

# ILK siRNA 对高浓度葡萄糖诱导的人 LECs 增生和上皮向间质转化的抑制作用

储昭节 周 健 惠延年

## Effects of ILK siRNA on high-glucose-induced proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition in human LECs

Chu Zhaojie, Zhou Jian, Hui Yannian. Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**Abstract Objective** Integrin-linked kinase (ILK) is a serine-threonine kinase. It can be stimulated by high glucose and mainly involved in diabetic complications in kidney. The purpose of this study was to investigate the effects of ILK on cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition induced by high glucose in human lens epithelial cells (LECs) in vitro.

**Methods** Human LECs line SRA01/04 cells were cultured in DMEM containing 2% serum and exposed to 5.5 mmol/L or 30.5 mmol/L glucose as control and high glucose group, respectively. The expression of ILK mRNA was analyzed by reverse transcriptase PCR at 0, 6, 24 hours after treatment of different concentrations of glucose. A small-interfering RNA for ILK gene was selected and the cells were transfected. Six hours after transfection, the cells were exposed to normal or high concentration of glucose for 24 hours. The expression of ILK, proliferating cell nuclear antigen (PCNA),  $\alpha$ -SMA and fibronectin (FN) at mRNA level was detected by RT-PCR to evaluate the cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition. **Results** The expression of ILK mRNA in cultured cells of high glucose group increased by 2.48 and 2.32 folds more than control group at 6 and 24 hours ( $P < 0.01$ ). Level of PCNA mRNA,  $\alpha$ -SMA mRNA, and FN mRNA increased by 1.75, 1.96 and 1.75 folds in high glucose group compared with normal one at 24 hours ( $P < 0.01$ ). After transfected with ILK siRNA, the expression of ILK mRNA was reduced to 30% of normal control cells. In the transfected cells from high glucose group, ILK expression reduced to 21% of untransfected cells, and that of PCNA,  $\alpha$ -SMA, and FN was 29%, 33% and 39% of untransfected cells, respectively ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** High glucose stimulates cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition and upregulates the expression of ILK in human LECs. ILK suppresses cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition induced by high glucose.

**Key words** RNA interference; integrin-linked kinase; high glucose; cell proliferation; epithelial-to-mesenchymal transition; lens epithelial cells

**摘要 目的** 探讨整合素连接激酶 (ILK) 对高浓度葡萄糖诱导的人晶状体上皮细胞 (LECs) 增生和转化的作用。**方法** 将体外培养的人 LECs 系 SRA01/04 细胞分别培养在含葡萄糖 5.5 mmol/L (正常对照组) 和 30.5 mmol/L (高糖组) 的培养液中, 用 RT-PCR 检测培养 0、6、24 h 后 ILK mRNA 的表达; 用 ILK siRNA 脂质体转染细胞, 转染 6 h 后, 加入 2 组培养液处理 24 h, 检测 ILK、细胞增生核抗原 (PCNA)、LECs 转化指标  $\alpha$ -SMA 和 FN 在 mRNA 水平的表达。**结果** 高糖组培养 6 h 和 24 h, SRA01/04 细胞 ILK mRNA 是正常对照组的 2.48 倍和 2.32 倍 ( $P < 0.01$ ), 刺激后 24 h, SRA01/04 细胞 PCNA、 $\alpha$ -SMA、FN 的 mRNA 表达分别是正常对照组的 1.75、1.96 和 1.75 倍 ( $P < 0.01$ )。ILK siRNA 干扰后, 正常对照组 ILK 的表达是非转染细胞的 30%, 高糖组转染细胞 ILK mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ) 是非转染细胞的 21% ( $P < 0.01$ ), 转染细胞 PCNA、 $\alpha$ -SMA 和 FN 的表达分别是非转染细胞的 29%、33% 和 39% ( $P < 0.01$ )。**结论** 高浓度葡萄糖可诱导 LECs 增生、上皮向间质转化及 ILK 表达上调, 抑制 ILK 的高表达能阻止这些过程。

