase on the outward permeability of blood-retinal barrier following local injection in rats** Xu

Wenjun, Gao Yongfeng, Hu Ping. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Gao Yongfeng, Email: gaoyf09@hotmail.com

**【Abstract】** **Background** Retinal vascular recanalization is key to the treatment of retinal vascular occlusive disease. Studies confirmed that urokinase by intravitreal injection inhibits the expression of occludin protein at tight junction complexes among retinal capillary endothelial cells. **Objective** This study was to observe the effects of urokinase via eye local injection on the outward permeability of blood-retinal barrier by detecting the concentration of intravitreal Evans blue (EB). **Methods** Sixty healthy Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to four groups, and the right eyes of the rats were used as experimental eyes. Urokinase of 4  $\mu$ l (350 U) and the equal volume of PBS (0.01 mol/L) was intravitreally injected separately in the intravitreal urokinase group and the intravitreal PBS group, and 10  $\mu$ l urokinase (1 000U) and the equal volume of PBS was injected via retrobulbar tissue respectively as the retrobulbar urokinase group and the retrobulbar PBS group. Twenty-four hours after injection of

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.008

作者单位:450052 郑州大学第一附属医院眼科[许文俊(现在郑州市第二人民医院眼科)、胡萍];450003 郑州,河南省立眼科医院 & 河南省眼科研究所(高永峰)

通信作者:高永峰,Email:gaoyf09@hotmail.com

drugs, 0.5% EB 4  $\mu\text{l}$  was intravitreally injected. Four hours later, the rats were sacrificed and the right eyeballs were excised for the extraction and drying. EB was extracted from dried vitreous by formamide. Then, the concentration of EB in formamide was determined by a formamide extraction-ultraviolet spectrophotometry method to calculate the concentration of EB in vitreous. The use and care of experimental animals followed the *Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission (2011 version)*. **Results** The rat vitreous body showed the light blue color in intravitreal urokinase group and the retinal vessels were visible under the microscope, and that in the retrobulbar urokinase group presented blue color. However, in the intravitreal and retrobulbar PBS group, rat vitreous exhibited the deeper blue color and retinas were invisible. Absorbance of EB in formamide was  $0.181 \pm 0.008$ ,  $0.450 \pm 0.017$ ,  $0.330 \pm 0.009$  and  $0.436 \pm 0.012$  in the intravitreal urokinase group, intravitreal PBS group, retrobulbar urokinase group and retrobulbar PBS group, respectively. The intravitreal EB concentrations in the intravitreal urokinase group were  $(0.266 \pm 0.014) \text{g/L}$ , which was lower than  $(0.667 \pm 0.026) \text{g/L}$ ,  $(0.496 \pm 0.015) \text{g/L}$  and  $(0.657 \pm 0.017) \text{g/L}$  of the intravitreal PBS group, retrobulbar urokinase group and retrobulbar PBS group, showing significant different among the four groups ( $F = 100.406$ ,  $P < 0.01$ ), and the intravitreal urokinase group showed the lowest value in comparison with other three groups (all at  $P < 0.01$ ).

**Conclusions** Local application of urokinase around eye can augment the outward permeability of blood-retinal barrier in rats. Intravitreal assay of EB after intravitreal injection is a feasible approach to the determination of outward permeability of blood-retinal barrier.

[Key words] Urokinase; Intravitreal injection; Evans blue; Blood-retinal barrier; SD rats

视网膜血管疾病可造成视网膜组织细胞的缺氧,引起视功能损害。及时地再通视网膜血管是治疗视网膜血管性疾病的关键,但目前尚无安全、有效的方法。近年来,超选择性眼动脉介入溶栓疗法的应用可不同程度地使阻塞的视网膜血管再通,改善患者的视功能,但治疗过程中溶栓药物会不可避免地进入颅内循环系统而引起脑出血等严重并发症,因此该疗法的疗效和安全性存在争议<sup>[1-2]</sup>。尿激酶是常用的溶栓药物,研究发现,视网膜毛细血管内皮细胞间紧密连接复合体中 occludin 蛋白的表达减弱与血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)的损坏程度是一致的<sup>[3]</sup>,而大鼠玻璃体腔注射尿激酶可以抑制 occludin 蛋白的表达,且对视网膜组织无明显毒性作用<sup>[4]</sup>,而玻璃体腔内注射尿激酶后是否对 BPB 有影响尚不完全清楚。为此,本研究观察玻璃体腔内和球后注射尿激酶对 BRB 外向通透性的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及分组

