

兔视网膜倍频 532nm 激光损伤组织形态学研究

郭锐¹, 申龙树², 王育良¹

基金项目:江苏省中医药局科研基金资助课题(No. LZ11188)
作者单位:¹(210029)中国江苏省南京市,南京中医药大学附属江苏省中医院眼科;²(210029)中国江苏省南京市,江苏省中医院病理科
作者简介:郭锐,男,南京中医药大学第一临床医学院讲师,研究方向:眼视光学。
通讯作者:郭锐. swaying_leaf@163.com
收稿日期:2013-09-04 **修回日期:**2013-11-04

Histopathologic study on tissue of rabbit retina damaged by frequency-doubled 532nm laser

Rui Guo¹, Long-Shu Shen², Yu-Liang Wang¹

Foundation item: Administration of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu Province Research Program(No. LZ11188)

¹Department of Ophthalmology, Jiangsu Province Hospital of TCM, Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ²Department of Pathology, Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Rui Guo. Department of Ophthalmology, Jiangsu Province Hospital of TCM, Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. swaying_leaf@163.com

Received:2013-09-04 Accepted:2013-11-04

Abstract

• **AIM:** To observe histopathology changes of spot regional in chinchilla rabbit's retina at different periods after frequency-doubled 532nm laser irradiation.

• **METHODS:** Twenty healthy rabbits were randomly divided into two groups: 16 in group A (laser group) and 4 in group B (normal control group). According to different time after laser photocoagulation rabbits were divided into four subgroups: 1d, 1 week, 2 weeks, 1month, group A with 4 for each subgroup; group B with 1 for each subgroup. To observe the histopathologic changes we used fundus photograph, light microscope, electron microscope and spot diameter calculating in different time points.

• **RESULTS:** (1) Fundus photography: the spot region changed from thick white edema appearance on 1d after the surgery to melanoma attachment by 1 month; (2) Light microscopy: the main damage spot region was concentrated in the outer retina after photocoagulation. Photoreceptor cell appeared necrosis and apoptosis. With the passage of time, glial cells, pigment cells filled injury regional, and fibrous proliferation was formed;

(3) Electron microscope: after photocoagulation, structure of membranous disc blurred and arranged in disorder; mitochondrial cristae became vague, fracture or even disappear; obvious vacuolization appeared. It began to appear apoptosis after 1 week, and gradually the fibroblast proliferation appeared; (4) Spot size: the spot size was the maximum at 1d, then gradually became smaller, spot size down to 85% at one-week time, 80% at 2-week time, and 79% at one-month time.

• **CONCLUSION:** Frequency-doubled 532nm laser irradiation of pigmented macular, spot reaction is most obvious at 1d and stabilized at about 2 weeks.

• **KEYWORDS:** frequency-doubled 532nm laser; laser-induced retinal damage; histopathology

Citation: Guo R, Shen LS, Wang YL. Histopathologic study on tissue of rabbit retina damaged by frequency-doubled 532nm laser. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(12):2385-2389

摘要

目的:通过倍频 532nm 激光照射青紫蓝兔眼底,观察不同时期视网膜光斑区域组织形态学改变。

方法:健康青紫蓝兔 20 只随机分为 A 组 16 只(激光损伤组)和 B 组 4 只(正常对照组),使用倍频 532nm 激光照射 A 组兔视网膜(光斑大小 200 μ m,脉宽 0.05s,光斑 Tso III),B 组未行光凝。按激光光凝术后不同时相点:1d;1, 2wk;1mo 观察眼底照片的改变、光镜下组织形态学改变、电镜下超微结构的改变及光斑直径在不同时相点的变化。

