

视网膜激光光凝对增殖性糖尿病视网膜病变患者 视网膜前膜新生血管生成的作用

刘家佳 柯根杰 顾永昊 王 林

摘要 目的 探讨增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)患者视网膜激光治疗对视网膜前膜新生血管的作用。方法 收集PDR患者20例20眼,按照玻璃体手术前是否接受过视网膜激光光凝治疗分为光凝组和非光凝组。收集术中剥离的视网膜前膜行苏木精-伊红染色,观察组织病理学改变。应用免疫组织化学染色法检测CD34在新生血管内皮细胞中的表达,比较两组患者视网膜前膜新生血管的密度及单细胞新生血管密度。结果 两组患者的人口基线特征和眼部特征比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),非光凝组患者视网膜+++级新生血管8眼,光凝组患者为1眼,二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。组织病理学结果表明,非光凝组增生膜内可见较多散在的毛细血管型新生血管,多数由单个血管内皮细胞构成管腔,部分区域可见较多出血;光凝组增生膜组织变薄,玻璃样变成分较多,新生毛细血管明显减少。免疫组织化学检测证实,新生血管内皮细胞中CD34均呈强阳性表达,光凝组400倍镜下观察,每个视野新生血管密度为(2.18 ± 1.26)个,非光凝组为(10.00 ± 6.15)个,差异有统

计学意义($Z = -2.994$, $P < 0.05$)。结论 视网膜激光光凝可抑制PDR患者视网膜前膜新生血管的形成,从而降低玻璃体手术治疗PDR的难度。

关键词 糖尿病性视网膜病变; 视网膜激光光凝; 视网膜增生膜; 新生血管

中图分类号 R 778; R 774.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0991-04

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病重要的并发症之一,也是中青年工作人群致盲的首要原因,增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者因玻璃体积血、牵拉性视网膜脱离及黄斑水肿等导致视力明显下降。玻璃体手术是治疗严重PDR的有效手段,可以有效地挽救患者视力,但术中容易出现出血、增殖膜剥离困难及医源性裂孔等并发症。有文献^[1]报道表明视网膜激光光凝可以控制视网膜新生血管生成,减少视网膜耗氧量, PDR患者术前行视网膜激光治疗可以降低玻璃体手术难度,减少增殖膜剥离不彻底、医源性裂孔等并发症的发生,其机制可能与视网膜激光光凝抑制新生血管生成有关,但是没有组织病理学证据。该研究通过对比观察玻璃体手术

2014-03-27 接收

基金项目: 安徽省科技厅科研计划项目(编号: 08020303105)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院眼科, 合肥 230001

作者简介: 刘家佳, 男, 硕士研究生;

柯根杰, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: kegenjie@163.com

molecule) expression and the peripheral nerve distribution in soft palate of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome (OSAHS) patients. **Methods** 30 patients with OSAHS were selected as the experimental group while 10 patients diagnosed as the simple chronic tonsillitis excluded OSAHS as control group. Nerve distribution in the tissue of the soft palate was evaluated by HE staining detection. The expressions of PGP9.5 and NCAM were detected in both groups by immunohistochemistry method. **Results** ① The distributions of different levels in soft palate nerve were different. The distribution of peripheral nerve mainly distributed in the submucosa, glands, blood vessels, and there was a small amount of distribution around the muscle tissue; ② The expression of PGP9.5 and NCAM in OSAHS patients were significantly higher than the control group, which had statistical difference ($P < 0.05$); ③ In OSAHS patients, the expressions of NCAM and PGP9.5 apnea were positively correlated to apnea hypopnea index, the correlation indexes were 0.706 and 0.636 respectively ($P = 0.01$). **Conclusion** The results indicate that nerve abnormalities occur in the soft palate of OSAHS patients. The more heavier of OSAHS, the more abnormalities in the soft palate.

Key words obstructive sleep apnea hypopnea syndrome; soft palate; peripheral nerve; protein gene product 9.5; neural cell adhesion molecule

前是否接受过全视网膜激光光凝术治疗的两组 PDR 患者视网膜新生血管膜的病理学形态改变,免疫组织化学 CD34 染色标记新生血管密度,从而探讨视网膜激光光凝降低 PDR 患者玻璃体手术难度的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 连续收集 2012 年 12 月~2013 年 11 月安徽医科大学附属省立医院眼科收治的 PDR 患者 20 例 20 眼。入选标准为:35~70(51.60 ± 7.91)岁 2 型糖尿病,因反复玻璃体积血无法吸收、B 超检查提示视网膜前机化膜形成和(或)牵拉性视网膜脱离的 DR 患者;无玻璃体积血,间接检眼镜检查示眼底增生膜形成和(或)合并牵拉性视网膜脱离的 DR 患者;接受过全视网膜激光光凝治疗和从未接受过视网膜激光光凝治疗的 DR 患者。

