

氧分压对兔玻璃体切割术后白内障形成的影响

郭丽莉 梁建宏 黎晓新

Experimental study on the relationship of oxygen tension and postvitrectomy cataract formation

Guo Lili, Liang Jianhong, Li Xiaoxin. Department of Ophthalmology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Abstract Objective Cataract is one of frequent complications after vitrectomy, but its mechanism is still not understood completely. Present paper was to explore the relationship of oxygen tension and postvitrectomy cataract formation. **Methods** Lenses were isolated from 30 New Zealand white rabbits. The rabbits lenses were treated by different tension of oxygen ($2\% \times 760$ mmHg and $21\% \times 760$ mmHg) in vitro. The density of lens was determined by Pentacam Photo System at 1 hour, 4, 8 and 12 hours, and the apoptotic epithelial cells of lens were determined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotin-dUTP nickend labeling (TUNEL), respectively. The morphological changes of lens epithelial cells were observed by transmission electron microscope. **Results** The degree of lens opacity was continuously aggravated, and the density of lens was continuously increased with the significant difference in the average density of lens at 1 hour, 4, 8 and 12 hours respectively ($P < 0.05$). The number of apoptotic epithelial cells of lens was gradually increased in both experimental and control group, and a similar procedure was seen in the percentage of apoptotic lens epithelial cells with significant difference at 4, 8 and 12 hours between these two groups ($P < 0.05$). The apoptotic changes, including chromatin condensation, energy cave, pyknosis etc. were found under the transmission electron microscope in both groups. **Conclusion** The lower oxygen tension around the lens could decrease the number of apoptotic lens epithelial cells, indicating an inhibiting effect on postvitrectomy cataract formation.

Key words oxygen tension; vitrectomy; cataract; lens epithelial cell; apoptosis

摘要 目的 研究氧分压对玻璃体切割术后白内障的影响。**方法** 将离体兔晶状体分别置于氧分压为 $2\% \times 760$ mmHg 和 $21\% \times 760$ mmHg 的玻璃体切割灌注液中, 分别于 1、4、8、12 h 用前节分析仪测量两组晶状体密度值, 计算平均密度。TUNEL 法检测晶状体上皮细胞 (LECs) 凋亡, 并应用透射电镜观察 LECs 凋亡的形态学变化。**结果** 作用 1 h, 大体观察两组晶状体均保持透明, 可见少量 LECs 凋亡; 随着作用时间的延长, 作用 4 h、8 h 和 12 h 各组晶状体逐渐变混浊, 平均密度不断增加; 发生凋亡的 LECs 逐渐增多; 透射电镜下见核染色质凝集等细胞凋亡的形态学改变。作用 1、4、8 h 和 12 h 时, $2\% \times 760$ mmHg 组的晶状体平均密度明显高于 $21\% \times 760$ mmHg 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。1 h 时, $2\% \times 760$ mmHg 组和 $21\% \times 760$ mmHg 组的凋亡细胞百分比比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 h、8 h 和 12 h 时, $2\% \times 760$ mmHg 组的凋亡细胞数量少于 $21\% \times 760$ mmHg 组, 且两组的凋亡细胞百分比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 降低晶状体周围环境中的氧分压水平可减少 LECs 的凋亡, 晶状体周围环境中氧分压的不同对玻璃体切割术后白内障的形成有影响。

关键词 氧分压; 玻璃体切割; 白内障; 晶状体上皮细胞; 凋亡

分类号 R 776 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0114-04

白内障是玻璃体切割术后的常见并发症, 形成机制目前尚不明确。我们在前期研究中发现, 生理条件下晶状体处于低氧分压水平, 但在玻璃体手术过程中,

晶状体会暴露于高于生理水平约 10 倍的高氧分压环境, 引起晶状体内氧分压水平显著增高^[1]。这一改变可能导致晶状体内生化代谢的紊乱, 导致术后白内障的发生。本研究使用接近生理水平的低氧分压 ($2\% \times 760$ mmHg) 灌注液和临床实际应用的高氧分压 ($21\% \times 760$ mmHg) 灌注液分别作用于兔晶状体, 一定

本课题为回国人员启动基金资助 (E742)

作者单位: 100044 北京大学人民医院眼科

通讯作者: 梁建宏 (Email: jianhongliang@hotmail.com)

