

文章编号: 1001-3806(2003)04-0285-03

DMTU 对激光视网膜损伤治疗作用的实验研究

陈 鹏¹ 单 清¹ 张 杰¹ 马 萍¹ 张翠萍² 姜严明¹ 钱焕文¹

(¹军事医学科学院放射医学研究所, 北京, 100850) (²军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津, 300050)

摘要: 二甲基硫脲(DMTU)是一种特异的自由基清除剂, 实验中, 建立了动物视网膜激光损伤模型, 观察了治疗组与对照组不同时间点视网膜的组织病理改变以及生化和分子生物学指标的变化。结果表明, DMTU 可以有效抑制感光细胞的脂质过氧化, 能明显减少损伤区域视网膜神经元的凋亡数目, 保护视网膜组织的结构和形态。

关键词: 视网膜; 激光损伤; 治疗; 二甲基硫脲; 凋亡

中图分类号: R779.1 **文献标识码:** A

Experimental research of protective effects of dimethylthiourea in the rabbit retina laser injury

Chen Peng¹, Shan Qing¹, Zhang Jie¹, Ma Ping¹, Zhang Cuiping², Jiang Yanming¹, Qian Huanwen¹

(¹Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850)

(²Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin, 300050)

Abstract Dimethylthiourea (DMTU) is an effective free radical scavenger. Through investigation of histopathological and biochemical changes, we have observed the effects of DMTU on rabbit retina in laser injury. The results show that photoreceptor cells die mainly of apoptosis in laser-induced retina degeneration and DMTU demonstrate the neuroprotective effect due to inhibition of lipid peroxidation.

Key words: retina; laser injury; therapy; dimethylthiourea; apoptosis

引 言

随着激光技术的不断发展和应用, 激光对人眼的损伤已成为医学、工业及军事等领域的一个不容忽视的问题。许多研究表明, 视网膜的光损伤是光照激发产生自由基, 引起组织发生过氧化的结果^[1]。在这个过程中, 细胞凋亡被认为是感光细胞丢失的最主要机制^[2]。本实验拟在激光照射前给予自由基清除剂二甲基硫脲(dimethylthiourea, DMTU), 评价其在视网膜激光损伤的疗效, 并探讨脂质过氧化和感光细胞凋亡在视网膜光损伤机制中的相互关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选用体重(2.5~3.0)kg 的北京青紫蓝灰兔, 由本院实验动物中心提供, 雌雄兼用。二甲基硫脲

(DMTU)由 Sigma 公司提供。

1.2 动物分组与模型制作

按随机方法将动物分成正常对照组(4只)、照射对照组与治疗组, 治疗组和照射对照组又分为照后即刻、4h、6h、12h、1d、3d、7d、14d 8 个时间点, 每个时相组 6 只动物。治疗组动物于照前 24h 和照前即刻两次兔腹腔注射 500mg/kg 体重的 DMTU(浓度 500mg/mL), 对照组腹腔注射相应体积的生理盐水。待动物充分散瞳麻醉后, 以调 Q 倍频 Nd:YAG 激光造损伤模型。激光器工作频率为 1 次/s, 在 TOPCON 眼底照相机实时观察下每眼均匀照射 100 次。

1.3 检测指标

各组动物于相应时相点处死, 快速摘除眼球, 作病理切片及超薄切片, 进行组织学和超微结构观察以及原位末端标记(TUNEL), 用于检测凋亡细胞。此外, 将取出的视网膜组织放入液氮中冻存或制成匀浆, 进行核酸凝胶电泳和丙二醛含量的测定。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验处理。

2 结 果

作者简介: 陈 鹏, 男, 1975 年 9 月出生。硕士。现从事激光眼损伤的效应与防护方面的研究。

收稿日期: 2002-07-30; 收到修改稿日期: 2003-01-12

2.1 组织病理学观察

2.1.1 光镜下改变 在伤后即刻,对照组可见局部视网膜全层连同脉络膜丘状隆起,但各层结构仍保持完整,视网膜下腔无积液,与治疗组相比无明显差别。伤后 4h~ 3d 对照组病灶处内界膜不完整,神经节细胞层有断裂,内网状层和内外核层排列紊乱,且细胞核固缩深染,内外节失去正常的秩序,长度变短;视网膜下腔积聚有棉絮状红染渗出物,RPE 层可见色素脱失,且与其下的巩膜分离。治疗组局部视网膜神经节细胞层和内界膜亦有断裂,但结构仍保持清晰,外节较长,视网膜下渗出少量,RPE 层完整,脉络膜毛细血管充血。7d~ 14d 后对照视网膜神经节细胞层呈空絮状,内外核层杂乱,不能区分;细胞染色大小不一,有细胞核碎裂散在分布,外节杂乱,色素层局部消失(见图 1a)。治疗组结构完整,下腔局部仅少量残余外节膜盘脱落物,色素上皮细胞增生分层(见图 1b)。