成年清洁级 SD 大鼠 60 只,由郑州大学实验动物中心提供,雌雄不限,体质量 220 ~ 280 g,排除眼部疾患。采用随机数字表法将大鼠随机分为尿激酶玻璃体腔注射组、PBS 玻璃体腔注射组、尿激酶球后注射组和 PBS 球后注射组。动物的管理和使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》(2011 年版)。

### 1.2 药物注射和眼组织取材

注射前以复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳,大鼠腹

腔内注射质量分数 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)全身麻醉,尿激酶玻璃体腔注射组大鼠行 350 U(商品单位)尿激酶 4  $\mu\text{l}$ (辽宁天龙药业有限公司)玻璃体腔注射,注射在显微镜视野下进行,用 10  $\mu\text{l}$  微量加样器从大鼠右眼角巩膜缘后约 1 mm 处进针,将尿激酶向玻璃体中央推注,勿损伤晶状体及视网膜。PBS 玻璃体注射组大鼠以相同的方式注入等容积的 PBS。注射后剔除玻璃体出血的大鼠。球后注射组大鼠分别球后注射 10  $\mu\text{l}$  的尿激酶(1000 U)或等容积的 PBS,即在显微镜下用 25  $\mu\text{l}$  微量加样器在右眼距下睑缘 2 mm 处进针注药,避开眼球和大血管。

药物注射后 24 h,大鼠玻璃体腔注射 4  $\mu\text{l}$  质量分数 0.5% 伊文思蓝(Evans blue, EB)(美国 Sigma 公司),4 h 后以质量分数 10% 水合氯醛过量麻醉处死大鼠,摘取右眼,完整取出玻璃体,置 2.0 ml Eppendorf 管内,密闭,真空干燥 12 h,研磨后注入 1.5 ml 甲酰胺(天津市光复精细化工研究所),60  $^{\circ}\text{C}$  下温浴振荡 48 h,萃取 EB。将提取液在离心半径为 7.5 cm 的离心机中 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下以 7000 r/min 离心 30 min,取 1 ml 上清液,用紫外分光光度计测定波长 620 nm 处吸光度(A)值。

### 1.3 甲酰胺-分光光度法测 EB 浓度

精密量取 EB,配置质量浓度为 0.10、1.00、2.00、3.00、4.00、6.67、13.33 mg/L 的甲酰胺 EB 溶液,在波长 620 nm 处测量各浓度溶液的 A 值。重复配制并测量 5 次,配制时 EB 和甲酰胺均取各自同一瓶试剂,用同一台分光光度计检测,并由同一人完成操作。对数据统计分析可知:在 0.10 ~ 13.33 mg/L 质量浓度范围

内,EB 在甲酰胺中的含量与其 A 值呈线性相关(图 1),回归方程为  $Y=0.073X+0.007$  ( $R^2=0.999$ )。可依回归方程计算 EB 甲酰胺溶液的质量浓度。

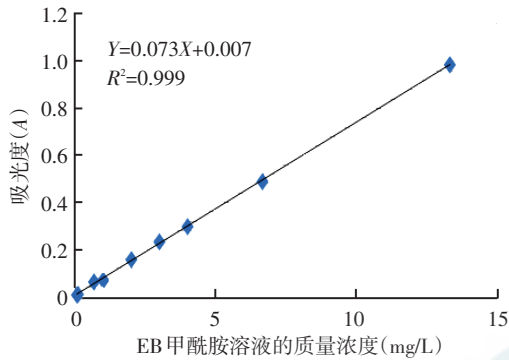


图 1 EB 在甲酰胺中的含量与其 A 值的标准曲线 EB:伊文思蓝

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态性分布,以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组单因素干预多水平实验设计,尿激酶玻璃体腔注射组、PBS 玻璃体腔注射、尿激酶球后注射组和 PBS 球后注射组大鼠玻璃体中 EB 质量浓度差异的总体比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Bonferroni 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 药物注射后各组大鼠玻璃体腔颜色的变化