时间后比较两组晶状体的混浊程度和晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 的凋亡情况, 从氧分压的角度探讨玻璃体切割术后白内障的形成机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

新西兰大白兔 30 只 (北京大学动物饲养中心), 体重 2.5 ~ 3.0 kg, 雌雄不限。BSS (爱尔康公司), TUNEL 试剂盒、二甲氨基偶氮苯 (DAB) 和 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液 (北京中衫金桥生物技术有限公司), 枸橼酸钠 (天津化学试剂厂), Triton[®] X-100 (北京鼎国生物技术有限责任公司), 氯胺酮和氯丙嗪 (北京医药股份有限公司)。氧分压为 2% × 760 mmHg 的混合气体 (北京天昊气体有限公司)。前节分析仪 (德国 Oculus 公司 Pentacam 照相系统), 电热恒温培养箱 (上海福玛实验设备有限公司), HS10D-22880 Wedel 型手术显微镜 (德国 HAAG-STREIT 公司), LEICA DM 4000B 生物显微镜 (德国 LEICA 公司), 透射电镜 (日本电子 100CX-II)。

1.2 方 法

1.2.1 晶状体的分离 肌内注射氯胺酮 (35 mg/kg) 和氯丙嗪 (5 mg/kg) 对兔子进行麻醉, 常规消毒铺巾, 摘除眼球, 生理盐水冲洗 3 次, 手术显微镜下从眼球后壁剪开巩膜, 不完全去除玻璃体, 钝性离断晶状体悬韧带, 将晶状体迅速移入玻璃容器中。

1.2.2 晶状体的处理 (1) 实验组: 将氧分压为 2% × 760 mmHg 的混合气体通入装有 BSS 的实验用透明玻璃瓶中, 同时加热容器至 37 °C 后将容器置于 37 °C 恒温箱中, 以防止温度变化对氧分压的影响。待 BSS 充分饱和后, 在 37 °C 恒温箱中按以上步骤分离晶状体, 将晶状体迅速移入容器中, 盖上橡胶盖并用医用凡士林将容器密封。此时计为 0 时, 随后于 1、4、8 h 和 12 h 各取出一容器, 取其中的晶状体测量密度和用 TUNEL 法检测细胞凋亡。晶状体的分配用随机数字表法分为 4 组, 每组 6 个晶状体。(2) 对照组: 将装有 BSS 的实验用透明的玻璃容器敞口与空气充分接触, 加热容器至 37 °C 后将容器置于 37 °C 恒温箱中。BSS 与空气充分饱和后氧分压约为 21% × 760 mmHg。在 37 °C 恒温箱中按以上步骤分离晶状体, 将晶状体迅速移入容器中, 盖上橡胶盖并用医用凡士林将容器密封。分别于 1、4、8 h 和 12 h 各取出一容器, 同法检测晶状体密度及细胞凋亡。

1.2.3 晶状体密度的测量 取晶状体轴与水平线垂直时测量晶状体密度, 选取每个晶状体的前极、后极和

两端位于赤道上的 4 个点来测量密度, 相加每个点的密度除以 4, 计算出不同观察时间点两组晶状体的平均密度, 绘制出时间 - 平均晶状体密度曲线。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 沿赤道部剪开晶状体囊, 将前囊连同上皮细胞一起撕下, 平铺在载玻片上, 上皮细胞层面朝上。经空气干燥后用 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗片后与 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液室温孵育 30 min。PBS 洗片后, 与通透液 (0.1% Triton[®] X-100 溶于 0.1% 枸橼酸钠溶液中) 冰浴中孵育 2 min。PBS 洗片后与试剂盒提供的 TUNEL 反应混合液 37 °C 孵育 60 min, PBS 洗片后, 加入转化剂辣根过氧化物酶 (POD), 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗片, 再与 DAB 室温孵育 10 min。苏木素复染, 常规脱水、透明、封片。在生物显微镜下, 每个标本随机选取 4 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 计算凋亡细胞百分数。

1.2.5 样品制备及观察 12 h 时取实验组和对照组各 6 个晶状体行电镜观察。将晶状体前囊膜连同上皮细胞于 3% 戊二醛中固定 2 h, 4 °C 保存。1% 锇酸固定 1 h, 丙酮逐级脱水, 包埋剂包埋, 80 °C 聚合过夜。定位于视轴, 莱卡 ULTRACUT 型超薄切片机切片, 铀铅双重染色, 电镜下观察并照相。