病例排除标准:既往有玻璃体视网膜手术史,接受过抗新生血管药物治疗,未完成全视网膜激光光凝者以及有严重高血压、合并糖尿病肾病患者。

1.1.2 主要试剂 即用型鼠抗人 CD34 单克隆抗体、Elivison plus 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)

1.2 方法

1.2.1 分组 按照患者行玻璃体手术前是否接受过全视网膜激光治疗分为光凝组和非光凝组,其中光凝组 10 例 10 眼,非光凝组 10 例 10 眼。

1.2.2 手术方法及标本采集 两组患者均由同一手术者完成标准的经睫状体扁平部三通道玻璃体切割手术,术中使用视网膜钩和视网膜镊采用钩、剪、剥、切的方法较完整的剥离后极部及周边增殖膜,术中将取出的增殖膜作为手术标本,共计 20 例。

1.2.3 组织病理学检查 将收集的增殖膜用 4% 多聚甲醛固定后,常规脱水、石蜡包埋,石蜡切片机 $4\ \mu\text{m}$ 连续切片,常规苏木精-伊红染色后,光学显微镜下观察两组患者增生膜组织的形态学改变。

1.2.4 免疫组织化学检查 石蜡切片常规脱蜡后,按 Elivison plus 试剂盒说明进行 CD34 免疫组织化学染色,在高温下用柠檬酸进行组织抗原修复。 $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下体积分数 3% H_2O_2 作用 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性,加质量分数 10% 的正常山羊血清 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,加即用型鼠抗人 CD34 单克隆抗体 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,增强剂 $37\ ^\circ\text{C}$ 下作用 15 min,

即用型羊抗鼠-IgG 二抗 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 min,体积分数 0.03% DAB 显色 6 min, Mayer 苏木精复染 1 min。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。细胞质及细胞膜出现棕褐色染色为阳性。

1.2.5 新生血管计数 根据 CD34 免疫组织化学染色结果,每张标本先在 100 倍光学显微镜下找到新生血管密集的区域标记为计数区,然后使用 400 倍光学显微镜在计数区内选取不同视野进行观察,分别统计每个视野内结构完整、没有分散破裂的新生血管个数,出现管腔的不计。选取新生血管个数最多的 3 个视野的数目,计算平均值作为该标本的新生血管密度,并进行分级统计。按照新生血管数目:0~3 个为 +;4~10 个为 ++;大于 10 个为 +++。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。两组患者糖尿病病程、年龄进行独立样本均数的 t 检验,两组患者的视力差异及新生血管眼数分布的差异用等级资料的 Wilcoxon 秩和检验,两组患者的视网膜增殖膜上新生血管的密度的样本均数经 Kolmogorov-Smirnov 检验呈正态分布,采用 Wilcoxon 秩和检验法进行比较。

2 结果

2.1 临床病程资料的比较 非光凝组患者男 4 例,女 6 例,年龄 $37\sim70$ (53.20 ± 10.26) 岁,均为 2 型糖尿病患者,病程 6~15 年 (7.80 ± 3.49) 年,光凝组男 5 例,女 5 例,年龄 $35\sim58$ (52.60 ± 9.29) 岁,均为 2 型糖尿病患者,病程 3~15 (10.20 ± 2.74) 年,8 例接受过 1~3 次局部视网膜光凝,2 例接受过全视网膜光凝。2 组患者的病程、年龄比较差异无统计学意义 ($t = 1.710, P > 0.05$; $t = 0.555, P > 0.05$)。光凝组与非光凝组术前视力为光感~0.2,全部患者系因玻璃体出血入院,眼科 B 超检查或间接检眼镜检查可见眼底有增生膜,3 例合并有牵拉性视网膜脱离。

2.2 增生膜的组织病理学检查 非光凝组患者剥离的增殖膜大体观察相对较大而厚,光学显微镜下可见管径较大的新生血管,表现为玻璃样变的纤维组织内可见散在的新生毛细血管,血管结构相对不完整,由单个血管内皮细胞构成的毛细血管呈出芽状态,可见散在的梭形纤维细胞,部分区域可见较多出血。光凝组患者剥离的增殖膜观察相对变薄,细胞成分相对减少,可见管径较小的新生血管,血管结构相对完整,出血范围相对减少。见图 1。