结果:(1)眼底照相:随时间推移,光斑由术后 1d 时的浓白色水肿外观变为术后 1mo 时的黑色素附着区域;(2)光镜观察:光凝后光斑区域主要损伤集中在视网膜外层,光感受器细胞坏死、凋亡,随时间推移,胶质细胞、色素细胞充填损伤区域,形成纤维增殖;(3)电镜观察:光凝后出现明显的视细胞外节膜盘结构模糊,排列紊乱,线粒体嵴模糊、断裂甚至消失,明显的空泡样变,术后 1wk 开始即出现细胞染色质集边等凋亡改变,后期胶原纤维增殖;(4)光斑大小:光斑大小从术后 1d 时的最大值随时间推移,逐渐变小,术后 1wk 时光斑大小缩小 15%,术后 2wk 时光斑大小缩小 20%,术后 1mo 时光斑大小缩小 21%。

结论:倍频 532nm 激光照射青紫蓝兔黄斑区,光斑反应术后 1d 时最为明显,至术后 2wk 左右基本稳定。

关键词:倍频 532nm 激光;视网膜激光损伤;组织病理学
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.12.06

引用:郭锐,申龙树,王育良.兔视网膜倍频 532nm 激光损伤组织形态学研究.国际眼科杂志 2013;13(12):2385-2389

0 引言

在眼科眼底病治疗中,氩激光(波长为514nm)应用最为普遍。倍频532nm激光(Nd:YAG激光)是一种较新的眼科激光器,其波长与氩激光接近,工作物质是掺钕钇铝石榴石,将倍频晶体插入它的谐振腔内,即可将它原来1064nm的近红外光转变为532nm的绿光连续输出,因其光斑均匀清晰,输出性能稳定,操作简便,故目前临床上日益广泛地应用于多种眼底病的治疗。

以往对于倍频532nm激光短脉冲损伤的研究有限,很多文献报导了氩激光等其他波长短脉冲条件下的视网膜损伤情况^[1-3],而目前倍频532nm激光已广泛用于眼底视网膜光凝术中,迫切需对其损伤防护进行基础研究。既往的实验动物有用大鼠及新西兰大白兔的^[2,4],均与人视网膜构造有较大差异,本研究使用青紫蓝兔,其在视网膜色素及视功能区分布上与人有较大相似之处,更有说服力,现将研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取健康、成年青紫蓝兔20只40眼,体质量2.5~3.0kg,雌雄各半,由南京医科大学动物实验中心提供(动物合格证号:0003693,实验许可证号:SYXK[苏2013-0016])。实验前双眼前节和眼底检查均正常。该实验通过了南京中医药大学动物伦理审查。

1.2 方法

1.2.1 分组方法 实验灰兔20只随机分为两组:A组16只(激光损伤组)、B组4只(正常对照组)。A组灰兔按激光后不同时相1d;1,2wk;1mo分4组,每亚组各4只(3只用于光镜,1只用于电镜),B组灰兔各时相点1只。

1.2.2 视网膜激光损伤模型制作 复方托吡卡胺滴眼液(中国大冢制药有限公司,日本)双眼散瞳,待瞳孔散大用20%乌拉坦(上海恒远生物科技有限公司,中国)耳缘静脉注射麻醉,5min后,盐酸奥布卡因滴眼液(中国大冢制药有限公司,日本)点眼表面麻醉后安放三面镜,倍频532nm激光照射兔眼黄斑区,采用倍频532nm激光器(Lumenis,美国)通过裂隙灯显微镜(Topcon SL-8Z,日本)照射青紫蓝兔视网膜视盘正下方1个视盘直径,10个/排,共7排,点点间距为1个光斑直径,激光曝光时间50ms,激光光斑直径:200 μ m,脉冲数:70个/眼,光斑反应为Tso III级^[5],四个顶点处光斑达Tso IV级以示标记。

1.2.3 标本制作方法 分别于各个时相点:1d;1,2wk;1mo在裂隙灯下行眼底检查,眼底照相(Topcon SL-D7,日本),观察各时期靶区部位视网膜的变化,并分别于各时相点空气栓塞处死动物后,行双眼球摘除,将取出的眼球置于冰台上,用眼科显微器械沿角膜缘剪开眼球,去除眼前节,刮除玻璃体,暴露视网膜,取后极部眼球壁,按光凝标记进行修剪,右侧两角进行去角标记(图1)。