1.3 统 计 学 方 法

采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学分析, 两组晶状体平均密度及凋亡细胞百分数的比较采用独立样本的 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 晶状体密度的变化

随着观察时间的延长, 实验组和对照组晶状体的平均密度逐渐增加, 1、4、8 h 和 12 h 时比较差异有统计学意义 (表 1)。

表 1 不同氧分压组不同时间晶状体平均密度的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 1 Comparison of average density of the lenses under the different oxygen tension conditions ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	Average density of the lenses in different time			
	1 h	4 h	8 h	12 h
2% × 760 mmHg	4.23 ± 0.09	7.25 ± 0.12	8.00 ± 0.07	13.37 ± 0.05
21% × 760 mmHg	5.00 ± 0.08	8.45 ± 0.10	9.40 ± 0.07	15.75 ± 0.06
<i>t</i>	15.26	18.49	36.15	76.29
<i>P</i>	0.00	0.00	0.00	0.00

(Student's *t* test)

2.2 TUNEL 法检测细胞凋亡

光镜下观察凋亡细胞的细胞核被染成棕黄色, 未凋亡细胞的细胞核呈蓝色 (图 1)。1 h 时, 实验组和对照

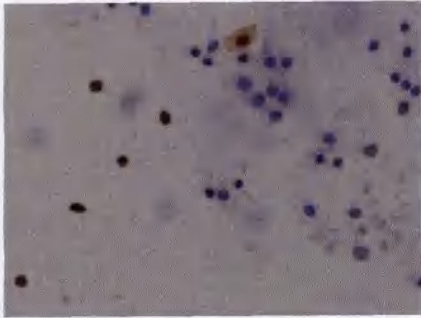


图1 TUNEL法检测 LECs 凋亡 凋亡细胞的细胞核被染成棕黄色,未凋亡细胞的细胞核呈蓝色(DAB ×100)
Fig.1 TUNEL staining of LECs The nucleus of apoptotic cells are stained into brown-yellow, and cellular nucleus of unapoptotic cells show blue color(DAB ×100)

照组的凋亡细胞数量稀少,两组的凋亡细胞百分比分别为 2.16% 和 3.06%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 随着观察时间的延长,实验组和对照组在 4、8 h 和 12 h 的凋亡细胞数量逐渐增多,凋亡细胞百分比也增加,

且各时间点的差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 不同氧分压组不同时间 LECs 凋亡细胞百分率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Comparison of the percentage of apoptotic LECs in different oxygen tension levels ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	Percentage of apoptotic LECs in different time			
	1 h	4 h	8 h	12 h
2% ×760 mmHg	2.16 ± 0.13	10.86 ± 0.43	15.87 ± 0.31	18.90 ± 0.93
21% ×760 mmHg	3.06 ± 0.16	13.18 ± 0.13	17.06 ± 0.13	22.67 ± 0.38
t	10.890	12.770	8.610	23.460
P	0.749	0.015	0.021	0.001

(Student's t test)

2.3 透射电镜观察

正常 LECs 形态规则,核为椭圆形,核膜清晰,染

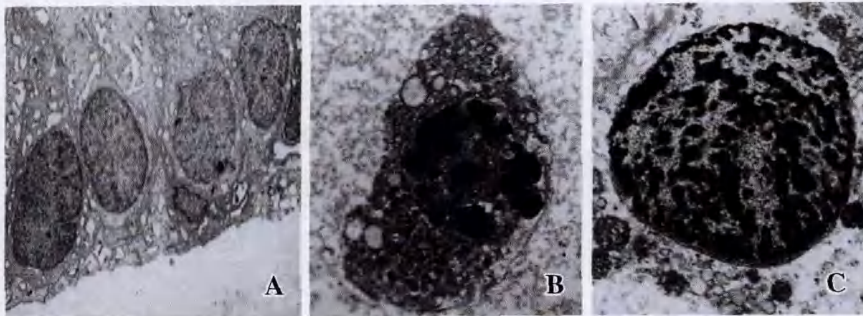


图 2 各组 LECs 的电镜下改变 A:正常 LECs 呈立方,核为椭圆形,核膜清晰,染色质呈细颗粒状均匀分布于核内,细胞器亚微结构清晰易辨(×2700) B:实验组12 h LECs 细胞核内染色质高度盘绕,出现多处气穴现象的空泡结构(×5000) C:对照组 LECs 发生凋亡(×10000) LECs 核染色质固缩、边集,核膜模糊甚至破坏,胞浆浓缩

