

去整合素防治兔眼后发性白内障的实验研究

吴国玖, 周丽琼, 查旭, 张远平, 丁洁琼, 赵学英
(昆明医科大学第二附属医院眼科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨去整合素 DTY29 对体外人晶状体上皮细胞及体内兔眼晶状体上皮细胞增殖抑制的有效性及其安全性。 **方法** (1) 体外: 将 36 孔板分为 a 对照组、b、c、d 实验组, 每组 9 孔, 培养人晶状体上皮细胞, 细胞划痕后各组依次加入培养液、0.08 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 DTY29, 于 0 h、6 h、12 h、24 h 倒置显微镜拍照并测量划痕宽度; (2) 体内: 雄性新西兰大白兔 36 只, 随机分为对照组 A 组, 实验组 B、C、D 组, 每组 9 只兔。术前均测角膜内皮细胞计数。右眼均行透明晶状体皮质超声乳化吸除术, 术毕 A 组前房注入林格氏液 0.2 mL, B、C、D 组分别注入 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ DTY29 溶液 0.2 mL, 术后观察角膜、前房、瞳孔、囊膜浑浊及眼底情况。 **结果** (1) 体外细胞划痕实验: 6 h、12 h、24 h 划痕宽度比较, a 组较 b、c、d 组均明显缩小 ($P < 0.05$); (2) 角膜内皮细胞丢失 A、B、C 组间无统计学意义 ($P > 0.05$), D 组与 A、B、C 组相比, 显著减少 ($P < 0.05$); (3) A、B 组术后 1~3 m 均有后发性白内障发生, 但发生率无统计学意义 ($P > 0.05$), C、D 组未发生后发性白内障; (4) 各组均未发生视网膜脱离、脉络膜脱离等严重并发症。 **结论** DTY29 体外或体内均能抑制晶状体上皮细胞增生, 其抑制作用与药物浓度呈正相关, 在活体内, 高浓度 DTY29 对角膜内皮细胞具有破坏作用, 暂未发现其对眼内其他组织造成明显影响, 证明低浓度下用药的安全性; 最适宜的用药浓度可能在 10 $\mu\text{mol/L}$ ~20 $\mu\text{mol/L}$ 之间, 其眼内用药安全性和最适宜浓度仍需进一步探索。

[关键词] 去整合素; 后发性白内障; 晶状体上皮细胞; 兔

[中图分类号] R776 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0013-05

Inhibition Effect of Disintegrin on Posterior Capsular Opacification in Rabbits

WU Guo-jiu, ZHOU Li-qiong, ZHA Xu, ZHANG Yuan-ping, DING Jie-qiong, ZHAO Xue-ying
(Dept. of Ophthalmology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the efficacy and safety of disintegrin DTY29 on inhibiting the proliferation of rabbit lens epithelial cells (LECs) in vitro and in vivo. **Methods** (1) In vitro: 36-well plates were divided into control group (a) and experimental groups (b, c and d), nine holes each group. The human LECs were cultured and scratched, and then culture media, 0.08 $\mu\text{mol/L}$, 0.4 $\mu\text{mol/L}$, and 2 $\mu\text{mol/L}$ DTY29 were added into 4 groups, respectively. Scratch widths were photographed and measured at 0 h, 6 h, 12 h and 24 h. (2) In vivo: 36 male New Zealand white rabbits were randomly divided into control group (A), experimental groups (B, C and D), nine rabbits each group. Amounts of corneal endothelial cells were calculated before operative. Phacoemulsification was performed in all right eyes of the rabbits, and then 0.2 mL of Ringer's, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ and 40 $\mu\text{mol/L}$ DTY29 solution was injected into the anterior chamber of groups A, B, C and D, respectively. Cornea, anterior chamber, pupil, posterior capsular opacification (PCO), and fundus were observed postoperatively. **Results** At 6 h, 12 h and 24 h of cells scratch test in vitro, the scratch widths of group a reduced significantly ($P < 0.05$) compared with groups b, c and d. There were no significant differences in corneal endothelial cells loss among groups A, B and C ($P > 0.05$), while a significant reduction was found in group D

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2012FC016); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2012FB056)

[作者简介] 吴国玖 (1981~), 男, 江苏徐州市人, 在读硕士研究生, 住院医师, 主要从事眼科临床工作。

[通讯作者] 赵学英. E-mail: 1695478826@qq.com,

compared with groups A, B and C ($P < 0.05$). PCO was observed in both groups A and B after 1–3 months postoperatively, but there was no significant difference in incidence ($P > 0.05$). PCO hadn't occurred in groups C and D. Retinal detachment, choroidal detachment and other serious complications were not observed. **Conclusion** Disintegrin DTY29 could inhibit lens epithelial cells proliferation in vitro or in vivo, and there was a positive correlation between inhibiting effect and concentration. In vivo, corneal endothelial cells can be destroyed by DTY29 with a high concentration, and no side effects on intraocular tissues have been observed, which demonstrated the safety at a low concentration. The experiment results suggested that the optimum concentration ranged from 10 $\mu\text{mol/L}$ to 20 $\mu\text{mol/L}$, and further investigation should be done to prove its safety and optimum concentration.