1.2.4 光镜标本制作 将取材后制作好的标本放入40g/L甲醛中固定48h。取固定好的标本沿去角标记横向切片取材(RM2235 LEICA,德国),石蜡包埋(Tissue-Tek TEL SAKURA,日本),每隔40 μ m取一切片,连续取3个切面,其中每个切面相隔5 μ m连续切两片(一张用于光镜观察,一张用于TUNEL检查),常规HE染色,光学显微镜下观察。

1.2.5 光学显微镜观察 主要观察指标为视网膜光斑直径,分别以100 \times 放大倍率分别进行图片拍摄,拍摄时选

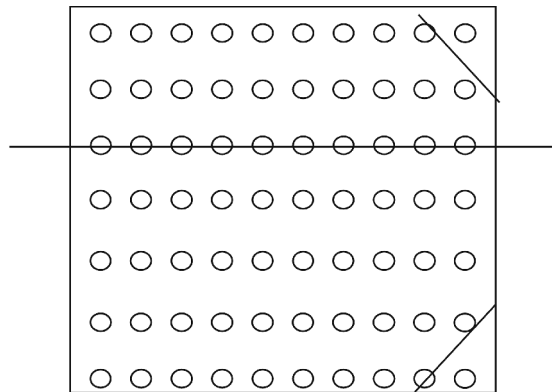


图1 标本制作模式图。

取包含光斑最大直径的切片,每个切片取3个直径较大光斑视野进行光斑直径测定。采用Image-pro Plus 6.0软件(Version 6.0.0.260, Media Cybernetics Inc.)进行图像分析,根据RPE改变和视网膜各层细胞变化确定每个激光损伤灶的边界,取外核层(ONL)水平光凝斑的直径,由同一操作者进行标定,软件自动得出结果。

1.2.6 透射电镜观察

1.2.6.1 样品制备程序 将取材后制作好的标本,切成1mm \times 0.5mm矩形组织块,50g/L戊二醛4 $^{\circ}$ C前固定,磷酸缓冲液漂洗4次,10g/L锇酸后固定,再次漂洗2次,20g/L醋酸铀水溶液块染,脱水、浸渍后包埋,最后于恒温箱中聚合36h。

1.2.6.2 半薄定位方法 (1)用ULTRACUTR切片机(LEICA,德国)进行半薄切片或超薄切片,常规手工制做硬质玻璃刀,切出2 μ m厚的切片,在处理干净的载玻片上滴一滴水(载玻片可先涂抹一层蛋白甘油处理),用尖镊子夹着切下的半薄切片置于水滴上,由于水滴的表面张力作用,切片会自然展开铺平,用热吹风机烘干,切片将牢固地贴在载玻片上。(2)用NaOH的乙醇饱和溶液脱半薄切片的树脂,浸泡3min,使组织周围的树脂脱落,组织切片颜色变浅,切片仍平展附着于载玻片上。要严格控制脱树脂时间。它会直接影响切片的HE染色效果。(3)用NaOH脱树脂,HE染色前必须进行脱碱,防止切片退色。在100%,90%,70%,30%乙醇中脱NaOH各5min;用15g/L HCl水溶液清洗10min;HE常规染色;苏木素20min,盐酸乙醇分化30 $^{\circ}$ C 15min,伊红染色10min。通过半薄定位选取包含光斑的超薄切片,醋酸双氧铀,枸橼酸铅染色;电镜观察。

统计学分析:采用SPSS 13.0统计软件,所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,光斑大小同组不同时相点间两两比较采用ANOVA LSD检验,以 $P<0.05$ 为差异显著性判定标准。