**关键词** RNA 干扰; 整合素连接激酶; 葡萄糖; 细胞增生; 上皮向间充质转化; 晶状体上皮细胞

**分类号** R 776.01 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0353-05

整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过与整合素 $\beta_1$ 、 $\beta_3$ 亚单位结合,介导细胞外基质和生长因子信号向胞内传递,为PI3-K的作用靶点之一,并调控PKB/AKT及GSK-3 $\beta$ 活性,调节细胞的生长、存活、细胞周期、转分化、凋亡、侵袭、移行以及肿瘤血管的发生<sup>[1]</sup>。与单纯的年龄相关性白内障相比,糖尿病性白内障的发病年龄提前,而且白内障术后后囊混浊也较严重<sup>[2]</sup>。研究显示,在晶状体纤维化类疾病,如后发性白内障和前极性白内障形成过程中,整合素家族参与了晶状体上皮的增生和晶状体上皮向间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)<sup>[3]</sup>, ILK作为整合素家族向胞内信号传递过程中的重要环节,在此信号转导过程中可能起关键作用。对糖尿病肾病的研究发现,肾小球足细胞及系膜细胞在高浓度葡萄糖刺激后ILK的表达升高,并且ILK介导了肾小管上皮细胞EMT,并促进肾纤维化疾病的发生<sup>[4-6]</sup>。在糖尿病患者白内障和后发性白内障的发生发展过程中,ILK是否参与晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)的增生、EMT等过程尚不清楚。本研究观察高浓度葡萄糖对体外培养人LEC ILK表达的影响,利用RNA干扰技术,探讨高浓度葡萄糖在LEC增生和EMT中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人永生化LECs系SRA01/04细胞由本实验室保存。培养基DMEM、Opti-MEMI无血清培养基、胎牛血清及TRIZOL试剂(美国Gibco公司);DNA marker、逆转录试剂盒及PCR master Mix(北京TIANGEN公司);转染试剂Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司);针对人ILK基因的siRNA由上海吉玛制药技术有限公司合成。

### 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养和高浓度葡萄糖处理** SRA01/04细胞在含20%胎牛血清的低糖(5.5 mmol/L)DMEM培养液中,37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱内常规培养。取对数生长期的细胞接种至6孔板中,正常对照组培养液葡萄糖浓度为5.5 mmol/L的DMEM,血清浓度为2%;高糖组细胞在培养24 h后换葡萄糖浓度为30.5 mmol/L的DMEM培养液作为高浓度葡萄糖处理,分别于培养0、6、24 h后收集细胞。

**1.2.2 ILK siRNA的转染和干涉效率评价** 根据GeneBank数据库提供的人ILK(NM-001014794.1)的序列设计4条ILK siRNA,并设置无关干扰序列为阴

性对照,筛选出一条细胞转染抑制效率最高的ILK siRNA,在六孔板接种SRA01/04细胞,培养24 h到转染时细胞融合率为50%~60%,按照Lipofectamine 2000的说明书,分别用Opti-MEMI稀释转染试剂和siRNA片段,每孔培养液终体积为2 mL,脂质体用量为5  $\mu$ L,ILK siRNA的终浓度为100 nmol/L。4条ILK siRNA片段及无关干扰序列通过脂质体法转染细胞24 h后,用RT-PCR检测ILK siRNA片段1、2、3、4转染组ILK mRNA的表达,并以各干扰组ILK和 $\beta$ -actin条带灰度比值与无转染正常对照组相比,计算各片段的干扰效率。

**1.2.3 ILK siRNA的转染和高浓度葡萄糖处理** 选择一条干扰效率较高的片段,按照上述方法对细胞进行处理。转染后6 h换不同浓度葡萄糖处理,分为正常对照组(葡萄糖浓度为5.5 mmol/L)、高糖组(葡萄糖浓度为30.5 mmol/L)、干扰对照组、干扰高糖组4组,再继续培养24 h后收集各组细胞进行以下实验。