Fig.2 The LECs morphology under the transmission electron microscope A: The normal LECs is cubic, and nucleus is ellipse. The caryotheca is clear, and chroumatin is homogeneous in nucleus-like granular (×2700) B: Typical chroumatin condensation and lots of vacuole are observed in the apoptotic LECs of experimental group at 12 hours (×5000) C: The chroumatin become pyknosis and margin closer. Caryotheca gets vague even breakdown, and cytoplasm is condensed in the apoptotic LECs of control group at 12 hours (×10000)

色质呈细颗粒状均匀分布于核内,细胞器亚微结构清晰易辨。12 h后,实验组和对照组的 LECs 均出现细胞体积变小,细胞外形极不规则,细胞核内染色质高度盘绕,出现许多称为气穴现象的空泡结构,核染色质固缩、边集,核膜模糊甚至破坏,胞浆浓缩。以上改变均符合细胞凋亡的形态学特征(图 2)。

3 讨论

玻璃体切割术后白内障形成的机制目前尚不十分明确,以往认为主要和手术中是否使用填充物、术后晶状体内生化代谢微环境的改变、是否存在炎症反应^[2]、手术中的机械损伤、温度改变、光化学毒性等有关^[3]。按照形成时间不同,晶状体的改变主要有两种类型:后囊下混浊及核硬化。后囊下混浊一般在术后数小时至 6 周出现,主要表现为羽毛样外观,组织学特征主要为晶状体纤维的肿胀及空泡化^[4],这种改变是可逆的,组织学上往往在术后 6 周内消失或减轻。核硬化一般出现在术后 3 个月,外观与老年性核硬化基本相同,与后囊下混浊相比,其形成是缓慢而持久的^[5]。

生理条件下玻璃体和晶状体处于较低氧分压水平,约为 2% ×760 mmHg,玻璃体对维持晶状体的低氧分压至关重要^[1]。在现代玻璃体切割术中,眼内灌注是必不可少的,由于灌注液在生产和使用过程中与空气饱和,氧分压相对较高,约为 21% ×760 mmHg。所以,在玻璃体切割术中,由于灌注液对玻璃体和前房液的置换,晶状体长时间与灌注液接触而暴露在高氧分压环境下。虽然已有学者认识到晶状体氧分压的升高

会损害晶状体,引起晶状体核硬化^[6],但从氧分压的角度研究灌注液与玻璃体切割术后白内障的形成的关系鲜有报道。

现在普遍认为,LECs 凋亡是所有人类和动物非先天性白内障形成的共有的细胞学基础^[7]。LECs 的凋亡引发了白内障,因此检测 LECs 凋亡是判断是否发生早期白内障的可靠指标。本实验用 TUNEL 法观察在不同氧分压条件下 LECs 发生凋亡的变化,并通过透射电镜对细胞凋亡情况进一步确认。发现高氧分压组的凋亡细胞百分比明显高于低氧分压组,差异有统计学意义 ($P > 0.05$)。我们还应用了前节分析仪检测两组

晶状体的密度,发现在各时间点差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),高氧分压组比低氧分压组的晶状体密度高。这些结果说明目前临床中使用的灌注液所具有的高氧分压因素对晶状体是有损伤的。氧对晶状体的损伤分为急性损伤和慢性损伤。急性损伤可以引起晶状体后囊膜的一过性功能障碍,使其通透性发生改变,水分和离子等物质进入晶状体,引起晶状体后囊下的混浊。本实验中部分观察对象的这种后囊下混浊是可逆的,提示我们晶状体中可能存在一定程度的自我修复机制。慢性损伤主要是通过加速 LECs 凋亡而使晶状体发生核硬化,相对于急性氧损伤,慢性氧损伤的这种毒性作用更为持久且不可逆。本实验的结果表明改变灌注液的高氧分压特性、降低晶状体周围环境中的氧分压水平可以减少 LECs 的凋亡,从而降低玻璃体切割术后白内障的发生率。在本实验中,我们摘出晶状体时保留部分玻璃体,因其对晶状体有保护作用,可防止外界大气中的氧气进入晶状体;同时保留部分玻璃体可以使晶状体免受机械损伤。同时,因为氦气为惰性气体,化学性质稳定,且没有细胞毒性,我们选用了氦气和氧气的混合气体。我们发现 1 h 时实验组和对照组无论在晶状体密度还是 LECs 的凋亡数量上均无明显的差别,随观察时间的延长,4、8 h 和 12 h 时实验组和对照组 LECs 的凋亡数量均有所增加,且二者的凋亡细胞的百分比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),