2 结果

2.1 眼底照相 正常灰兔眼底呈红褐色,视神经横向行走,视盘下方可见局灶色素较为均匀区域。光凝术后1d:光斑呈浓白色外观,外围两个淡灰色圆环(图2A)。光凝术后1wk,光斑周围水肿基本消退,光斑颜色更为致密(图2B)。光凝术后2wk,光斑区域色素附着(图2C)。光凝术后1mo,光斑区域色素附着较2wk更为明显(图2D)。

2.2 光镜下组织学改变 正常色素视网膜各时期各层细胞完整、结构清晰。光凝后1d反应:激光斑处视网膜

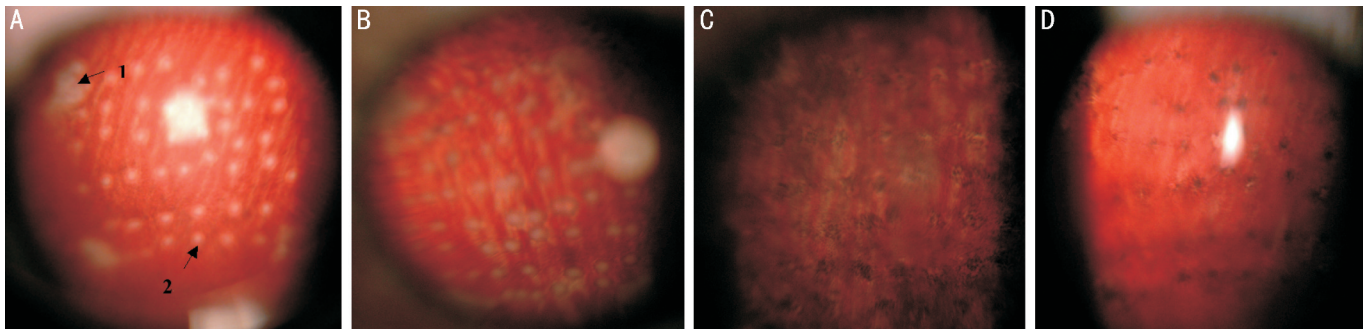


图2 眼底照相 A:光凝术后1d,箭头1为四周标记光斑,箭头2为激光光凝斑之一;B:光凝术后1wk;C:光凝术后2wk;D:光凝术后1mo。

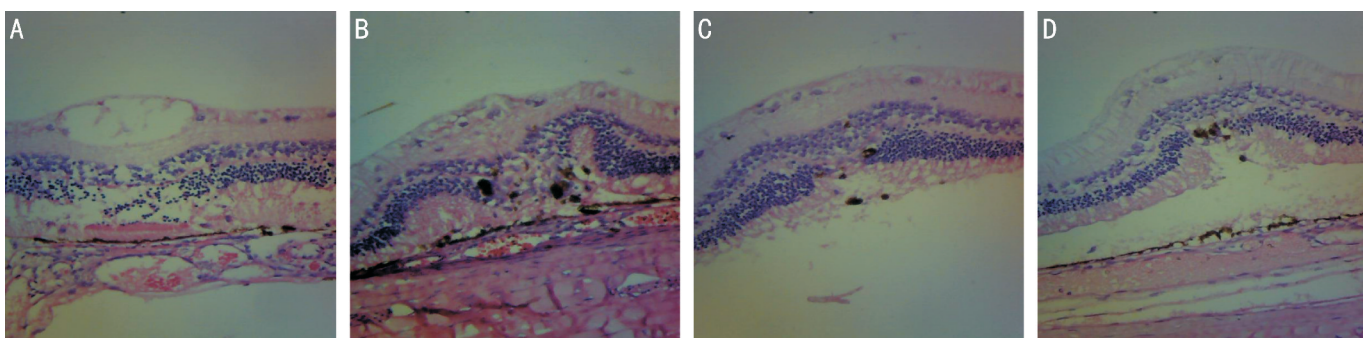


图3 光镜下组织学改变(HE染色,10×10) A:光凝后1d;B:光凝后1wk;C:光凝后2wk;D:光凝后1mo。

表1 不同时相点激光损伤组光斑大小

	$\bar{x} \pm s$			
	光凝后 1d	光凝后 1wk	光凝后 2wk	光凝后 1mo
光斑大小(μm)	163.33±24.98	139.95±29.75	130.18±37.48	128.54±35.69
百分比(%) ^{&}	100	85.7	79.7	78.7