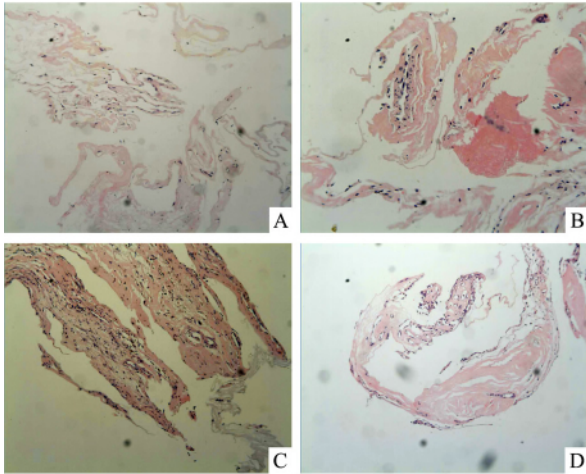


图1 视网膜增殖膜的组织病理学检查 HE × 200

A: 非光凝组术中视网膜增殖膜标本可见较多新生血管; B: 非光凝组视网膜增殖膜可见新生血管及出血; C: 光凝组视网膜增殖膜可见少量新生血管; D: 光凝组视网膜增殖膜玻璃样成分增多

2.3 CD34 免疫组织化学染色 免疫组织化学染色结果显示, 两组的增殖膜新生血管内皮细胞 CD34 均呈强阳性表达。非光凝组新生血管计数 + ~ ++ 级的为 2 例, +++ 级的为 8 例, 而光凝组新生血管数量明显少于非光凝组, + ~ ++ 级的为 9 例, +++ 级的为 1 例, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 并且新生血管的分布较非光凝组集中, 见图 2, 两组新生血管密度差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 见表 1。

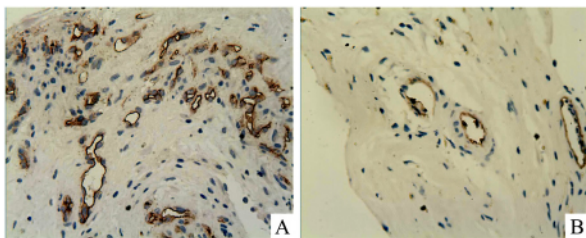


图2 视网膜增殖膜 CD34 免疫组织化学染色 SP × 400

A: 非光凝组增殖膜可见大量新生血管; B: 光凝组新生血管较少; CD34 在新生血管内皮细胞胞质和细胞膜中强表达(褐色)

表1 两组患者增生膜新生血管密度比较

项目	非光凝	光凝	Z 值	P 值
总样本数(n)	10	10		
不同级别新生血管的眼数(n)				
+ ~ ++	2	9		
+++	8	1		<0.01
新生血管密度(个/视野)	10.13 ± 6.15	2.18 ± 1.26	-4.004	<0.05

3 讨论

DR 是糖尿病性微血管病变中的重要表现, 是

导致成人糖尿病患者失明的首要原因^[2]。临床上根据是否出现视网膜新生血管将没有视网膜新生血管形成的糖尿病性视网膜病变称为非增殖性糖尿病性视网膜病变(nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR), 而有视网膜新生血管形成的 DR 称为 PDR。

DR 的防治在于早期预防、及时发现和治疗。治疗应包括血糖的优化控制、动脉张力、血脂和肾功能、视网膜激光光凝等^[2]。及时的视网膜激光光凝是阻止 DR 进展和保存视力的关键, 视网膜激光光凝可以利用激光的光凝固效应, 破坏视网膜光感受器复合体, 降低视网膜氧耗量, 促进新生血管的消退, 延缓自然病程^[1]。由于受教育程度和对糖尿病并发症的了解程度不足, 很多患者没有及时在糖尿病累及眼部时接受视网膜激光光凝治疗, 待发生玻璃体积血或牵拉性视网膜脱离时才来医院就诊。目前对于并发症主要通过手术进行玻璃体积血清除、增殖膜剥离, 术中行全视网膜激光光凝治疗^[3]。

有研究^[4]显示 PDR 患者术前及时行视网膜激光治疗可以减少术中出血的概率, 术中剥离出的增殖膜体积较小、厚度较薄、较易剥离, 但在光凝组中部分患者的增殖膜与视网膜组织连接较为紧密, 术中剥离时增加了医源性裂孔的概率。其原因可能是这些患者在病情较晚期并发黄斑区出血后才接受视网膜激光光凝治疗, 黄斑部的出血已形成纤维血管增殖膜^[4], 术中剥离出的是激光前形成的增殖膜。因此, PDR 患者在出现并发症前应尽早行视网膜激光治疗, 可以减少术中出血、降低手术难度, 提高手术效果。

VEGF 是 PDR 患者发生视网膜新生血管和血-视网膜屏障破坏的重要因子^[5], 视网膜激光光凝可以降低视网膜的需氧量, 阻断 VEGF, 使新生血管消退, 促进新生血管转化为成熟型血管, 减少眼底的渗出和出血。