[**Key words**] Disintegrin; Posterior capsular opacification; Lens epithelial cells; Rabbit

后发性白内障或后囊膜浑浊 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障囊外摘除术后最常见的并发症^[1], 也是导致术后视力再次下降的主要原因, PCO 的发生主要原因是术后囊膜残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 出现增殖、粘附并向后囊膜迁移^[2]. 整合素是一种黏附分子, 在 LECs 的迁移、黏附及增殖过程中发挥重要的作用, 去整合素 (Disintegrin) 是一种小分子多肽, 它可以被整合素特异性的识别并黏附, 从而抑制整合素的生物学作用. 本实验旨在体外及活体中应用不同浓度 DTY29, 观察其对 LECs 增殖的抑制作用及寻求体内用药适宜浓度, 为临床治疗 PCO 提供动物实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 健康雄性新西兰大白兔 36 只, 质量 2.0 ~ 2.5 kg, 眼部检查无异常 (中国科学院昆明动物研究所提供).

1.1.2 药物及器械 Disintegrin DTY29 (中国科学院昆明动物研究所提供), 盐酸氯胺酮及盐酸氯丙嗪 (昆明医科大学第二附属医院提供)、DMEM/F-12 培养基 (北京清大天一科技有限公司)、粘弹剂、胰蛋白酶 (上海生工)、HBSS, 注射用青霉素钠 (山西振东泰盛制药有限公司)、注射用硫酸链霉素 (山东鲁抗医药股份有限公司)、培养瓶、36 孔细胞培养板、CO₂ 培养箱, 倒置显微镜 (OLYMPUS), 手术显微镜 (ZESS)、眼科显微手术器械、裂隙灯显微镜 (Topcon)、超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LECs 用含 100 mL/L 胎牛血清、100 × 10³ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的低糖

DMEM 培养基培养, 体积分数 5% CO₂、37 °C 下培养箱传代培养.

1.2.2 划痕实验 取对数生长期细胞, 以 3 × 10⁵ / 孔密度接种于 36 孔板, 培养箱内 5% CO₂、37 °C 下培养 24 h. 枪头于细胞面划痕, PBS 洗涤 3 遍. a、b、c、d 组分别加入 PBS 及 0.08 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ DTY29 溶液, 加入无血清低糖 DMEM 培养基继续培养, 于 0、6、12、24 h 观察细胞迁移情况并拍照记录.

1.2.3 动物模型建立 (1) 术前准备 将 36 只大白兔 36 眼 (右眼) 按随机数字表法随机分为对照组 -A 组和实验组 -B、C、D 组, 每组 9 眼. 术前氧氟沙星眼液点眼, 三型碘冲洗结膜囊, 美多丽眼液充分散瞳, 将兔固定手术台, 采用盐酸氯胺酮 (50 mg/kg) 及盐酸氯丙嗪 (25 mg/kg) 混合液肌内注射麻醉. (2) 动物模型建立 36 眼全部由同一手术经验丰富医生完成超声乳化术. 方法: 爱尔卡因表麻, 用 3.0 刀做颞上透明角膜切口, 前房注入粘弹剂, 前囊连续环形撕囊, 水分离, 1 mL 注射针头前房穿刺做辅助口, 超声乳化、I/A 吸除晶状体皮质, 术毕 A、B、C、D 组前房分别注入 0.2 mL 林格液、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 DTY29 溶液, 若角膜主切口渗漏, 则 10-0 线缝合一针, 最后结膜囊涂典必殊及阿托品眼膏. 最终所有手术顺利, 术中无并发症发生. (3) 术后处理: ① 术后用药: 术后第 1 天开始, 典必殊眼液滴眼, 2 h/次, 阿托品眼膏 4 h/次, 典必殊眼膏 1 d/次, 3 d 后, 典必殊改为 3 h/次; ② 若出现高眼压, 予布林佐胺降眼压.