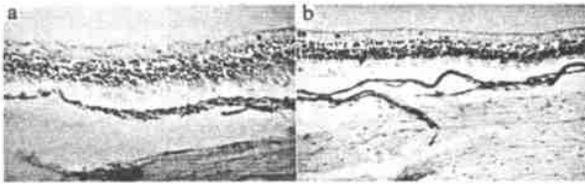


Fig. 1 Light micrographs of retinas from untreated (a) and treated (b) groups 7d after laser exposure(HE 200 \times)

2.1.2 电镜下观察 伤后可见感光细胞浆内线粒体肿胀空化,散乱呈圆泡状,嵴变短甚至消失,基质变淡,基质室内可见无定形絮状物沉积,粗面内质网池扩张离散,核糖体脱颗粒,外节明显肿胀,盘膜排列紊乱,RPE 微绒毛消失,溶酶体增加。外核层细胞染色质浓缩成电子密度高的新月状团块(见图 2)。内核层双极细胞核染色质较正常。

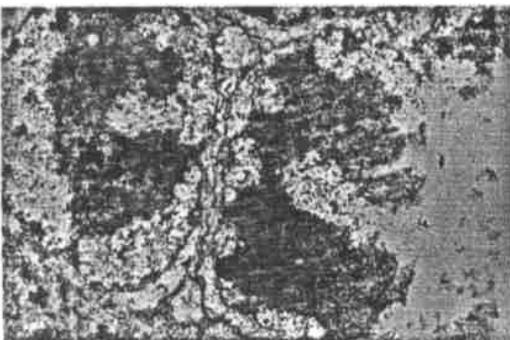


Fig. 2 The nuclei from the ONL condense in the crescent-form(TEM 10000 \times)

2.2 TUNEL 染色

TUNEL 结果表明,损伤后 6h, 1d 和 3d 组在视网膜各细胞层(节细胞、内核层和外核层)均可见

TUNEL 阳性的凋亡细胞,呈均匀淡染的棕黄色。其中 6h 组 TUNEL 阳性细胞呈散在分布,以内核层较多;1d 和 3d 组视网膜各层阳性细胞数目明显增多,外核层最多(见图 3a)。

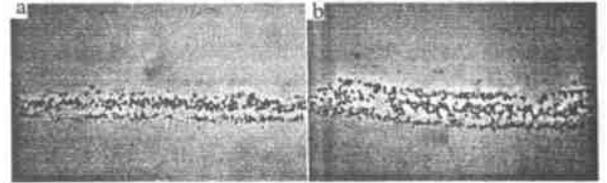


Fig. 3 TUNEL labelled apoptotic cells in retinas of untreated (a) and treated (b) groups 1d after laser injury(TUNEL 200 \times)

给予 DMTU 后,各组凋亡细胞均有下降,6h 组视网膜几乎无凋亡细胞出现;1d 和 3d 组有少量阳性细胞存在,且以外核层的减少最显著。另外,治疗各组的外核层厚度均高于同时相的损伤对照组(见图 3b)。

正常对照组和阴性对照组切片未见 TUNEL 染色阳性细胞的存在。

2.3 DNA 凝胶电泳

凝胶电泳显示照后 6h 组、1d 组和 3d 组有 DNA ladder 出现,并以 1d 组为最,而给药后各组 ladder 的数量和强度有明显降低,6h 组 ladder 几乎不可见(见图 4)。

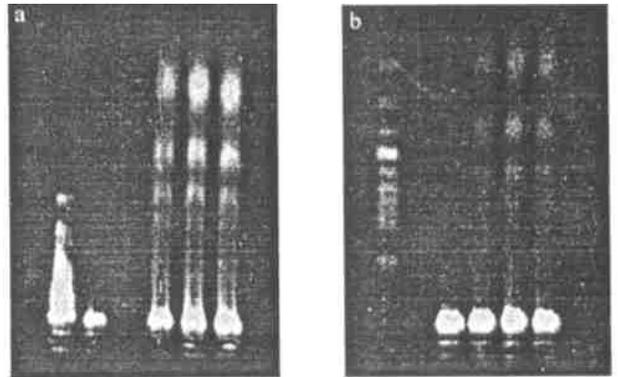


Fig. 4 Neutral gel electrophoresis of retinas DNA from untreated (a) and treated (b) rabbits, from left to right: line 1 is marker, line 2, 3, 4 and 5 are from normal retina, 6h, 1d and 3d after laser exposure respectively

