

吲哚青绿介导光动力对防治兔眼后发性白内障的影响

李云川¹⁾, 李 兰¹⁾, 杨文艳¹⁾, 张远平²⁾, 查 旭²⁾, 梁毓林¹⁾

(1) 昆明医科大学附属甘美医院眼科, 云南昆明 650011; 2) 昆明医科大学第二附属医院眼科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 通过比较观察吲哚青绿联合及不联合光照对兔眼后发性白内障发生的抑制作用, 研究光动力在吲哚青绿防治兔眼后发性白内障形成中的作用. **方法** 24 只兔眼随机分为 ICG+ 光照组、ICG 组、空白对照组, 分别行晶状体超声乳化及皮质吸出术, ICG+ 光照组、ICG 组在皮质吸出后前房内注入 0.5 mL 浓度为 5 mg/mL 的 ICG; ICG+ 光照组用 810 nm 的半导体激光对囊膜进行低能量 (50 mW/cm) 照射 2 min; 空白对照组不进行前房内 ICG 注射及光照处理. 术后 3 个月观察各组后囊膜的混浊程度及囊膜中晶状体上皮细胞增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达. **结果** ICG+ 光照组的晶状体后囊膜混浊程度 EPCO 值与 ICG 组、空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), ICG 组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 囊膜的晶状体上皮细胞增殖核抗原增殖指数 ICG+ 光照组与 ICG 组、空白对照组比较 $P < 0.01$, 差异有统计学意义, ICG 组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$). **结论** 单纯 ICG 对晶状体上皮细胞没有明显抑制作用, ICG 对晶状体上皮细胞的抑制作用是通过其作为光敏剂产生的光化学效应而实现的.

[关键词] 吲哚青绿; 光动力作用; 后发性白内障

[中图分类号] R776.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 07 - 0009 - 04

The Impact on the Prevention of Posterior Capsule Opacification of Photodynamic Therapy with Indocyanine Green in Rabbits

LI Yun - chuan¹⁾, LI Lan¹⁾, YANG Wen - yan¹⁾, ZHANG Yuan - ping²⁾, ZHA Xu²⁾, LIANG Yu - lin¹⁾

(1) Dept. of Ophthalmology, The Affiliated Calmette Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011; 2) Dept. of Ophthalmology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of photodynamic therapy in prevention of posterior capsule opacification by observing the inhibition of indocyanine green on prevention of posterior capsule opacification in rabbits. **Methods** 24 rabbit's eyes were randomly divided in 3 groups. Extracapsular lens extraction by phacoemulsification was performed on 24 eyes. 0.5 ml ICG (5mg/ml) was injected in the capsular bag and the eye was illuminated with a diode laser (wavelength 810 nm) for 2min in one group; another group was injected only in the capsular bag with 0.5 mL ICG (5 mg/mL); The third group was not injected with ICG in the capsular bag and with no illumination by diode laser. After 3 months, we observed the degree of posterior capsular opacification and proliferation cell nuclear antigen expression in capsular lens epithelial cell. **Results** 3 months after surgery, there were statistically significant differences in posterior capsular opacification degree EPCO value in ICG combined with laser irradiation group, as compared with ICG group and blank control group ($P < 0.05$), but there was no statistically significant difference between ICG group and the control group ($P > 0.05$). There were statistically

[基金项目] 昆明市科学技术局社会发展重点项目 (08S090207)

[作者简介] 李云川 (1961 ~), 男, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事角膜移植及眼科各疾病的治疗及基础研究工作.

[通讯作者] 李兰. E-mail: lldflz@sina.com

significant differences in the proliferation index of lens epithelial cell proliferation nuclear antigen in ICG combined with laser irradiation group, as compared with ICG group and blank control group ($P < 0.01$), but there was no statistically significant difference between ICG group and the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** ICG alone has no inhibitory effect on lens epithelial cells, but ICG can induce photochemical effects as a photosensitizer, resulting in inhibition of lens epithelial cells.