**1.2.4 RT-PCR半定量检测目的基因的表达** 各组细胞总RNA的提取参照Trizol试剂的说明书进行;按照TIANGEN逆转录试剂盒两步法进行逆转录,逆转录的cDNA作为PCR反应的模板。ILK上游引物:5'-TGGACGACATTTTCACTCAG-3';下游引物:5'-CATCAATCATTACACTACGG-3',扩增后片段长度984 bp。选择细胞增生核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)作为细胞增生指标, $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、纤维粘连蛋白(Fibronectin, FN)作为EMT的标志。PCNA上游引物:5'-GCCGAGATCTCAGCCATATT-3';下游引物:5'-ATGTA CTTAGAGGTACAAAT-3',扩增后片段长度为452 bp。 $\alpha$ -SMA上游引物:5'-GCTCACGGAGCCACCCCTGAA-3';下游引物:5'-CTGATAGGACATTGTTAGCAT-3',扩增后片段长度为574 bp。FN上游引物:5'-TCAACAGTGGGAGCGGACCT-3';下游引物:5'-CTGTGCAGATGCACTGGAGC-3',扩增后片段长度为599 bp。内参照 $\beta$ -actin上游引物:5'-GGCTACAGCTCACCACCAC-3';下游引物:5'-GCACTGTGTTGGC GTACAG-3',扩增后片段长度为252 bp。以上引物均由上海Invitrogen公司合成。PCR反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,55℃(ILK、 $\beta$ -actin、PCNA)、58℃( $\alpha$ -SMA、FN)退火30 s,72℃延伸1 min,循环35次,72℃延伸10 min。PCR反应结束后,取6  $\mu$ L扩增产物在2%琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像仪照相。采用Bandscan软件分析目的条带与 $\beta$ -actin条带的灰度值,计算目的条带与 $\beta$ -actin条带的灰度比

值,并以此判断目的基因的相对表达水平。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。实验结果出自 3 次独立实验。各测量指标的数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,4 个组各测量指标的 mRNA 表达相对量的总体比较采用方差分析,组间的多重比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高糖组 LECs ILK mRNA 的表达

SRA01/04 细胞在 30.5 mmol/L 高浓度葡萄糖处理后 6 h 和 24 h,ILK mRNA 的表达较正常对照组和处理前(0 h)均明显增高,ILK 与内参  $\beta$ -actin 电泳条带的灰度比值,在高糖组处理后 6 h 和 24 h 是正常对照组的 2.48、2.32 倍( $P = 0.0004, 0.0002$ ),而 6 h 和 24 h 之间 ILK mRNA 的表达差异无统计学意义( $P = 0.222$ )(图 1),提示高浓度葡萄糖刺激 SRA01/04 细胞 ILK 在 mRNA 水平的表达升高。

### 2.2 四条 ILK siRNA 片段干扰效率的评定及筛选

四条 ILK siRNA 片段及无关干扰序列通过脂质体法转染细胞 24 h 后,用 RT-PCR 检测 ILK siRNA 片段 1、2、3、4 转染组 ILK mRNA 的表达,其干扰效率分别为:57.1%、64.6%、72.9%、35.6%,提示片段 3 的干扰效率较好,选取片段 3 进行后续实验(图 2)。

### 2.3 ILK 的沉默对高糖组刺激的 LECs 增生和 EMT 的影响

RT-PCR 检测各组 ILK、PCNA、 $\alpha$ -SMA 和 FN 的 mRNA 水平表达显示,高糖组刺激后 SRA01/04 细胞 ILK、

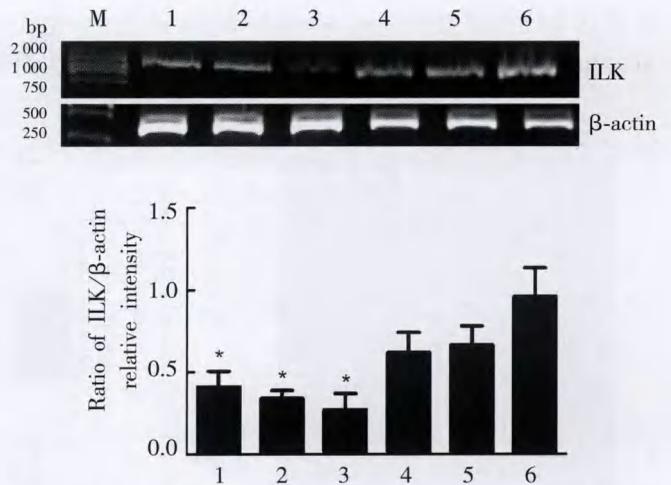


图 2 RT-PCR 检测四条 ILK siRNA 片段对 SRA01/04 细胞 ILK mRNA 表达的影响 M:marker 1:ILK siRNA 片段 1 2:ILK siRNA 片段 2 3:ILK siRNA 片段 3 4:ILK siRNA 片段 4 5:无关干扰序列 6:无转染正常对照组  
Fig.2 Effects of four ILK siRNA fragments on the expression of ILK mRNA in SRA01/04 cells detected by RT-PCR ( $F = 4.985, P = 0.011, * P < 0.05$  vs normal control group) M; marker 1; ILK siRNA fragment 1 2; ILK siRNA fragment 2 3; ILK siRNA fragment 3 4; ILK siRNA fragment 4 5; nonsense siRNA 6; untransfected control group (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