2.4 丙二醛结果

MDA 检测表明,MDA 含量在光照后即刻就有升高,1d~ 3d 达高峰,7d 时间有明显下降,14d 时恢复。而在 DMTU 治疗组中,视网膜 MDA 始终保持在较低的水平,从照后即刻到 7d,给药组与对照组相比具有显著差别,直至 14d 时,两组无统计差别(见表 1)。

Table 1 The average values of MDA in the retina tissues from both groups after laser injury

	0h**	4h**	12h**	1d**	3d**	7d*	14d
control group	61.97 ±	75.57 ±	93.48 ±	120.91 ±	116.84 ±	84.88 ±	59.71 ±
	10.52	14.65	19.02	14.08	8.98	13.96	16.28
treatment group	37.55 ±	61.22 ±	61.51 ±	53.23 ±	53.83 ±	76.14 ±	63.51 ±
	6.90	10.92	10.98	11.92	14.58	12.62	15.44

compared with the control group in the same time, * $p < 0.05$,

** $p < 0.01$

3 讨 论

视网膜是一个体内发生脂质过氧化的天然场所,感光细胞盘膜中高浓度的不饱和脂肪酸在光子和视网膜局部高氧环境中很容易通过光敏剂(视紫红质、视黄醇等)产生有害的自由基,继而发生变性或死亡^[1]。

细胞凋亡理论是近年来的学科热点,它对细胞死亡方式进行了更为广泛的探索。已证明在光性和遗传性视网膜色素变性、视网膜脱离、视网膜缺血性损伤以及黄斑变性中,凋亡是感光细胞丢失、视功能减退的最主要机制。这与视网膜局部易发生脂质过氧化损伤有关。

实验中所用的治疗药物 DMTU 性质与谷胱甘肽(glutathione)类似,可以特异性的淬灭羟基、过氧化氢等自由基。它注射到动物体内后可迅速分布于眼部组织,而且有较长的半衰期,注射后 72h 仍可在组织中检测到^[3]。DMTU 这种强效的抗氧化特性和在眼组织特异性富集的特点,非常适宜于视网膜光损伤的机理研究和防治手段。

实验结果也表明,在激光照射后,视网膜 MDA 含量在光照后迅速升高。而给予 DMTU 后,视网膜 MDA 始终保持在较低的水平,与对照组相比具有显

著差别,直至 14d 时,两组无差别,这可能与 DMTU 已从体内排除有关。因为 MDA 是脂质过氧化反应的主要降解产物,测定组织中的 MDA 的含量可以间接反映脂质过氧化的情况^[4]。用药组能显著地减轻激光照射所致的视网膜脂质过氧化作用,这也是实验中所见用药组光镜形态的改变显著轻于对照组的原因。

同时, TUNEL 染色的结果表明,与对照组相比,给药组在损伤后各时间点出现凋亡细胞的数目也显著减少,并以 1d, 3d 组明显,同时核酸电泳的结果也证实了这一点。关于 DMTU 保护视网膜感光细胞的机理,推测这与 DMTU 拮抗脂质过氧化的发生,减少质膜的降解以及核酸损伤有关。另外,细胞膜的脂质过氧化可以引起细胞 Ca^{2+} 内流显著增加,而 Ca^{2+} 的增加是诱发细胞凋亡所必需的条件。各种研究表明^[5], Ca^{2+} 内流可直接激活核酸内切酶,从而裂解 DNA,促进细胞凋亡。具有抗氧化作用的 DMTU 在激光照射之前注射,可大量清除 H_2O_2 诱导产生的 $OH\cdot$ 及其与不饱和脂肪酸作用产生的 $LOO\cdot$,抑制脂质过氧化链式反应的启动和扩展,保护细胞膜免受氧化应激的损伤,从而维持细胞内 Ca^{2+} 平衡,防止或减少凋亡的发生。但 DMTU 的防治作用除可以阻断脂质过氧化所引起的钙内流外,可能还有其它的机理,需要实验进一步证明。

参 考 文 献

- [1] Tso M O. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, 30(12): 2430~2454.
- [2] Hafezi F, Marti A, Munz K *et al.* Exp Eye Res, 1997, 64(6): 963~970.
- [3] Organisciak D T, Darrow R M, Jiang Y L *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, 33(5): 1599~1608.
- [4] 陈为享,张惠蓉. 中华眼科杂志, 1994, 30(2): 125~127.
- [5] Richter C. FEBS-Lett, 1993, 325(1~2): 104~107.

• 简 讯 •

重要启示

1. 本刊的 E-mail 从即日起增加一个新地址: jgjs@sina.com。
2. 为增大信息容量、缩短出版周期,本刊从 2003 年第 3 期起,页码由原来的 80 页增加到 112 页。特此通知!

《激光技术》编辑部

2003 年 8 月