大鼠玻璃体腔注射 EB 后 4 h,尿激酶玻璃体注射组大鼠右眼玻璃体呈淡蓝色,眼科手术显微镜下观察经角膜、晶状体和玻璃体多可透见视网膜血管,而 PBS 玻璃体腔注射组和 PBS 球后注射组大鼠右眼玻璃体呈深蓝色,不可透见视网膜血管,尿激酶球后注射组右眼玻璃体颜色最淡(图 2)。

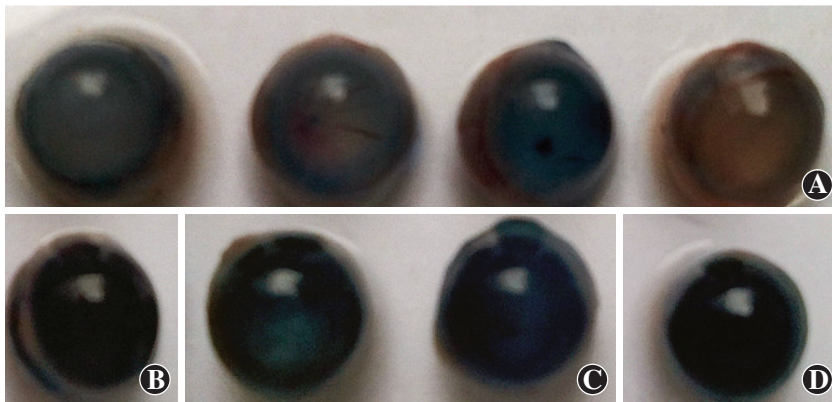


图 2 各组大鼠 EB 注射后 4 h 玻璃体颜色的比较 A:尿激酶玻璃体腔注射组 B:PBS 玻璃体腔注射组 C:尿激酶球后注射组 D:PBS 球后注射组

### 2.2 大鼠玻璃体中 EB 甲酰胺提取液 A 值和质量浓度

甲酰胺-分光光度法测得 4 个组大鼠玻璃体中 EB 甲酰胺提取液的 A 值和质量浓度,已知成年大鼠玻璃体腔的体积为  $(13.36\pm 0.64) \mu\text{l}^{[5]}$ ,依据 EB 的甲酰胺提取液质量浓度得到的 4 个组大鼠玻璃体内 EB 的质量浓度见表 1。各组大鼠玻璃体内 EB 质量浓度,差异有统计学意义 ( $F=100.406, P<0.01$ ),其中尿激酶玻璃体腔注射组大鼠玻璃体内 EB 质量浓度最低,与 PBS 玻璃体腔注射组、尿激酶球后注射组、PBS 球后注射组比较,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ );PBS 玻璃体腔注射组大鼠玻璃体中 EB 质量浓度高于 PBS 球后注射组,但差异无统计学意义 ( $P=1.00$ );尿激酶球后注射组大鼠玻璃体 EB 质量浓度高于尿激酶玻璃体腔注射组,而低于 PBS 球后注射组和尿激酶球后注射组,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。

表 1 各组大鼠玻璃体内 EB 甲酰胺提取液 A 值和质量浓度及大鼠玻璃体内 EB 质量浓度的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别          | 眼数 | EB 甲酰胺提取液 (A 值) | EB 甲酰胺提取液 质量浓度 (mg/L) | 玻璃体腔 EB 的质量浓度 (g/L)       |
|-------------|----|-----------------|-----------------------|---------------------------|
| 尿激酶玻璃体腔注射组  | 15 | 0.181±0.008     | 2.374±0.122           | 0.266±0.014               |
| PBS 玻璃体腔注射组 | 15 | 0.450±0.017     | 6.032±0.236           | 0.667±0.026 <sup>ab</sup> |
| 尿激酶球后注射组    | 15 | 0.330±0.009     | 4.415±0.136           | 0.496±0.015 <sup>a</sup>  |
| PBS 球后注射组   | 15 | 0.436±0.012     | 5.852±0.157           | 0.657±0.017 <sup>ab</sup> |
| F           | -  | -               | -                     | 100.406                   |
| P           | -  | -               | -                     | <0.01                     |