[**Key words**] Indocyanine green; Photodynamic therapy; Posterior capsular opacification

后发性白内障 (posterior capsule opacification, PCO) 是影响白内障患者术后视力的主要因素, 其形成原因主要为发生机制为白内障术后残留的晶状体上皮细胞增殖、迁移和纤维化生^[1]. 研究表明, 吲哚青绿 (indocyanine green, ICG) 作为一种生物活性染料及光敏剂, 可增强被照射组织对光的吸收, 达到加强光化学效应的目的. 在研究后发障的实验中, ICG 被作为一种光敏剂使用, ICG 联合光照时其光化学效应可使被照射组织选择性的失活. 因此本研究拟利用 ICG 对晶状体上皮细胞的光动力毒性作用, 探讨光动力在吲哚青绿防治兔眼后发性白内障形成中产生的作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

24 只新西兰兔雌雄兼备, 体重 2 ~ 2.5 kg, 随机分为 ICG+ 光照组、ICG 组、空白对照组, 每组 8 只, 每只兔均选取右眼为手术眼.

1.2 手术方法

分组后的新西兰兔, 均选取右眼, 充分散瞳、麻醉后行上方透明角膜切口, 注入粘弹剂、环形撕囊、水分离晶状体后行晶状体超声乳化手术, 彻底清除晶体核及晶体皮质, ICG+ 光照组、ICG 组在皮质吸出后前房内注入 0.5 mL 浓度为 5 mg/mL 的 ICG; ICG+ 光照组用 810 nm 的半导体激光对囊膜进行低能量 (50 mW/cm) 照射 2 min; 空白对照组不进行前房内 ICG 注射及光照处理. 完毕后, 冲洗出 ICG, 复方氯化钠形成前房, 关闭切口, 结膜下注射地塞米松 2.5 mg, 妥布霉素 2 万 U, 妥布霉

素地塞米松眼膏包封术眼. 术后给予妥布霉素地塞米松眼液、复方托吡卡胺眼液滴眼, 每日 3 次, 共 1 周.

1.3 术后观察

术后 3 月, 兔眼充分散瞳后裂隙灯下检查后囊增生, 后照法拍摄后囊膜混浊的照片, 并用后囊膜评价系统 EPCO2000 系统评价后囊膜混浊, 累加计算出 EPCO 值. 处死动物, 取出眼球, 囊膜材料用甲醛固定后行免疫组化法检测兔后囊膜中 LECs 增生细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达, 结果判定: PCNA 阳性表达为细胞核呈棕黄色着染, 细胞核为蓝色着染者为阴性表达. 计数 50 个细胞中的阳性细胞数. 计算

$$\text{增殖指数 (PI)} = \frac{\text{PCNA 阳性细胞数}}{50} \times 100\%$$

每张切片随机选取 3 个高倍视野, 求得均数和标准差为该样本 PI 值.

1.4 统计学处理

所得数据采用 SPSS 统计软件进行分析, 各参数均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 经正态检验及方差齐性检验, 采用单因素方差分析, 组间比较用 Dunnett *t* 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 晶体后囊膜混浊程度 (EPCO 值)

术后 3 个月, ICG+ 光照组的晶状体后囊膜混浊程度 EPCO 值与 ICG 组、空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); ICG 组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1.

表 1 术后第 3 月晶状体后囊膜混浊 EPCO 值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Posterior capsular opacification degree EPCO value 3 months after surgery ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EPCO 值	t1	t2	P1	P2
ICG+ 光照组	8	0.78 ± 0.23				
ICG 组	8	2.53 ± 0.16**	-17.666		< 0.01	
空白对照组	8	2.71 ± 0.34**	-13.298	-1.355	< 0.01	> 0.05

与 ICG+ 光照组比较, ** $P < 0.05$.

2.2 晶状体上皮细胞增殖核抗原增殖指数 (PI)

囊膜的晶状体上皮细胞增殖核抗原增殖指数 ICG+ 光照组与 ICG 组、空白对照组比较 $P < 0.01$,

差异有统计学意义, ICG 组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2.

表 2 术后 3 月各组后囊膜增殖核抗原增殖指数 (PI 值) 比较

Tab. 2 Comparison of the proliferation index of lens epithelial cell proliferation nuclear antigen 3 months after surgery

组 别	n	PI 值	t_1	t_2	P_1	P_2
ICG+ 光照组	8	0.20 ± 0.003				
ICG 组	8	0.97 ± 0.004**	-440.000		< 0.01	
空白对照组	8	0.97 ± 0.001**	-688.709	0	< 0.01	> 0.05

与 ICG+ 光照组比较, ** $P < 0.05$.