1.3 术后观察

(1) 角膜水肿: 分为 0 级: 清晰透明; 1 级: 线状混浊水肿, 无或少后弹力层皱褶; 2 级: 斑片状水肿, 后弹力层明显皱褶, 厚度增加; 3 级: 弥漫性水肿混浊, 大泡性角膜病变, 厚度增加明显.

(2) 房水混浊分为 0 级:房水清晰透明, Tyndall 现象 (-); 1 级:房水轻度混浊, Tyndall 现象 (+), 较少 / 无纤维素渗出; 2 级:房水中度混浊, Tyndall 现象 (++) , 明显纤维素性渗出; 3 级:房水重度混浊 Tyndall 现象 (+++) , 大量的纤维素性渗出或前房积脓. (3) 后囊膜混浊分为 0 级:后囊膜透明, 无混浊; 1 级:后囊膜轻度混浊, 眼底能看清; 2 级:后囊膜中度混浊, 眼底部分模糊不清; 3 级:后囊膜明显混浊眼底窥不清或周边部环状皮质增生. (4) 观察眼底情况, 包括玻璃体、黄斑、视乳头、视网膜血管等.

1.4 统计学处理

SPSS 统计软件处理, 多组计量资料采用方差分析及 q 检验, 计数资料 χ^2 检验, 等级资料秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 手术兔存活情况

所有兔至术后 3 月, 均无死亡.

2.2 划痕实验结果

划痕后 0 h、6 h、12 h、24 h 倒置显微镜拍照记录并测量, 各组划痕宽度变化, 见图 1, 可见随着观察时间延长, a、b、c 组细胞均能向划痕中央生长, 以 a 组生长最快, c 组最慢, 而 d 组完全不能生长, 划痕宽度增加, 同时细胞出现大量死亡. 从照片里每组各时间点随机抽取 9 张, 每张照片测量 6 次, 取平均值, 见表 1. 可见 0h 各组间无明显差异 ($P > 0.05$), 6 h b、c、d 组较 a 组宽度明显增大 ($P < 0.05$), d 和 b、c 组比较有明显差异 ($P < 0.05$), 12 h、24 h 各组间比较均有统计学意义 ($P < 0.05$).

2.3 术后观察

(1) 各组兔术眼术后均出现不同程度的角膜水肿, 以手术切口周围及与虹膜后粘连相对应处局限性水肿为主, 其次为术后高眼压所致的雾状水肿, 水肿分级以 1、2 级多见, 经有效处理, 至术后 10 d 各组角膜水肿均能恢复正常. (2) 前房炎症: 分级以 1、2 级多见, 无 3 级出现, 术后 1 d, 各组均有 2 眼出现前房絮状渗出或瞳孔区膜状渗出, 经散瞳、抗炎对症治疗, 炎症均能在在 2 周内消退. (3) PCO: 术后 20 d 及 30 d, A、B 组依次出现 PCO, 至术后 3 月, C、D 组未见 PCO 发生. 术后 1、3 月. 各组 PCO 发生情况, A、B 组 PCO 发生率无差异 ($P > 0.05$), C、D 组均未发生 PCO, 见表 2. (4) 术眼角膜内皮细胞 (corneal endothelial cells, CECs) 计数, 术前各组无统计学意义, 术后 3m, A、B、C 组间无统计学意义 ($P > 0.05$), D 组与 A、B、C 组比较, CECs 显著减少 ($P < 0.05$), 见表 3. (5) 其他眼部情况: 术后 1 d, 对照组 1 例出现前房少许出血, 于术后 5 d 完全吸收, 各组均未发生视网膜、脉络膜出血及脱离, 无黄斑水肿发生.

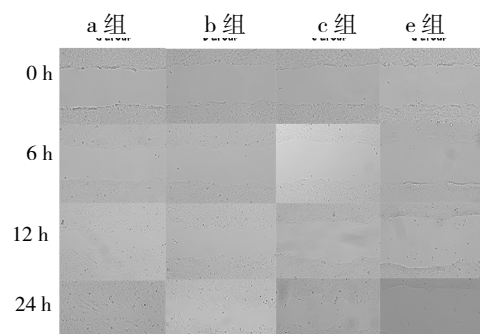


图 1 各组 4 个时间点划痕宽度照片

Fig. 1 Photos of scratch widths of all groups at 4 points in time

表 1 4 组间相同时间点划痕宽度比较 [$\mu\text{m}, (\bar{x} \pm s)$]