注:与尿激酶玻璃体腔注射组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与尿激酶球后注射组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验) EB:伊文思蓝;-:未进行统计学处理

## 3 讨论

视网膜血管阻塞性疾病是致盲眼病,组织病理学研究证实其存在视网膜血栓<sup>[6]</sup>,近期超选择性眼动脉介入溶栓治疗视网膜中央动脉阻塞的应用报道较多,效果明确,但可出现心脑血管疾病并发症和治疗后出血倾向,因此治疗的安全性成为临床普及该方法的主要问题。临床上小剂量局部使用溶栓药物可以安全地达到血栓溶解和血管再通的目的,是视网膜血管阻塞性疾病的理想疗法。球后注射和玻璃体腔注射均是眼科常用的给药途径,严格按照无菌操作流程操作可避免眼内感染等并发症<sup>[7]</sup>。尿激酶是临床常用的溶栓药物,动物实验研究已证实了其小剂量玻璃体腔注射的安全性<sup>[4]</sup>。EB 是稳定的四钠重氮示踪染料,

常用于各种生物膜屏障的定量检测<sup>[8-9]</sup>, 甲酰胺-分光光度法测量组织 EB 浓度的方法准确可靠且简便易行<sup>[10]</sup>。上述技术和方法是本研究选择方法学的基础。

BRB 由视网膜毛细血管内皮细胞紧密连接(内屏障)及视网膜色素上皮层细胞间紧密连接(外屏障)组成,可有效地控制神经视网膜及玻璃体与血液循环间的物质运输<sup>[11-12]</sup>。BRB 通透性包括内向通透性和外向通透性,前者指物质透过 BRB 进入神经视网膜和玻璃体,后者是指物质从玻璃体或神经视网膜进入视网膜血管或脉络膜。以往学者通过观察血液中 EB 向神经视网膜和玻璃体腔中渗透研究 BRB 内向通透性<sup>[13-14]</sup>,本研究采用玻璃体腔内注射 EB,观察大鼠玻璃体腔内 EB 的外向通透性。

EB 的渗出途径分为 4 种:(1)玻璃体腔-内界膜-视网膜内 5 层-血-视网膜内屏障-视网膜血管。(2)玻璃体腔-内界膜-神经视网膜-血-视网膜外屏障-脉络膜血管壁-脉络膜血管。(3)玻璃体腔-内界膜-神经视网膜-血-视网膜外屏障-脉络膜-巩膜-眼球外。(4)其他:针孔溢出和眼前节循环系统<sup>[15]</sup>。Dureau 等<sup>[5]</sup>证实,大鼠玻璃体腔内注射量在 3~5  $\mu\text{l}$  时损失少,可重复操作。尿激酶的玻璃体液化作用微弱,且对胶原纤维致密的赤道前部玻璃体,特别是与眼球壁附着最牢固的基底部玻璃体几乎无作用<sup>[16-17]</sup>。所以依据实验对照设计,可认为第 4 条途径对本实验影响甚微,前 3 种途径必须通过血-视网膜内屏障和/或视网膜外屏障。本研究发现,大鼠眼局部注射尿激酶后,玻璃体腔内物质透过内屏障经 BRB 外向通透性增加。近期的研究认为,紧密连接复合体中 occludin 蛋白可以反映组织的屏障功能<sup>[18]</sup>,马红婕等<sup>[3]</sup>研究发现,occludin 蛋白表达减弱趋势与 BRB 的损坏程度相平行。刘倩等<sup>[4]</sup>研究发现,大鼠玻璃体腔注射尿激酶可抑制视网膜毛细血管内皮细胞间 occludin 蛋白的表达,与本研究结论一致。