3 讨论

白内障超声乳化术已成为治疗白内障的确实可靠的方法, 随着手术技术的不断提高及仪器设备的不断更新, 手术并发症如角膜内皮细胞失代偿、继发性青光眼等并发症逐渐减少; 而后囊膜混浊 (后发障) 的高发率严重地影响了患者术后长期拥有良好的视力. 后发障的形成是多种因素综合作用或介导的结果, 发病机理迄今尚未完全阐明, 现已普遍认为, 术后 PCO 与残留晶体上皮细胞移行、增殖、纤维化及合成细胞外基质有密切关系. 因此, 防治 PCO 的重点是减少晶状体上皮细胞残留, 以及抑制残留的晶状体上皮细胞增殖.

光动力作用 (Photodynamic action) 亦称光力学作用, 是指生物体内同时具有氧和色素时, 在可见光 (该色素的吸收光) 的照射下, 生物体内分子产生的氧化作用. 光动力治疗其基本原理是: 利用光敏剂与目标组织和细胞具有亲和性和富集性的特点, 用一定波长光激发滞留于组织、细胞内的光敏剂, 使其产生单态氧, 使细胞死亡. 已有实验表明^[2], 利用细菌叶绿素 A 的光动力作用能有效的降低兔眼后发性白内障的程度及晶状体上皮细胞的增殖. 吡啶青绿是一种水溶性无毒的三碳菁燃料, 作为一种活体组织染色剂, 在眼科临床上常用于内眼组织染色辅助治疗, 近年来, 吡啶青绿常被作为光敏剂使用. 1995 年 Chen 等^[3]以吡啶青绿作为光敏剂, 糖基化聚氨基葡萄糖作为免疫佐剂 (glycated chitosan, GC) 治愈了部分荷瘤鼠的原发瘤和转移瘤. Joussen 等^[4]曾报道: ICG 和 810 nm 二极管激光照射可诱导培养的人 LEC 死亡, Melendez 等^[5]也有类似报道. 谢青等^[6]通过研究认为吡啶青绿介导的光动力疗法, 可致术后早期晶状体上皮细胞大量减少, 光敏剂诱导的细胞凋亡可能参与了此过程.

这也提示我们从抑制晶状体上皮细胞增殖的角度对 ICG 的光敏特性做进一步的研究.

为明确 ICG 是否只有通过光动力作用才能对防治兔眼后发性白内障形成发生的影响, 笔者从术后 3 个月囊膜的混浊程度及囊膜中晶状体上皮细胞增殖细胞核抗原的表达 2 个方面进行了评估. 增殖细胞核抗原是一种细胞周期调节蛋白, 也是真核细胞 DNA 合成所必需的蛋白, 其合成与表达同细胞增殖状态密切相关, PCNA 存在于正常或异常增殖的细胞中, 在静止期的细胞内含量很少, 它从 G1 晚期开始增加, S 期达高峰, 是 S 期的特异性标记, M 期明显下降, 检测白内障术后晶体后囊膜上 PCNA 的表达是评价晶体上皮细胞增殖状态的可靠指标^[7]. 笔者在前期试验中将 ICG 联合光照应用于兔超声乳化术后预防 PCO 的试验研究证实 ICG 的光动力作用在兔眼可降低术后 3 月时后囊膜混浊的程度, 并呈剂量依赖性, 故本实验采用前期研究中的高剂量组 ICG (5 mg/mL) 进行研究. 本研究通过比较观察术后 3 个月 ICG+ 光照组、ICG 组、空白对照组后囊膜的混浊程度及囊膜中晶状体上皮细胞增生细胞核抗原的表达, 进一步评价光动力在吡啶青绿防治兔眼后发性白内障实验研究中的作用. 研究结果显示: 术后 3 个月 ICG+ 光照组的晶状体后囊膜混浊程度 EPCO 值与 ICG 组、空白对照组比较, 差异有统计学意义, 但 ICG 组与空白对照组比较无统计学差异; 比较各组晶状体上皮细胞增殖核抗原增殖指数 (PI) 结果同上, 这表明, 利用 ICG 的光动力作用在兔眼可降低术后 3 月时后囊膜混浊的程度, 其作用是通过术中 ICG 的光动力毒性清除了囊袋内的晶状体上皮细胞, 从而减少了术后晶状体上皮细胞的增殖程度. 谢青等^[8,9]通过实验研究证明 ICG