提示晶状体内可能存在着部分代偿机制,当晶状体周围环境中的氧分压水平升高时,这种代偿机制能够发挥作用,延迟晶状体混浊的发生。我们目前正在积极探索晶状体内是否存在这种代偿机制及其作用途径。

参考文献

- 1 Barbazetto IA, Liang J, Chang S, et al. Oxygen tension in the rabbit lens and vitreous before and after vitrectomy [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78(5): 917 - 924
- 2 Kuszak JR, Sivak JG, Moran KL, et al. Suppression of post-vitrectomy lens changes in rabbit by novel benzopyranil ester and amides [J]. *Exp Eye Res*, 2002, 75: 459 - 473
- 3 Cheng L, Azen SP, El-Bradey MH, et al. Duration of vitrectomy and postoperative cataract in the vitrectomy for macular hole study [J]. *Am J Ophthalmol*, 2001, 132(6): 881 - 887
- 4 Hsuan JD, Brown NA, Bron AJ, et al. Posterior subcapsular and nuclear cataract after vitrectomy [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2001, 3: 437 - 444
- 5 Ling CA, Weiter JJ, Buzney SM, et al. Competing theories of cataractogenesis after pars plana vitrectomy and the nutrient theory of cataractogenesis: a function of altered aqueous fluid dynamics [J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2005, 45(4): 173 - 198
- 6 Truscott RW. Age-related nuclear cataract: a lens transport problem [J]. *Ophthalmic Res*, 2000, 32: 185 - 194
- 7 Li WC, Duszak JR, Kunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for noncongenital cataract development in humans and animals [J]. *J Cell Biol*, 1995, 130: 169 - 181

(收稿:2008-03-10 修回:2008-10-15)

(本文编辑:王璐璐)

本刊投稿的相关事宜

- 1 来稿需经作者单位的学术机构审核同意,并开具单位介绍信,介绍信应注明稿件无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等。作者投稿时应提供自己详细的联系方式,如作者的详细地址、邮政编码、联系电话及通讯作者的 Email 地址等。
- 2 为保障重要科研课题的时效性,本刊开设了“快审、快编、快登”的“绿色”通道,优先刊登国家级攻关项目、国家自然科学基金资助项目等重大科研课题。凡属此类稿件,作者投稿时请提供有关项目批准件的复印件,经编辑部审核将在稿件通过审核后提前安排发表,并请作者在文稿的脚注中予以注明,如:“本课题为 × × 基金资助(基金号: × × × × ×)”。
- 3 请自留底稿,勿一稿两投。本刊在收到文稿后即发送回执至作者邮箱中,并注明稿号,以便作者查询。稿件经审理决定采用者,2 个月以内发出采用通知。稿件未被采用者,2 个月以内发退稿通知,稿件不再退回。编辑部的各种通知将从 Email 发出,审稿期间请作者留意电子信箱。作者接到退稿通知或与编辑部联系确认后方可自行处理稿件;发送作者修改的稿件,如 2 个月内没有修回,视为作者自行撤稿。一旦稿件进入编排阶段,请尽量避免自撤稿件。对一稿两投或强行撤稿而给我刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。
- 4 根据《著作权法》的相关条文,本刊编辑有权对来稿按照编辑规范和专业知进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者需认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方进行沟通。
- 5 来稿需付稿件审理费,每篇 30 元。稿件决定采用后,请按通知按时缴纳版面费,有彩图者还需另付彩图印制工本费。版面费及彩图工本费由作者单位从课题基金、科研费等费用中支付。
- 6 来稿刊登后即付给作者稿酬,并赠当期杂志第一作者 2 册,其余作者各 1 册。
- 7 本刊联系方式请从《眼科研究》版权页查询。

(本刊编辑部)