& :以各时相点光斑大小占1d光斑大小的百分比表示。

全层损伤,表现为近全层视网膜水肿,光感受器细胞的外节断裂破碎,排列紊乱,内外核层密度降低,部分呈凝固性坏死,内外丛状层水肿变性。RPE细胞分解破碎,空泡可见,RPE损伤部位的表面可见少量巨噬细胞、嗜中性白细胞及淋巴细胞浸润,Bruch膜被破坏;脉络膜血管扩张充血(图3A)。光凝后1wk反应:光斑大小较前缩小,激光斑视网膜水肿显著减轻,视网膜各层结构欠清,内层水肿消失,细胞增生,内核层细胞增生、细胞丰富,密集、核深染,外核层细胞基本消失,胶质细胞及色素细胞增生,充填外核层,内外网状层细胞水肿显著减轻,局部可见正常结构形成,RPE细胞增生,损伤部位的表面未见炎性细胞浸润;脉络膜血管扩张充血程度减轻(图3B)。光凝后2wk反应:与1wk时表现类似,光斑大小基本同前。激光斑视网膜水肿程度较前1wk减退,视网膜内层细胞基本修复,内核层细胞增生、密集、核深染,外核层细胞基本消失,纤维结缔组织增生,可见色素沉着,内外网状层未见水肿。RPE细胞增生,可见部分区域结构恢复正常(图3C)。光凝后1mo反应:光斑大小基本同前。激光斑部位视网膜水肿消失,各层结构层次不清,呈现显著的纤维增殖,杆锥细胞层和外核层细胞萎缩甚至消失,胶原纤维增多,RPE大部分区域结构恢复正常,小部分区域细胞数量减少呈萎缩性改变,少量光斑可见微小CNV(脉络膜新生血管)穿过Bruch膜继续向神经上皮层生长(图3D)。

2.3 光镜下形态学指标测量 不同时相点不同分组光斑大小数值行K-S检验,基本符合正态分布($P=0.888$)。

各时相点组间比较:1d;1,2wk;1mo 激光光斑的大小均无显著性差异($F=2.209, P=0.106$)。但两两比较发现,光凝后1d光斑大小显著大于光凝后2wk($P=0.037$)和光凝后1mo($P=0.029$),其余各组间光斑大小无显著性差异(表1)。总体趋势:从光斑大小结果中可以看出,光斑大小从光凝后1d时的最大值随时间推移,逐渐变小,光凝后1wk时光斑大小缩小15%,光凝后2wk时光斑大小缩小20%,光凝后1mo时光斑大小缩小21%,光凝后2wk基本稳定在标准光斑大小。

2.4 电镜结果 正常对照组:色素上皮细胞内细胞器形态正常,结构清晰,视细胞外节膜盘结构清晰,排列整齐,内节线粒体嵴排列整齐(图4A)。光凝后1d:视细胞层与RPE分离,色素细胞异常排列,可见大量空泡,线粒体损伤成空泡化,内质网扩张,视细胞外节膜盘结构模糊,排列紊乱,内节线粒体嵴模糊、断裂甚至消失(图4B)。光凝后1wk:色素上皮细胞内见大量空泡,线粒体损伤成空泡化,内质网扩张,视细胞外节膜盘结构模糊,排列紊乱,内节细胞染色质集边,线粒体嵴模糊、断裂甚至消失(图4C)。光凝后2wk:细胞排列疏松,色素上皮细胞内见大量空泡,线粒体损伤成空泡化,内质网扩张更为明显,视细胞外节膜盘结构模糊,排列紊乱,内节线粒体嵴模糊、断裂甚至消失(图4D)。光凝后1mo:细胞排列杂乱,疏松,色素上皮细胞内见空泡,线粒体损伤成空泡化,视细胞外节膜盘结构模糊,排列紊乱,内节线粒体嵴模糊、断裂甚至消失(图4E)。