(下转第 16 页)

- [6] DUDIC A, KILIARIDIS S, MOMBELLI A, et al. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides [J]. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114(5):416 - 422.
- [7] GIANNOPOULOU C, MOMBELLI A, TSINIDOU K, et al. Detection of gingival crevicular fluid cytokines in children and adolescents with and without fixed orthodontic appliances [J]. *Acta Odontol Scand*, 2008, 66(3):169 - 173.
- [8] REN Y, HAZEMEIJER H, DE HAAN B, et al. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations [J]. *J Periodontol*, 2007, 78(3):453 - 458.
- [9] BASARAN G, OZER T, KAYA F A, et al. Interleukine - 1beta and tumor necrosis factor - alpha levels in the human gingival sulcus during orthodontic treatment [J]. *Angle Orthod*, 2006, 76(5):830 - 836.
- [10] BASARAN G, OZER T, KAYA F A, et al. Interleukins 2, 6, and 8 levels in human gingival sulcus during orthodontic treatment [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2006, 130(1):7.e1 - 6.

(2014 - 04 - 03 收稿)

(上接第 11 页)

的光化学效应可造成 LEC 死亡: 积聚在囊膜的 ICG 经 600 nm 以上波长的光照后, 吸收能量, 从基态跃迁为不稳定的激活态, 激活态光敏剂可产生直接的细胞毒性作用. 激活态恢复为相对稳定基态或三重态的转化过程中释放能量, 这种能量可转化为热量传递给其他分子, 通过升高细胞内温度破坏细胞或激活氧化过程的中间产物造成光氧化损伤. 同时, 将 ICG 水分离联合光照应用于兔实验性 ECLE, 用免疫组织化学方法检测 LEC 的增殖细胞核抗原, 证实 ICG 水分离联合光照能抑制兔 ECLE 术后 LEC 早期增殖, 使 LEC 数量减少, 这与本研究结果一致. 同时也表明: 单纯 ICG 对晶状体上皮细胞没有明显抑制作用, 不能排除仅起到染色剂的作用, ICG 对晶状体上皮细胞的抑制作用是通过其作为光敏剂产生的光化学效应而实现的.

[参考文献]

- [1] MCDONNELL P J, STARK W J, GREEN W R. Posterior capsule opacification: a specular microscopic study [J]. *Ophthalmology*, 1984, 91(7):853 - 856.
- [2] VAN TENTEN Y, SCHUITMAKER H J, DE GROOT V, et al. A preliminary study on the prevention of posterior capsule opacification by photodynamic therapy with bacteriochlorin A in rabbits [J]. *Ophthalmic Res*, 2002, 34(3):113 - 118.
- [3] CHEN W R, ADAMS R L, CARUBELLI R, et al. Laser - photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 1997, 115(1):25 - 30.
- [4] JOUSSEN A M, KRUSE F E, ROHRSCHEIDER K, et al. Devitalization of lens epithelium cells by dye - enhanced therapy [J]. *Ophthalmology*, 1995, 92(4):581 - 590.
- [5] MELENDEZ R F, KUMAR N, MASWADI S M, et al. Photodynamic actions of indocyanine green and trypan blue on human lens epithelial cells in vitro [J]. *Am J Ophthalmol*, 2005, 140(1):132 - 134.
- [6] 谢青, 唐罗生, 张曼萍, 等. 吲哚菁绿联合光照对兔晶状体上皮细胞影响的实验研究 [J]. *眼科新进展*, 2011, 31(8):718 - 720, 724.
- [7] NOSRAT C A, TOMAC A, LINDQVIST E, et al. Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system [J]. *Cell Tissue Res*, 1996, 286(2):191 - 207.
- [8] 谢青, 唐罗生, 王玲, 等. 吲哚菁绿光动力疗法对兔晶状体上皮细胞超微结构的影响 [J]. *眼科新进展*, 2010, 30(4):325 - 327.
- [9] 谢青, 陈惠, 邓洪, 等. ICG 联合光照对兔晶状体上皮细胞增殖的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(12):1 771 - 1 773.

(2014 - 04 - 14 收稿)