Tab. 1 Comparison of scratch width among 4 groups at the same point in time [$\mu\text{m}, (\bar{x} \pm s)$]

组 别	n	时间			
		0 h	6 h	12 h	24 h
a	9	397.82 ± 12.05	288.15 ± 22.05	132.46 ± 19.61	56.52 ± 7.70
b	9	393.76 ± 17.51	335.05 ± 14.88*	280.57 ± 15.30*	173.24 ± 33.77*
c	9	398.32 ± 13.34	340.30 ± 9.23*	327.17 ± 18.83* [△]	275.94 ± 24.79* [△]
d	9	394.37 ± 11.26	372.09 ± 15.89* ^{△▲}	459.94 ± 23.14* ^{△▲}	517.28 ± 23.14* ^{△▲}

与 a 组比较, * $P < 0.05$; 与 b 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 c 组比较, [▲] $P < 0.05$.

表 2 4 组术后 1、3 月 PCO 发生情况个数

Tab. 2 Numbers and degrees of PCO after 1 and 3 months in 4 groups

组 别	1 m				3 m			
	0	I	II	III	0	I	II	III
A	7	1	1	0	5	1	2	1
B	8	1	0	0	6	2	1	0
C	9	0	0	0	9	0	0	0
D	9	0	0	0	9	0	0	0

表 3 术前、术后 3 月.各组术眼 CECs 计数 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 CECs of all the groups preoperatively and 3 months postoperatively ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	术前	术后 3 月
A	9	2 840.42 ± 8.32	2 315.55 ± 9.60*
B	9	2 829.21 ± 9.33	2 304.67 ± 7.09*
C	9	2 824.37 ± 8.24	2 303.68 ± 7.98*
D	9	2 819.33 ± 8.45	1 369.00 ± 12.50

与 D 组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

白内障囊外摘除术破坏了囊膜的完整性, 从而诱发 LECs 的创伤愈合反应, 导致 LECs 增生和细胞外基质的重建^[3]. 赤道附近残留的 LECs 最初表现为原位增生^[4], 之后增生的细胞向原先没有上皮细胞的后囊膜迁移, 迁移的细胞在后囊膜不断分裂或纤维化, 最终形成 PCO.

整合素是一类介导 C-C 间及 C-ECM 间的相互作用的黏附分子, Sponer 等^[5]研究发现整合素 $\alpha 5 \beta 6$ 在完整晶状体的 LECs 中不表达, 但在晶状体囊外摘除术后, 囊膜中有 91.6% 广泛表达, Zhang 等^[6]对 100 名白内障患者进行检查, 发现前囊膜整合素 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 均阳性表达, 表达率依次为 70%、65%、75%、70%、80%. Disintegrin 是一类来源于蛇毒蛋白的小分子量蛋白质, 其氨基酸序列上共同含有一个 Arg-Gly-Asp-RGD 环, 这类蛋白质利用其 RGD 序列和整合素特异性结合, 从而竞争性抑制整合素和相应配体的结合, 使得整合素的功能被抑制.

基于以上原理, 为了探索 DTY29 对 PCO 抑制作用, 本研究设置体外及体内实验, 体外干预显示, 与对照组比, DTY29 对 LECs 的移行有明显抑制并可诱导其凋亡, 划痕 24 h 后观察, 2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组出现大量因细胞死亡形成的空白区域. 而其它组未见明显细胞死亡, 同时由表 1 得出, 随着

DTY29 浓度的增大, 其抑制迁移和生长的能力越强. 谭少健等^[7]用不同浓度 Kistrin 体外对 HLECs 进行干预, 显示 Kistrin 能够抑制 LECs 与胶原的黏附, 且呈剂量依赖性, 可显著抑制 LECs 的移行, 对 LECs 的增殖有明显的抑制作用, 并与剂量有关.