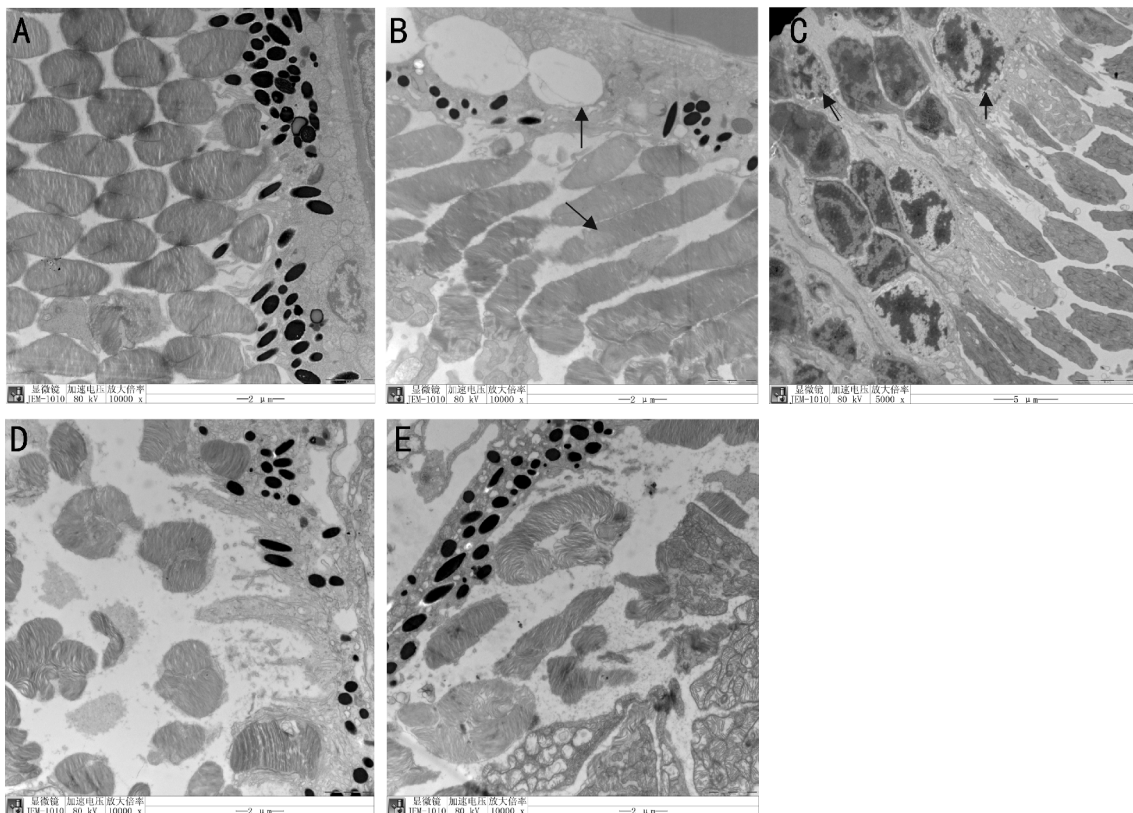


图4 电镜照片 A:正常对照组(10000 \times);B:光凝后1d组(10000 \times);C:光凝后1wk组(5000 \times);D:光凝后2wk组(10000 \times);E:光凝后1mo组(10000 \times)。