CD34 在血管内皮细胞中呈强阳性表达, 具有高度特异性和稳定性, 优于其他血管内皮标志物^[6], 本研究选取 CD34 来进行新生血管的标记, 计算新生血管密度时发现, 术前行激光治疗的光凝组患者的增殖膜中新生血管密度较未行激光治疗的非光凝组有所下降, 新生的血管趋于成熟型, 管腔较小, 在新生血管形成的过程中, 基底膜被破坏, 血管内皮细胞发生增殖、迁移、出芽、血管形成, 其中出芽是新生血管形成的关键步骤, 光凝组的增殖膜中发现新生血管芽明显减少。

本研究显示 1 例光凝组患者的增殖膜中新生血管密度很大,可能与患者在病程进展至黄斑部出血,导致纤维血管膜形成后才行激光治疗,术中剥离的增殖膜可能为激光光凝前已经形成的纤维增殖膜有关。

本研究显示:视网膜激光光凝降低了玻璃体切割手术治疗 PDR 的难度,机制是激光治疗阻断了新生血管的出芽形成、抑制了新生血管的发生,从而减少了 PDR 患者术中新生血管的破裂出血、降低了增殖膜剥离的难度。有研究^[4]显示在 PDR 患者合并黄斑出血时先行周围全视网膜光凝术,2 个月后再行玻璃体手术,术中发现纤维增殖膜增生较多并且与视网膜粘连紧密,剥膜时往往出现医源性裂孔及网膜面大片出血,其原因可能是超过 2 个月的黄斑区出血可以变成不可吸收的纤维血管膜,紧密连接在黄斑区。因此提示患者在糖尿病性视网膜病变出现黄斑区出血前应尽早行视网膜激光光凝治疗,在

缓解自然病程进展的同时可以降低以后行玻璃体切割手术的难度。

参考文献

- [1] 刘黎明,王绍飞,刘刚,等. 视网膜激光光凝治疗糖尿病性视网膜病变的疗效分析[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2011, 13(2): 108.
- [2] Romero-Aroca P. Current status in diabetic macular edema treatments[J]. World J Diabetes 2013, 4(5): 165-9.
- [3] Gupta V, Arevalo J F. Surgical management of diabetic retinopathy[J]. Middle East Afr J Ophthalmol 2013, 20(4): 283-92.
- [4] 张燕,董文丽,李冬育. 玻璃体切割术治疗 PDR 合并黄斑区出血的手术时机[J]. 国际眼科杂志 2012, 12(7): 1333.
- [5] Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, et al. Angiogenic and anti-angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy[J]. Curr Diabetes Rev 2006, 2(1): 71-98.
- [6] 吴秉铨,刘彦仿. 免疫组织化学病理诊断[M]. 北京: 北京科学技术出版社 2007: 274.

Effects of retinal photocoagulation on the neovascularization from diabetic fibrovascular proliferative membranes

Liu Jiajia, Ke Genjie, Gu Yonghao, et al

(Dept of Ophthalmology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To evaluate the effects of retinal photocoagulation on the neovascularization of removed diabetic fibrovascular proliferative membranes. **Methods** 20 eyes from 20 patients with PDR were collected. Patients were divided into retinal photocoagulation group and non photocoagulation group according to whether received retinal photocoagulation treatment before. Proliferative membrane specimens obtained during vitrectomy were sent for histopathologic examination using hematoxylin-eosin stain, immunohistochemistry (CD34). Comparative analysis of different components of the fibrovascular proliferation (CD34) among the study groups. **Results** The differences of the baseline characteristics and demographic characteristics between two groups were not statistically significant ($P > 0.05$). The neovessels were observed in 8 eyes from non photocoagulation group and 1 eye from photocoagulation group were grade + + +. There were statistically significant differences ($P < 0.01$). Histopathology results showed that more capillary-like neovascularization with single vascular endothelial cells, obvious hemorrhage were observed on preretinal membranes in non-photocoagulation group. However, there were less hemorrhage and few capillary-like neovascularization but more hyaline degeneration of fibrous tissue were observed in photocoagulation group. Pan-endothelial marker CD34 were strongly expressed in neovascularization. By using the microscope we can count that the neovessels density were (2.18 ± 1.26) /field in photocoagulation group and (10.00 ± 6.15) /field in non photocoagulation group. The differences were significant ($Z = -2.994, P < 0.05$). **Conclusion** The retinal photocoagulation can improve the successful rate of vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy. The mechanism may be the retinal photocoagulation can inhibit the formation of neovascular.

Key words proliferative diabetic retinopathy; retinal photocoagulation; preretinal membranes; retinal neovascularization