PCNA、 $\alpha$ -SMA 和 FN 的表达较正常对照组明显升高,各基因与内参  $\beta$ -actin 电泳条带的灰度比值分别为正常对照组的 1.81、1.75、1.96、1.75 倍( $P = 0.0054, 0.0007, 0.0017, 0.0002$ )。干扰对照组培养 24 h, ILK mRNA 的表达较正常对照组明显下调( $P = 0.0005$ ),是非转染细胞的 30%;而且在 ILK 沉默以后,细胞 PCNA、 $\alpha$ -SMA 和 FN 的 mRNA 水平表达也较正常

对照组明显下调( $P = 0.0002, 0.0002, 0.0065$ )。干扰高糖组细胞培养 24 h, ILK、PCNA、 $\alpha$ -SMA 和 FN 在 mRNA 水平的表达较高糖组明显下调,各基因与内参  $\beta$ -actin 电泳条带的灰度比值分别为高糖组的 0.21、0.29、0.33、0.39 倍( $P = 0.0013, 0.003, 0.0006, 0.0008$ )。ILK 沉默后,正常对照组与高糖组之间上述各基因的表达差异无统计学意义( $P = 0.563, 0.267, 0.0284, 0.164$ )(图 3)。此结果显示,抑制 ILK

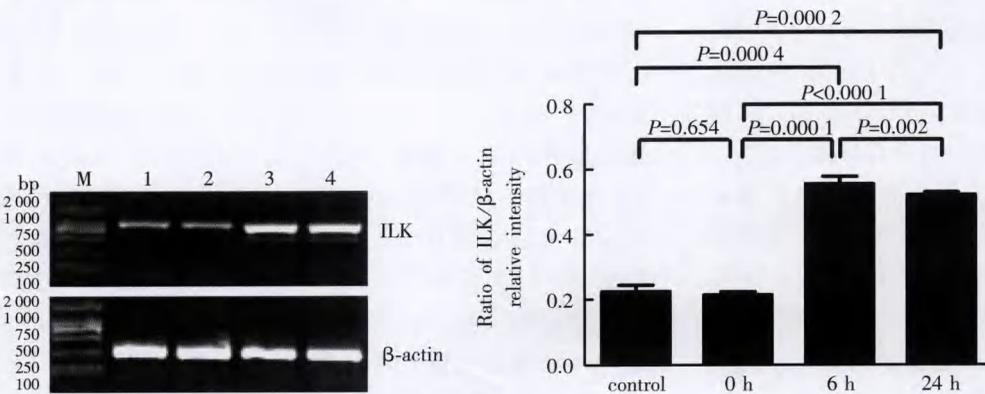


图 1 RT-PCR 检测高浓度葡萄糖对 SRA01/04 细胞 ILK mRNA 表达的影响 M:marker 1:5.5 mmol/L 葡萄糖组 2:30.5 mmol/L 葡萄糖处理 0 h 3:30.5 mmol/L 葡萄糖处理 6 h 4:30.5 mmol/L 葡萄糖处理 24 h  
Fig.1 Effect of high glucose on the expression of ILK mRNA in SRA01/04 cells (RT-PCR) ( $F = 130.8, P = 0.000$ ) M; marker 1; 5.5 mmol/L glucose culture group 2; 30.5 mmol/L high glucose culture value detected instantly 3; 30.5 mmol/L high glucose culture for 6 hours 4; 30.5 mmol/L high glucose culture for 24 hours (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