3 讨论

眼科临床上激光的使用以眼底激光尤为多见,且时有激光意外损伤事故的发生^[6],关注视网膜激光损伤的研究越来越多,因为其已成为眼科界亟待解决的课题之一。同时,无论何种激光,其副作用是在视网膜疾病治疗的同时给光斑周围的健康区域也会带来进行性损伤,如视网膜瘢痕形成、视野缺损或夜视力下降等,有报道显示激光后2a内,光斑大小扩大一半^[7]。视网膜激光损伤体现在激光照射区域的坏死及光斑周围区域因热效应波及而造成的损伤^[7-9]。如何发挥其治疗作用而降低其副作用,也是眼科工作者探索的课题,迫切需要对其损伤机制及防护进行研究,而研究的首要问题是要制作合适的动物模型。

本研究造模选用青紫蓝兔,主要考虑其视网膜富含色素,与鼠、新西兰白兔相比更接近于人类视网膜结构,且有类似于人类的黄斑结构,兔眼底视乳头位置偏上,类似人类黄斑区呈横带状位于视乳头下方,只是其黄斑区视锥细胞密度偏低,故视功能偏低,这也被腾岩等^[10]通过多焦ERG所证实。不同的激光参数设置会产生不同的激光反应^[11],但青紫蓝兔视网膜色素不均,个体差异较大,故本研究造模时,激光参数设置中激光能量并未恒定,而是以光斑反应为标准进行研究,更接近于临床实际操作。

Tso^[5]结合临床及组织病理学改变将连续波激光氩激光视网膜光凝斑分为4级,本模型使用的即为通常临床使用的Ⅲ级光斑,更具广泛应用价值。视网膜光凝的治疗作用机制主要为可直接通过热效应封闭新生血管供养支,使其血流中断,还可通过以下可能途径间接使视网膜新生血管萎缩^[12]:光凝破坏了部分视网膜组织,使缺氧的视网膜

释放的新生血管因子减少;光凝使外层视网膜萎缩、变薄,结果使脉络膜氧易于进入内层视网膜,从而改善内层视网膜的缺氧状态;由于外层血-视网膜屏障破坏,促进了新生血管因子从视网膜向脉络膜扩散;视网膜光凝后,一部分视网膜被破坏,视网膜面积减少,因此剩余视网膜营养状态得以改善。而Lee等^[13]认为光凝后因破坏了脉络膜血管层而降低了其作用。

然而,在治疗同时早期光凝产生的热效应导致Bruch膜破裂,脉络膜组织充血、血栓形成,蛋白质变性凝固,视网膜内层结构损伤,而光化学损伤所释放的毒性物质向周围扩散导致迟发性感觉神经细胞死亡;随时间推移,治疗后期,脉络膜视网膜瘢痕逐渐扩大,导致部分患者术后出现即刻或进展性视功能损害。本研究之兔视网膜倍频532nm激光损伤模型在不同时相点光镜下的组织学表现基本符合其早期变化。但晚期改变由于实验周期有限,取材后固定过程中的组织分离等原因,尚无法证实。电镜超微结构的组织学观察表明,除了光凝区域外,光斑周围区域亦存在细胞损伤,证实了视网膜光凝存在副作用。

本实验所致的Ⅲ级光凝斑反应主要影响视网膜外层:光凝后1d组织学改变为组织水肿,RPE和内外核层部分细胞坏死或凋亡,炎症细胞的浸润,光凝后1wk坏死细胞和细胞碎屑主要由色素上皮细胞和巨噬细胞吞噬清除,留下视网膜的缺损主要由胶质细胞增生修复;光凝后2wk表现RPE细胞增殖,并向视网膜内伸展;胶质细胞到达视网膜下间隙,与成纤维细胞、增殖的RPE细胞形成视网膜脉络膜瘢痕,整个视网膜变薄萎缩。光凝后1mo各层结构不清,纤维增殖明显,CNV形成。光斑直径测量结果与组