本实验对兔眼进行超声乳化晶状体吸除, 手术最后以不同浓度 0.2 mL DTY29 注入前房, 主要目的是使药物弥散在前房、后房和囊袋内, 各组织能有同等的机会和时间与药物充分接触. 术后 3 月, A、B 组均有 PCO 发生, 发生率无显著差异, 但与 A 组相比, B 组 PCO 分级稍低, C、D 组均无 PCO 发生, CECs 计数显示, 4 组术前无明显差异, A、B、C、D 组较术前均有下降, 前 3 组术后 3 月. CECs 平均丢失约 500 个 / mm^2 , 丢失率无明显差异, 而 D 组 CECs 明显减少, 说明随着 DTY29 药物浓度的增大, 对 CECs 的破坏越大. Disintegrin 体内抑制 PCO 也见报道, 国外 Kim JT 等^[8]对兔眼超声乳化吸出晶状体皮质后, 植入 salmosin 浸泡过的人工晶体, 至术后 3 月. PCO 分级均为 1 级, 对照组 PCO 大多为 3、4 级, 证明其对 LECs 增殖、迁移具有明显的抑制作用, 而且对 CECs 及眼内其他组织均无明显影响. 国内姬翔等^[9]研究发现, 前房注射 80 $\mu\text{g/L}$ Kistrin 对 LECs 增殖的抑制作用最强, 且对眼内组织无明显影响. 钱光霞等^[10]发现 Disintegrin-Echistatin 对糖尿病兔远期 PCO 具有明显抑制作用, 且对眼内相邻及重要组织无明显毒性作用. 此次实验发现 20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 DTY29 体内均能明显抑制 PCO 的发生, 故猜想更佳浓度可能在 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 之间.

本研究及以上这些实验证据明确了 Disintegrin 对 LECs 迁移、增殖存在抑制作用, 证明了 Disintegrin 眼内作用的有效性, 由于研究样本数量有限, 尚不能对用药的安全性得出结论, 此外, 观察时间长短、Disintegrin 种类多、用药途径不同及各自药物最适宜浓度都期待更多样本的研究.

(下转第 40 页)

- [4] 唐红梅, 谢庆文, 施榕. 糖尿病社区干预效果评价 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2007, 27(7): 879.
- [5] 唐玲, 陈兴宝, 陈慧云, 等. 中国 2 型糖尿病及其并发症的经济负担 [J]. 中国卫生经济, 2003, 22 (12): 21 - 23.
- [6] 杨士保. 2 型糖尿病不同治疗方案的医疗后果综合评价研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- [7] 王乐三, 孙振球, 蔡太生, 等. 2 型糖尿病患者生活质量量表的研制与考评 [J]. 中南大学学报(医学版), 2005, 30(1): 21 - 27.
- [8] 梁渊, 程锦泉, 彭绩, 等. 2 型糖尿病药物常规治疗与强化治疗的生理指标与主观指标评价 [J]. 中国药房, 2008, 19(2): 118 - 120.
- [9] 程晓明, 罗五金. 卫生经济学(第 2 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 453.
- [10] 徐凌中, 柳丽华, 王永杰, 等. 效用指标的测量方法及其研究进展 [J]. 国外医学卫生经济分册, 2001, 18(2): 88 - 92.
- (2014-09-26 收稿)

(上接第 16 页)

[参考文献]

- [1] 葛坚, 赵家良, 黎晓新. 眼科学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 217.
- [2] 王莉, 李鹏. Na:YAG 激光治疗后性白内障的临床观察 [J]. 国际眼科杂志, 2005, 5 (4): 768 - 701.
- [3] MEACOCK W R, SPALTON D J, STANFORD M R. Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification [J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84(3): 332 - 336.
- [4] MCDONNELL P J, ROWENSL, GLASERBM, et al. Posterior capsule opacification An in vitro model [J]. Arch Ophthalmol, 1985, 103(9): 1 378 - 3 781.
- [5] SPONER U, PIEH S, SOLEIMAN A, et al. Upregulation of alpha beta 6 integrin, a potent TGF-beta 1 activator, and posterior capsule opacification [J]. Cataract Refract Surg, 2005, 31(3): 595 - 606.
- [6] ZHANGXH, JIJ, ZHANG H, et al. Detection of integrins in cataract lens epithelial cells [J]. Cataract Refract Surg, 2000, 26(2): 287 - 291.
- [7] 谭少健, 梁皓, 赵军, 等. 去整合素抑制体外培养的人眼晶状体上皮细胞生长的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(3): 348 - 351.
- [8] KIM J T, LEE D H, CHUNG K H, et al. Inhibitory effects of salmosin, a disintegrin, on posterior capsular opacification in vitro and in vivo [J]. Exp Eye Res, 2002, 74(5): 585 - 594.
- [9] 姬翔, 梁皓, 李霞, 等. 去整合素抑制兔晶状体上皮细胞增殖的实验研究 [J]. 眼科新进展, 2010, 4(4): 304 - 307.
- [10] 钱光霞, 谭少健, 梁皓, 等. 去整合素 Echinatin 抑制糖尿病兔远期后发性白内障 [J]. 眼科新进展, 2014, 34 (6): 506 - 509.
- (2014 - 09 - 09 收稿)