的表达不仅能阻止 PCNA、 $\alpha$ -SMA 及 FN 的表达,也能有效阻止高浓度葡萄糖刺激的 ILK 的高表达和由它介

导的 PCNA、 $\alpha$ -SMA 和 FN 的高表达,提示 ILK 参与高浓度葡萄糖诱导的 LECs 的增生和 EMT。

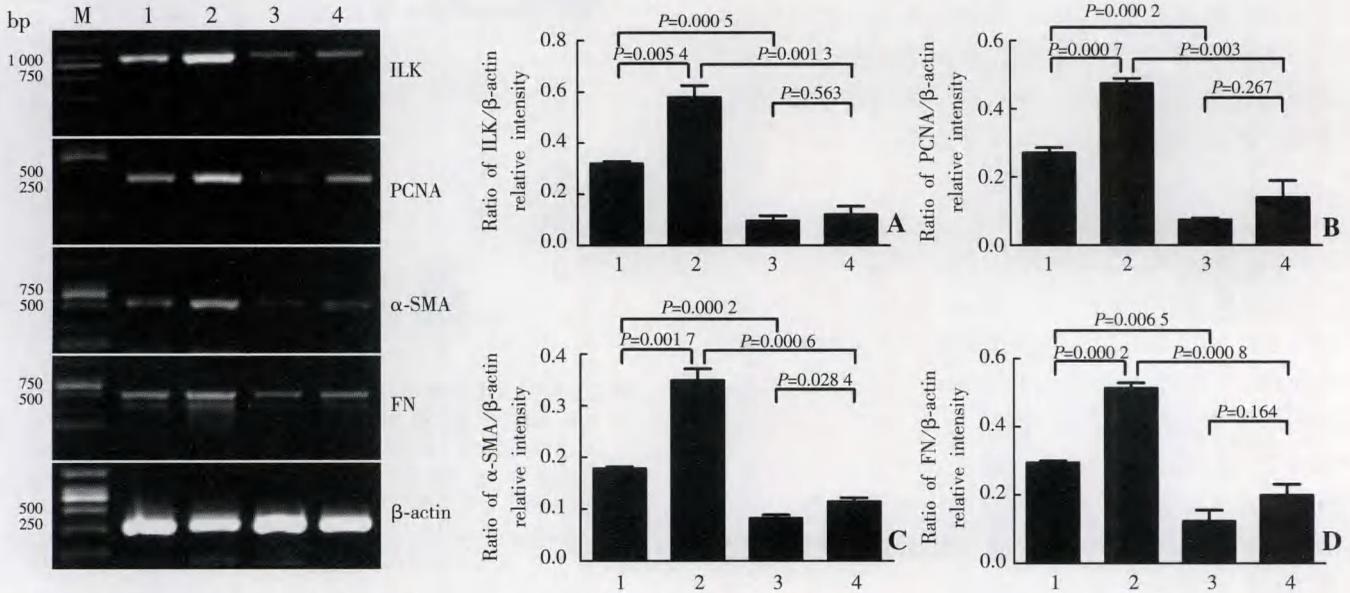


图3 利用 ILK siRNA 干扰 ILK 的表达对高浓度葡萄糖刺激 SRA01/04 细胞 24 h 后 ILK (A)、PCNA (B)、 $\alpha$ -SMA (C) 和 FN mRNA (D) 表达的影响 M; marker 1; 5.5 mmol/L 葡萄糖刺激细胞 24 h 2; 30.5 mmol/L 葡萄糖刺激细胞 24 h 3; ILK siRNA 干扰后用 5.5 mmol/L 葡萄糖刺激细胞 24 h 4; ILK siRNA 干扰后用 30.5 mmol/L 葡萄糖刺激细胞 24 h

Fig. 3 Effects of ILK siRNA on the expression of ILK (A), PCNA (B),  $\alpha$ -SMA (C) and FN mRNA (D) in SRA01/04 cells treated with high glucose M; marker 1; 5.5 mmol/L glucose culturing cells for 24 hours 2; 30.5 mmol/L glucose culturing cells for 24 hours 3; After transfected with ILK siRNA, the cells were cultured in medium with 5.5 mmol/L glucose for 24 hours 4; After transfected with ILK siRNA, the cells were cultured in medium with 30.5 mmol/L glucose for 24 hours A;  $F = 53.57, P = 0.000$ , B;  $F = 41.71, P = 0.000$ , C;  $F = 93.32, P = 0.000$ , D;  $F = 50.79, P = 0.000$ , respectively (One-way ANOVA, SNK-q test)

### 3 讨论

糖尿病性白内障的发病机制尚不完全清楚, LECs 的细胞周期加速和增生活性增强可能扮演着重要角色<sup>[7-8]</sup>。另有研究显示糖尿病性白内障患者 LECs 的密度小于年龄相关性白内障<sup>[9]</sup>, LECs 在氧化应激、渗透压改变等多因素影响下出现细胞凋亡。LECs 的死亡和增生的平衡紊乱, 细胞从 EMT 可能参与白内障的发生。