织学观察的形态改变基本一致,说明利用光斑直径作为视网膜激光损伤程度的形态学定量指标是切实可行的。电镜超微结构的组织学观察表明,除了光凝区域外,光斑周围区域亦存在细胞损伤,证实了视网膜光凝存在副作用。

本研究中,各时间点差异的总体检验无差异而两两比较时出现差异,考虑样本量相对较少所致。本研究使用200 μm 光斑,经接触镜及兔眼光学系统的放大率0.66^[14]后,在视网膜平面光斑大小为133 μm 。研究表明,视网膜激光损伤在24h内为一逐渐加重的过程,其后光斑大小逐渐缩小^[4,15,16]。本研究中,未观察光凝后1d内的组织形态学改变,1d为光斑最大值,随时间推移,逐渐变小,光凝后1wk时光斑大小缩小15%,光凝后2wk时光斑大小缩小20%,光凝后1mo时光斑大小缩小21%,光凝后2wk基本稳定在视网膜平面标准光斑大小,与其它相关研究结果相似。使用倍频532nm激光照射青紫蓝兔黄斑区,成功建立兔视网膜倍频532nm激光损伤模型。视网膜光斑大小光凝后1d时最大,随时间推移逐渐缩小,光凝后2wk左右稳定在标准光斑大小。

参考文献

- 1 马效工,何守志,熊丽霞,等.激光视网膜损伤前后视网膜电图改变的实验研究.眼科新进展2002;22(3):176-178
- 2 田丽珍,郭承伟,王静波.滋阴降火法防治激光性视网膜损伤的实验研究.山东医药2009;49(51):45-46
- 3 Naveh N, Weissman C. Corticosteroid treatment of laser retinal damage affects prostaglandin E2 response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(1):9-13
- 4 韩丽娜,顾瑛,刘凡光,等.532nm波段连续激光对视网膜和脉络膜

生物学作用的观察.激光生物学报2005;14(1):56-59

- 5 Tso MOM. *Retinal Diseases*. Philadelphia: JB Lippincott Company. 1988:246-262
- 6 Fowler BJ. Accidental industrial laser burn of macula. *Ann Ophthalmol* 1983;15(5):481-483
- 7 Brancato R, Pece A, Avanza A, et al. Photocoagulation scar expansion after laser therapy for choroidal neovascularization in degenerative myopia. *Retina* 1990;10(4):239-243
- 8 Dastgheib K, Bressler SB, Green WR. Clinicopathologic correlation of laser lesion expansion after treatment of choroidal neovascularization. *Retina* 1993;13(4):345-352
- 9 Rutledge BK, Wallow IH, Poulsen GL. Subpigment epithelial membranes after photocoagulation for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 1993;111(5):608-613
- 10 腾岩,宋晗,郑建秋,等.正常有色素家兔眼的视网膜功能研究.中国实验动物学报2007;15(3):198-202
- 11 Jain A, Blumenkranz MS, Paulus Y, et al. Effect of pulse duration on size and character of the lesion in retinal photocoagulation. *Arch Ophthalmol* 2008;126(1):78-85
- 12 李绍珍.眼科手术学.第2版.北京:人民卫生出版社1997:949
- 13 Lee CJ, Smith JH, Kang-Mieler JJ, et al. Decreased circulation in the feline choriocapillaris underlying retinal photocoagulation lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3398-3403
- 14 Wolbarsht ML. *Laser Applications to Medicine and Biology*. New York: Plenum Press 1991:277-361
- 15 陈虹霞,顾瑛,刘凡光,等.倍频Nd:YAG激光对兔眼视网膜损伤作用的观察.中国激光医学杂志2005;14(2):69-73
- 16 Paulus YM, Jain A, Gariano RF, et al. Healing of retinal photocoagulation lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(12):5540-5545