本研究结果证实,玻璃体腔注射尿激酶增加大鼠 BRB 的外向通透性,使玻璃体内尿激酶进入视网膜血管而发挥溶栓作用,这个结果为玻璃体腔注射尿激酶治疗视网膜血管阻塞性疾病提供了这个理论支持,但其有效性尚需进一步利用动物模型进行观察。玻璃体腔注射 EB 是 BRB 外向通透性检测的可靠方法。

## 参考文献

[1] Richard G, Lerche RC, Knosp V, et al. Treatment of retinal artery occlusion with local fibrinolysis using recombinant tissue plasminogen activator[J]. *Ophthalmology*, 1999, 106(4): 768-773. doi: org/10.1016/S0161-6420(99)90165-3.

[2] 姚勇,沈晓文,吴又凯,等.超选插管灌注溶栓药治疗视网膜中央动脉阻塞[J].*中华眼底病杂志*,2005,21(1):16-19.

[3] 马红婕,罗燕,王敏,等.紧密连接蛋白及神经胶质原纤维酸性蛋白在糖尿病大鼠视网膜的表达变化及其与血-视网膜屏障功能的关系[J].*中华眼科杂志*,2007,43(5):397-401. doi:10.3760/j.issn.0412-4081.2007.05.004.

[4] 刘倩,高永峰.玻璃体腔注射尿激酶对大鼠视网膜血管内皮细胞间 Occludin 蛋白含量的影响[J].*中华眼底病杂志*,2011,27(4):383-383. doi:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2011.04.023.

[5] Dureau P, Bonnel S, Menasche M, et al. Quantitative analysis of intravitreal injections in the rat[J]. *Curr Eye Res*,2001,22(1):74-77.

[6] Haymore JG, Mejico LJ. Retinal vascular occlusion syndromes[J]. *Int Ophthalmol Clin*,2009,49(3):63-79. doi:10.1097/HIO.0b013e3181a8db88.

[7] 乔宝笛,戴涛,帖彪,等.曲安奈德玻璃体腔注射联合黄斑格栅样光凝治疗黄斑水肿的临床研究[J].*中华实验眼科杂志*,2012,30(8):734-738. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.08.013.

[8] Manaenko A, Chen H, Kammer J, et al. Comparison Evans blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model [J]. *J Neurosci Methods*,2011,195(2):206-210. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.12.013.

[9] Qaum T, Xu Q, Joussen AM, et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2001,42(10):2408-2413.

[10] Hosoya K, Tomi M. Advances in the cell biology of transport via the inner blood-retinal barrier: establishment of cell lines and transport functions[J]. *Biol Pharm Bull*,2005,28(1):1-8. doi:http://dx.doi.org/10.1248/bpb.28.1.

[11] Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2001,42(3):789-794.

[12] Constable PA, Lawrenson JG. Glial cell factors and the outer blood retinal barrier[J]. *Ophthalmic Physiol Opt*,2009,29(5):557-564. doi:10.1111/j.1475-1313.2009.00671.x.

[13] Wang L, Li Q, Du J. et al. Advanced glycation end products induce moesin phosphorylation in murine retinal endothelium [J]. *Acta Diabetol*,2012,49(1):47-55. doi:10.1007/s00592-011-0267-z.

[14] 许庆文.伊凡思蓝在测定血视网膜屏障破坏中的作用[J].*中华眼底病杂志*,2001,17(3):221-223.

[15] Sosula L, Beaumont P, Jonson KM, et al. Quantitative ultrastructure of capillaries in the rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,1972,11(11):916-925.

[16] 王惠良,张哲,许迅,等.纤维蛋白溶解酶联合透明质酸酶诱发玻璃体后脱离实验研究[J].*眼科研究*,2002,20(5):407-410. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2002.05.008.

[17] Men G, Peyman GA, Genaidy M, et al. The role of recombinant lysine-plasminogen and recombinant urokinase and sulfur hexafluoride combination in inducing posterior vitreous detachment [J]. *Retina*,2004,24(2):199-209.

[18] Takenaga Y, Takagi N, Murotomi K, et al. Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*,2009,29:1099-1108. doi:10.1038/sj.jcbfm.10990930.

(收稿日期:2014-06-08)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)