本研究发现高浓度葡萄糖能够诱导体外培养的人 LECs PCNA 在 mRNA 水平的高表达, 提示高浓度葡萄糖促进细胞的增生。而且, 在高浓度葡萄糖刺激下,  $\alpha$ -SMA、FN 的 mRNA 表达也明显升高, 提示高浓度葡萄糖能刺激 LECs 的 EMT。在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠中也发现 LECs 的 PCNA 表达增加, 前囊下上皮细胞呈复层改变、细胞外基质产生增多<sup>[10]</sup>, 这与本研究结果一致。

ILK 在不同肿瘤的分化、转移等方面的作用得到广泛关注, 抑制其过表达在阻止肿瘤细胞的增生、表型转化, 诱导细胞凋亡等方面有明显的作<sup>[12-13]</sup>。在正常鼠晶状体中 ILK 在 LECs、特别是分化的晶状体纤维

细胞中表达较高, 提示 ILK 可能在 LECs 生长、EMT 过程中起重要作用<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, 高浓度葡萄糖能够诱导 ILK 在 mRNA 水平的高表达, 与杜倩等<sup>[15]</sup>在蛋白水平的研究结果一致。ILK 的高表达是否参与了细胞的增生活性增强、EMT 等过程? 我们利用 RNA 干扰技术, 将细胞的 ILK 基因成功沉默(干扰效率为 70%)。当 ILK 沉默后, 我们发现在高浓度葡萄糖刺激下细胞的增生指标 PCNA 及 EMT 指标  $\alpha$ -SMA 和 FN 均受到明显抑制, 提示 ILK 是细胞增生和 EMT 等效应的上游关键因子。已有研究证实, ILK - GSK - 3 $\beta$ -PKB/AKT 影响存活的信号转导通路的存在, 它参与细胞周期、凋亡的调节。高浓度葡萄糖诱导的 LECs 增生可能通过此信号转导通路。

研究高浓度葡萄糖对 LECs 的影响可能对研究白内障的发病机制、防治后发性白内障提供依据。本研究表明高浓度葡萄糖刺激 LECs 的增生和 EMT, ILK 是此过程的上游因子, 它的表达不仅受高浓度葡萄糖刺激的影响, 而且抑制其表达能有效阻断高浓度葡萄糖引起的细胞增生和 EMT。

## 参考文献

- Grashoff C, Thievensen I, Lorenz K, et al. Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16 (5): 565 - 571
- Ebihara Y, Kato S, Oshika T, et al. Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with diabetes mellitus [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2006, 32 (7): 1184 - 1187
- Walker J, Menko AS. Integrins in lens development and disease [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 11: 1 - 10
- Han SY, Kang YS, Jee YH, et al. High glucose and angiotensin II increase  $\beta_1$  integrin and integrin-linked kinase synthesis in cultured mouse podocytes [J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 323 (2): 321 - 332
- Ohnishi M, Hasegawa G, Yamasaki M, et al. Integrin-linked kinase acts as a pro-survival factor against high glucose-associated osmotic stress in human mesangial cells [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21 (7): 1786 - 1793
- Liu XC, Liu BC, Zhang XL, et al. Role of ERK1/2 and PI3-K in the regulation of CTGF-induced ILK expression in HK-2 cells [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 382 (1-2): 89 - 94
- Bras ID, Colitz CM, Kusewitt DF, et al. Evaluation of advanced glycation end-products in diabetic and inherited canine cataracts [J]. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007, 245 (2): 249 - 257
- Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, et al. Inhibition of cyclin-dependent-kinases by p21 [J]. *Mol Biol Cell*, 1995, 6 (4): 387 - 400
- Tkachov SI, Lautenschläger C, Ehrlich D, et al. Changes in the lens epithelium with respect to cataractogenesis-Light microscopic and Scheimpflug densitometric and the cataractous and the clear lens of diabetics and non-diabetics [J]. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006, 244 (5): 596 - 602
- 胡建章, 庄铭忠, 徐国兴, 等. STZ-糖尿病大鼠晶状体上皮细胞 HSP70 的表达及增殖、凋亡的动态研究 [J]. *福建医科大学学报*, 2004, 2: 128
- Somasiri A, Howarth A, Goswami D, et al. Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (6): 1125 - 1136
- Duxbury MS, Ito H, Benoit E, et al. RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (9): 3433 - 3438
- Yau CY, Wheeler JJ, Sutton KL, et al. Inhibition of integrin-linked kinase by a selective small molecule inhibitor, QLT0254, inhibits the PI3K/PKB/mTOR, Stat 3, and FKHR pathways and tumor growth, and enhances gemcitabine-induced apoptosis in human orthotopic primary pancreatic cancer xenografts [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (4): 1497 - 1504
- Weaver MS, Toida N, Sage EH. Expression of integrin-linked kinase in the murine lens is consistent with its role in epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells in vitro [J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 707 - 718
- 杜倩, 周健, 惠延年, 等. 高浓度葡萄糖体外对人晶状体上皮细胞整合素连接激酶表达的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2008, 8 (4): 676 - 678

(收稿:2008-12-31 修回:2009-03-26)

(本文编辑:高红)

## · 短篇论著 ·

家兔 PVR 模型中玻璃体 IL-1 和 TNF- $\alpha$  质量浓度的变化

李维义 高晓唯 田艳明 贾媛媛 董晓云 刘海俊 余惠芳

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是由于视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞、神经胶质细胞、成纤维细胞以及炎性细胞的增生在玻璃体和视网膜形成收缩膜, 牵拉视网膜所致, 是视网膜脱离手术失败的主要原因, 也是眼外伤、糖尿病及血管性、炎症性视网膜病变的一种结局<sup>[1-2]</sup>。本实验建立与临床 PVR 病例接近的动物模型, 利用眼 B 型超声评价 PVR 模型的级别, 以研究白细胞介素-1 (IL-1)、TNF- $\alpha$  质量浓度在 PVR 模型发生过程中的变化过程, 为本课题的后续研究提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 PVR 动物模型的建立<sup>[3]</sup>

1.1.1 富含血小板的血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 的制备 用含 3.8% 枸橼酸钠的玻璃离心管收集健康日本大耳白兔耳缘静脉血, 室温下以 50 g 离心 10 min, 取 1/3 上清液, 获得血小板密度为  $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$  /mL 的 PRP。

1.1.2 实验分组及模型制作 选 2~3 kg 健康有色家兔 72 只

(购自新疆实验动物中心), 均取右眼为实验眼, 以随机数字表法将动物随机分为 A、B、C 3 组。A 组兔散瞳, 1% 丁卡因滴眼液表面麻醉, 前房穿刺, 玻璃体腔注入 20 U/mL 透明质酸酶 0.1 mL。于颞下象限制成约 2 个视盘直径 (PD) 大小的视网膜裂孔, 经视网膜在玻璃体腔中央注入 0.1 mL 的 PRP (约含 70 000 个血小板)。B 组兔经视网膜在玻璃体腔中央部注入 0.1 mL 的 PBS, 其他操作同 A 组。C 组为正常对照组。

## 1.2 观察指标与取材

1.2.1 实验观察 隔日裂隙灯及直接检眼镜检查兔眼, 每周用眼 B 型超声检查, 记录眼底情况, 模型眼 PVR 判定采用文献 [4] 的方法分为 I~VI 级。

1.2.2 取材 模型制作后第 1、2、3、4 周每组处死 6 只动物并摘除眼球, 一半眼球固定于 10% 中性甲醛液, 行苏木精-伊红染色; 另一半眼球在液氮中保存, ELASA 法测定 IL-1、TNF- $\alpha$  在玻璃体中的质量浓度。

1.2.3 ELASA 检测 按照兔 IL-1 (美国 BPB Biomedicals 公司)、兔 TNF- $\alpha$  (北京中昊时代生物技术中心) 定量酶联检测试剂盒使用说明书进行。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对所有数据进行统计学分析。

本课题为兰州军区卫生基金项目资助 (LXH-2006016)

作者单位: 510318 广州, 中国人民解放军第 421 医院眼科 (李维义、刘海俊、余惠芳); 813002 乌鲁木齐, 中国人民解放军第 474 医院眼科 全军眼科中心 (高晓唯、贾媛媛、田艳明、董晓云)

通讯作者: 高晓唯 (Email: gxwgaowx@263.net)